

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

**Der Einfluss von 20-Hydroxyecdysen und 17- $\beta$ -Estradiol  
auf den Knochenmetabolismus der ovariectomierten  
Sprague-Dawley-Ratte:  
Eine Alternative der postmenopausalen  
Antiosteoporosetherapie?**

**Inaugural-Dissertation**

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

vorgelegt von  
David Benjamin Christel  
aus Detmold / Ostwestfalen-Lippe

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. Frömmel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wuttke
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Wiese
3. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2011

## Abkürzungsverzeichnis

Appl.	Applikation
BMD	Bone Mineral Density, Knochendichte
CL	CrossLaps
CT1	erste computertomographische Messung vor Versuchsbeginn
CT2	zweite computertomographische Messung zu Versuchsende
d	day, Tag
E2	17- $\beta$ -Estradiol
Ecd	20-Hydroxyecdysol
Ecd 2/ 10/ 25	s.c. Appl. von Ecd in den Konzentrationen 2/ 10/ 25 [mg/ Tier/ d], sf-Futter
Ecd 6/ 17/ 36	p.o. Appl. von Ecd mit sf-Futter in den Konzentrationen 6/ 17/ 36 [mg/ Tier/ d]
ED	endosteale Dichte
ELISA	enzym-linked immunosorbent assay
ER $\alpha$	Östrogenrezeptor $\alpha$
ER $\beta$	Östrogenrezeptor $\beta$
HRT	hormone replacement therapy (kombinierte Hormonersatztherapie, bestehend aus Östrogenen und Gestagenen)
intakt	intakte Kontrolltiere, sf-Futter
IF	intraosteale Fläche
KD	kortikale Dichte
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzerkrankung

KO	ovarektomierte Kontrolltiere, sf-Futter
KZV	Kurzzeitversuch
LD50	mittlere letale Dosis
LZV	Langzeitversuch
Min.	Minute
OC	Osteokalzin
ovx	ovarektomiert
Ovx	Ovarektomie, entspricht zeitlich dem jeweiligen Versuchsbeginn
p.o.	per os
qCT	quantitative Computertomographie
s.c.	subkutan
sf	sojafreies Futter
sog.	sogenannt
u.a.	unter anderem

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1	Die Osteoporose	7
1.1.1	Die Prophylaxe und Therapie der Osteoporose	9
1.2	Der Knochenaufbau	11
1.3	Die Wirkung von Östrogen auf den Knochenstoffwechsel	12
1.4	Die Ratte als Tiermodell	13
1.5	Die alternative Therapie mit Ecdyson	14
1.5.1	Die Ecdysteroide	15
1.5.2	Das Ecdyson	16
1.6.	Das Ziel der Studie	17
2.	Material und Methoden	
2.1	Die Versuchstiere und ihr Haltungsbedingungen	18
2.2	Der Versuchsablauf des Kurzzeitversuchs	18
2.3	Der Versuchsablauf des Langzeitversuchs	20
2.4	Die Ovariectomie (Ovx)	21
2.5	Der Versuchsabschluss	21
2.6	Die quantitative Computertomographie (qCT)	22
2.7	Der Messvorgang	24
2.8	Die statistische Auswertung	24
2.9	Die Serumanalyse	24

3.	Ergebnisse	
3.1	Die Futteraufnahme	25
3.1.1	Die Futteraufnahme im Kurzzeitversuch	25
3.1.2	Die Futteraufnahme im Langzeitversuch	26
3.2	Das Körpergewicht	28
3.2.1	Das Körpergewicht im Kurzzeitversuch	28
3.2.2	Das Körpergewicht im Langzeitversuch	30
3.3	Die Ergebnisse der qCT	32
3.3.1	Die endosteale Dichte (ED) im Kurzzeitversuch	33
3.3.2	Die endosteale Dichte (ED) im Langzeitversuch	35
3.3.3	Die intraosteale Fläche (IF) im Kurzzeitversuch	37
3.3.4	Die intraosteale Fläche (IF) im Langzeitversuch	39
3.3.5	Die kortikale Dichte (KD) im Kurzzeitversuch	41
3.3.6	Die kortikale Dichte (KD) im Langzeitversuch	43
3.4	Die Ergebnisse der Serumanalyse	45
3.4.1	Das Osteokalzin (OC) im Kurzzeitversuch	45
3.4.2	Das Osteokalzin (OC) im Langzeitversuch	46
3.4.3	Die CrossLaps (CL) im Langzeitversuch	47
4.	Diskussion	48
5.	Zusammenfassung	57
6.	Methodischer Anhang	59
7.	Literaturverzeichnis	62

## 1. Einleitung

Klimakterische Beschwerden sind ein weiträumig erforschtes Krankheitsgebiet von zunehmender Bedeutung. Insbesondere der Osteoporose kommt hierbei im Rahmen der demographischen Entwicklung einer immer älter werdenden Gesellschaft eine hervorgehobene Stellung zu. Allein in Deutschland ist fast jede dritte Frau und jeder fünfte Mann ab dem 50. Lebensjahr von Osteoporose betroffen. Schätzungen zufolge belaufen sich die Kosten, die direkt und indirekt durch Osteoporose jährlich verursacht werden, in Deutschland auf ca. drei Milliarden Euro, mit steigender Tendenz (Pfeilschifter et al. 2003). Vor allem für Frauen stellt Osteoporose ein zunehmendes Problem dar. Obwohl seit Jahren intensiv auf diesem Gebiet geforscht wird, gibt es nur unbefriedigende Möglichkeiten zur Therapie und Prävention der Osteoporose. In Deutschland fehlen prophylaktische, von den Krankenkassen akzeptierte Maßnahmen. Meist beginnt die Therapie der Osteoporose erst, nachdem bereits eine Fraktur aufgetreten ist. Besonders die bisher angewandte Hormonersatztherapie (HRT) hat in jüngster Zeit, aufgrund ihrer Nebenwirkungen (Rossouw et al. 2002), an Akzeptanz verloren.

Dieses Forschungsprojekt und die vorliegende Arbeit sind aus der Motivation heraus entstanden, eine pharmakologische Alternative zur bisherigen Therapie und Prophylaxe der Osteoporose zu finden: Eine Alternative, die kostengünstig ist, von den Krankenkassen akzeptiert wird und nicht die Nebenwirkungen der bisherigen Behandlungsmöglichkeiten aufweist.

### 1.1 Die Osteoporose

Die Osteoporose wird als eine Erkrankung des Skelettsystems mit einer verminderten Knochenmasse und einer Zerstörung der Mikroarchitektur definiert, woraus eine erhöhte Zerbrechlichkeit des Knochens und somit ein gesteigertes Frakturrisiko hervorgeht (DVO 2009).

Um die Osteoporose differenzierter betrachten zu können, erstellte die World Health Organization (WHO 1994) eine Klassifizierung. Als Richtwert dient hierbei der „T-Score“. Dieser drückt einen Wert für die Anzahl der Standardabweichungen (SD) aus, die sich auf den Mittelwert der Knochendichte (Bone Mineral Density = BMD) gesunder, junger Erwachsener im Alter von 20 – 40 Jahren beziehen (WHO 1994).

Unabhängig vom Messort ergibt sich daraus folgende Stadieneinteilung:

Osteoporosestadium	BMD (SD vom T-Wert)
Physiologischer Befund	BMD unverändert (T-Score > - 1,0 SD)
Osteopenie	BMD erniedrigt (T-Score zwischen - 1,0 / - 2,5 SD)
Präklinische Osteoporose	BMD erniedrigt ohne Fraktur (T-Score < -2,5 SD)
Manifeste Osteoporose	BMD erniedrigt mit Fraktur (T-Score < -2,5 SD)

**Tab. 1: Stadieneinteilung der Osteoporose (WHO 1994)**

Man unterteilt die Osteoporose in zwei Formen: Die primäre und die sekundäre. Am häufigsten (mit 95 Prozent) ist die primäre Osteoporose. Diese Form tritt im Gegensatz zur sekundären Osteoporose nicht als Folge einer anderen Erkrankung auf. Zu der primären Form gehören die seltene idiopathische Osteoporose, die postmenopausale Osteoporose (Typ I) sowie die alterssenile Osteoporose (Typ II). Die als Typ I bezeichnete postmenopausale Osteoporose betrifft vor allem Frauen zwischen dem 50. bis 75. Lebensjahr infolge des Östrogenabfalls. Mit diesem Typ der Osteoporose beschäftigt sich die vorliegende Doktorarbeit.

Der Knochenverlust ist hier eher spongiös als kortikal betont. Am häufigsten sind dabei die Wirbelsäule und der proximale Femur betroffen (Berchtold et al. 2006). Von der als Typ II bezeichneten senilen Osteoporose sind vor allem Frauen ab dem 70. Lebensjahr betroffen. Der Knochenverlust tritt hierbei gleichermaßen spongiös als auch kortikal auf, mit typischer Frakturgefährdung für den Femurschenkelhals, den proximalen Humerus und distalen Radius.

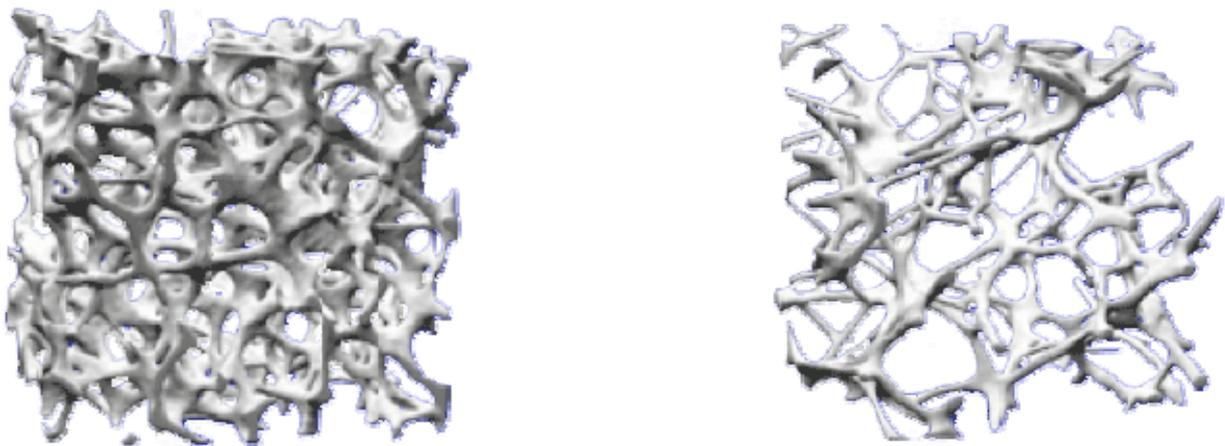
Die häufigsten Ursachen der sekundären Osteoporose sind (Berchtold et al. 2006):

- Hormonell (z.B. M. Cushing, Typ-I-Diabetes mellitus)
- Gastroenterologisch (Malabsorptionssyndrome)
- Medikamentös (z.B. Glukokortikoide, Antikonvulsiva)
- Neoplastische Erkrankungen (Leukämien, Lymphome)
- Immobilisation
- Andere (z.B. Rheumatoide Erkrankungen).

Letztendlich liegt bei der Osteoporose eine negative Skelettbilanz zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau vor. Dies kann einerseits durch einen beschleunigten Abbau von Knochensubstanz (*high turnover*) geschehen, wie es der Fall bei der postmenopausalen Osteoporose (Typ I) ist, andererseits durch

verminderte Knochenneubildung bei gleich bleibendem Knochenabbau (*low turnover*) (Berchtold et al. 2006).

Je nach Verfahren wird die BMD einer Person mit der Knochendichte gesunder Erwachsener im Alter zwischen 20 und 40 Jahren (T-Score) oder mit der durchschnittlichen Knochendichte einer knochengesunden altersgleichen Vergleichspopulation verglichen (Z-Score).



**Abb. 1:** Die Struktur von normalem (links) und osteoporotischem Knochen (rechts) im Vergleich.  
[Quelle: Deutsche Forschungsgemeinschaft]

### 1.1.1 Die Prophylaxe und Therapie der Osteoporose

Da osteoporosebedingte Frakturen zu einer starken Einschränkung der Lebensqualität bis hin zur Erhöhung der Mortalitätsrate der Betroffenen führen, ist es wichtig, diese mit Hilfe präventiver Maßnahmen zu vermeiden. Dazu zählt eine frühzeitige Aufklärung über Ernährung und Lebensstil. Hierbei sollte der Patient darauf hingewiesen werden, sich kalziumreich zu ernähren, auf ausreichende Sonnenexposition zur Bildung von Vitamin D zu achten und den Verzehr von phosphatreicher Kost sowie Alkohol, Koffein und Nikotin zu meiden, da diese den Knochenabbau fördern (DVO 2009).

Des Weiteren haben sich Maßnahmen bewährt, die die Koordination und Muskelkraft verbessern (beispielsweise regelmäßige Bewegung 2-4 mal in der Woche für ca. 30 Minuten). Zum einen deswegen, weil die körperliche Belastung einem Verlust von Knochenmasse entgegenwirkt (Flieger et al. 1998; Rubin et al. 2002; Ferretti et al. 2003; Luu et al. 2009), und zum anderen, weil die allgemeine Verbesserung des Bewegungsapparates der Sturzprophylaxe dient (DVO 2009).

Die Basis der medikamentösen Osteoporoseprophylaxe ist die Substitution von Kalzium (1200-1500mg/Tag) und Vitamin D (400-800 IU/Tag). Kalzium ist ein wichtiges Substrat der Knochenneubildung, wobei Vitamin D dessen Resorption fördert und den Knochenumsatz steigert.

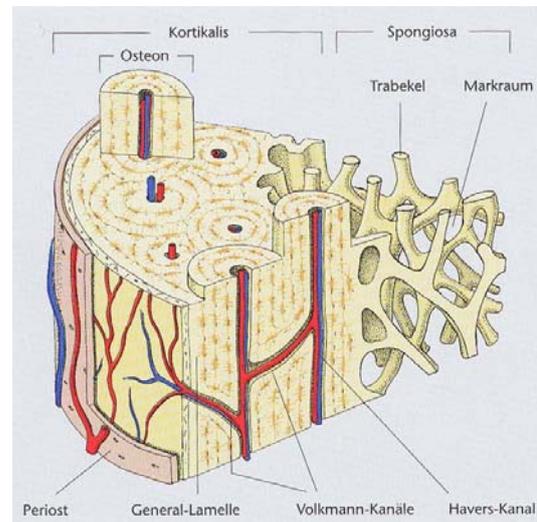
Zu den Medikamenten, die speziell für die Therapie der Osteoporose zugelassen sind, gehören u.a. die antiresorptiv wirkenden Bisphosphonate, Östrogene im Rahmen der HRT und selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERM).

<b>Medikamentöse Therapie der Osteoporose</b>
<b>Hemmung der Knochenresorption</b>
Bisphosphonate (z.B. Alendronat, Risendronat, Ibandronat, Zolendronat) SERM (z.B. Raloxifen) HRT (Östrogene/Gestagene) Kalzitinin Denosumab (humaner Antikörper gegen RANKL) Vitamin-D-Metabolite
<b>Stimulation der Knochenformation</b>
Teriparatide (Parathormon) Fluoride Vitamin-D-Metabolite Kalzium
<b>Prophylaxe</b>
Körperliche Aktivität Adäquate Kalziumzufuhr Vitamin D

**Tab. 2:** Therapie der Osteoporose (modifiziert nach den Vorgaben des DVO 2009)

## 1.2 Der Knochenaufbau

Das Knochengewebe wird strukturell in Substantia compacta (kortikaler bzw. kompakter Knochen) und Substantia spongiosa (spongiöser bzw. trabekulärer Knochen) unterteilt. Die Compacta (bzw. Kortikalis) bildet den Knochenmantel, der die Spongiosa umschließt und ca. 80% der gesamten Knochenmasse ausmacht. Die Spongiosa besteht aus einem fein verzweigten Netzwerk von Knochenbälkchen (Trabekel), die untereinander verbunden und entlang der Belastungslinien angeordnet



**Abb. 2:** Struktur des Knochenaufbaus  
[Quelle: Trebsdorf (2000)]

sind. Sie stellen die essentielle Struktur für die Stabilität des Knochens dar. Zwischen den Trabekeln befinden sich das Knochenmark, Fettgewebe und Gefäße. Der Knochen ist äußerlich von einer Knochenhaut, dem Periost umgeben, welche aus zwei Schichten besteht; dem äußeren kollagenfaserreichen Stratum fibrosum und dem inneren zellreichen Stratum osteogenicum, welches innerviert und vaskularisiert ist. Nach Innen bildet das Endost die Grenzschicht zwischen Knochengewebe und Knochenmark.

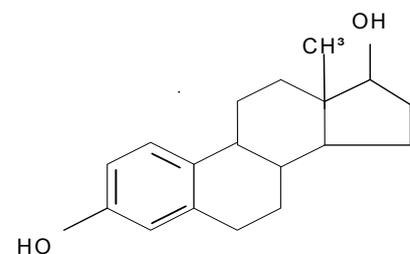
Die Knochensubstanz selbst besteht zum einen aus extrazellulärer Matrix, die organische und anorganische Komponenten beinhaltet, und zum anderen aus ossären Zellen. Der anorganische Anteil ist in Form von Hydroxylapatitkristallen organisiert, die sich zu 85 % aus Kalziumphosphat, 10 % Kalziumkarbonat und kleineren Mengen von Magnesium, Kalium, Kalzium und Bikarbonat zusammensetzen. Die organische Komponente besteht zu 90 % aus Typ-I-Kollagen, das über sogenannte Crosslinks miteinander verbunden ist. Ungefähr 10 % sind nichtkollagene Proteine wie Osteocalcin, Osteonectin und Osteopontin sowie Proteoglykane und Glykoproteine. Letztlich entsteht die hohe Druckfestigkeit des Knochens durch Verbindung der Hydroxylapatitkristalle mit den parallel dazu verlaufenden Kollagenfasern (Junqueira et al. 2002).

Der zelluläre Bestandteil des Knochengewebes setzt sich aus Osteozyten, Osteoblasten, Osteoklasten und Osteoprogenitorzellen zusammen. Letztere sind

Knochenvorläuferzellen, die hauptsächlich im Stratum osteogenicum des Periosts und in der Zellschicht des Endosts angesiedelt sind. Aus ihnen gehen die Osteoblasten hervor, die die Knochenmatrix synthetisieren. Dazu produzieren sie eine kollagen- und glykoproteinreiche Grundsubstanz, das Osteoid, und regen deren extrazelluläre Kalzifikation an. Aus Osteoblasten werden Osteozyten, wenn sie von der mineralisierten Matrix eingeschlossen werden und sich darin einbauen. Die Aufgabe der Osteozyten besteht in der Ernährung des Knochens. Bei den Osteoklasten handelt es sich um mehrkernige Riesenzellen, die aus Monozyten hervorgehen. Sie können lysosomale Proteasen sezernieren und sind für die Resorption der Knochenmatrix verantwortlich.

### 1.3 Die Wirkung von Östrogen auf den Knochenstoffwechsel

Im Knochen herrscht ein physiologisches Gleichgewicht in Bezug auf den Knochenauf- und Knochenabbau, was einer ausgewogenen Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten entspricht. Durch Östrogenmangel, wie er postmenopausal und nach Ovariectomie auftritt, kommt es zu einer Disbalance dieses Systems zugunsten der Osteoklastenaktivität



**Abb. 3:** Die Struktur des im Versuch verw. 17- $\beta$ -Estradiol (E2)

(Riggs et al. 2002; Seidlova-Wuttke et al. 2003a/b). Es wird also mehr Knochen ab- als aufgebaut (*high turnover*). Bisher sind zwei Östrogenrezeptoren bekannt, welche man als ER $\alpha$  und ER $\beta$  bezeichnet (Kuiper et al. 1996). Im Knochen kommen beide Rezeptortypen vor, welche sich in Verteilung sowie der Wirkungsweise unterscheiden. Während der ER $\alpha$  die meisten Aktivitäten an die Knochenzellen übermittelt, kann ER $\beta$  als dominanter Antagonist auftreten (Riggs et al. 2002). Studien an Östrogenrezeptor-knock-out-Mäusen, bei denen spezifisch die Expression von ER $\alpha$  (AERKO), ER $\beta$  (BERKO) oder beider (DERKO) inhibiert wurde, haben gezeigt, dass das östrogenabhängige Knochenwachstum durch ER $\alpha$  vermittelt wird und dass ER $\beta$  wahrscheinlich für den altersbedingten Verlust von Knochenmasse und den geschlechtlichen Dimorphismus ossärer Veränderungen mitverantwortlich ist (Riggs et al. 2002). Ausgelöst durch den Mangel an Östrogenen sezernieren Osteoblasten und im Knochenmark ansässige Monozyten vermehrt Interleukin (IL) 1, IL-6, TNF- $\alpha$ , M-CSF und PGE2. Diese Zytokine sind Mediatoren

der Knochenresorption, indem sie die Aktivierung und Differenzierung der Osteoklasten stimulieren (Riggs et al. 2002). Der *transforming-growth-factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) ist ein weiteres Zytokin, das am Knochenstoffwechsel beteiligt ist. Es wird von Osteoblasten sezerniert und wirkt auf Osteoklasten, indem es deren Aktivität hemmt und die Apoptoserate steigert. Estradiol bewirkt eine Steigerung der TGF- $\beta$ -Synthese und hemmt u.a. dadurch die Knochenresorption (Hughes et al. 1996; Manolagas 2000). Ein weiterer wichtiger Effektor der Osteoklastendifferenzierung ist der *receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand* (RANKL), welcher von Osteoblasten exprimiert wird und zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) gehört. Die Bindung von RANKL an dessen Rezeptor RANK, an der Oberfläche von Osteoklasten, stimuliert deren Aktivierung und Proliferation, wobei auch deren Apoptoserate erniedrigt wird. Osteoblasten sezernieren außerdem Osteoprotegerin (OPG), das an RANKL binden kann und es somit neutralisiert (Riggs et al. 2002). Dementsprechend ist OPG ein wichtiger protektiver Faktor gegenüber der Knochenresorption durch Osteoklasten. In Studien wurde gezeigt, dass Östrogene einen Anstieg von OPG (Hofbauer et al. 1999) und einen Abfall von RANK induzieren (Shevde et al. 2000).

Kurz nach der Ovariectomie, also dem Wegfall von E<sub>2</sub>, kommt es zu einer vermehrten Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten. Im Serum lässt sich die Osteoblastenaktivität durch einen erhöhten Osteokalzinspiegel feststellen (Seidlova-Wuttke et al. 2003a; French et al. 2008) und die Osteoklastenaktivität durch erhöhte Werte der Abbauprodukte des Kollagens-1 $\alpha$ 1, den sogenannten CrossLaps (Seidlova-Wuttke et al. 2003a/b; Coelingh Bennink et al. 2008; French et al. 2008).

Daraus lässt sich zum einen schließen, dass in Abwesenheit von E<sub>2</sub> sowohl die Osteoblasten- als auch die Osteoklastenaktivität erhöht wird, und zum anderen, dass bei ovariectomierten Tieren die Osteoklasten stärker stimuliert werden als die Osteoblasten, wodurch ein erhöhter Knochenabbau resultiert (Riggs et al. 2002; Seidlova-Wuttke et al. 2003a/b). Entsprechend werden diese Marker in vielen Studien eingesetzt, um vermutete antiosteoporotische Effekte von Testsubstanzen zu untersuchen.

#### **1.4 Die Ratte als Tiermodell**

In den letzten Jahren hat sich die ovariectomierte (ovx) Ratte als anerkanntes Versuchstier zur Untersuchung endokrinologischer und postmenopausaler Vorgänge

am Knochen hervorgerufen. Nach Ovx kommt es bei der Ratte vor allem im Bereich der Tibiametaphyse innerhalb von 3 Monaten zu einem ausgeprägten Verlust der Knochensubstanz von bis zu 50 % und mehr, wobei besonders der trabekuläre Knochenanteil der Tibia betroffen ist (Garner et al. 1991; Seidlova-Wuttke et al. 2003 a/b, 2008b, 2010b; Perry et al. 2005). Drei Monate sind ca. 12 % der Lebenserwartung einer SD-Ratte. Übertragen auf den Menschen entspricht das etwa der Lebensspanne von 10 Jahren der Frau.

Des Weiteren wird durch die prophylaktische Substitution von E2, sowohl bei der ovx Ratte als auch bei der postmenopausalen Frau, ein knochenprotektiver Effekt erzielt (Garner et al. 1991). Im Unterschied zum Menschen entwickeln Ratten spontan keine Osteoporose. Diese tritt hier erst nach ovx auf, dabei vor allem in der Tibia und weniger im Femur oder den Vertebrae. Außerdem ist die Knochenstruktur der Ratte der des Menschen ähnlich und die Entwicklung osteoporotischer Veränderungen geht sehr schnell. Die Serumparameter, die aus dem Blut der Ratte gewonnen werden können, sind im Bezug auf Untersuchungen der Osteoporose etabliert, da sich diese Parameter sowohl bei der ovx Ratte als auch der postmenopausalen Frau gleichartig verhalten. Außerdem ist die diagnostische Untersuchung des Knochens mittels qCT in dieser Abteilung möglich.

Durch die sehr ähnlichen metabolischen Vorgänge von ovariectomierter Ratte und postmenopausaler Frau ist die ovx Ratte ein anerkanntes Osteoporosemodell und wird dementsprechend in dieser Arbeit verwendet.

## **1.5 Die alternative Therapie mit Ecdyson**

In jüngster Zeit ist in zahlreichen Studien dargestellt worden, dass ein erhöhtes Risiko besteht im Rahmen der klassischen Hormonersatztherapie Brustkrebs oder kardiovaskuläre Erkrankungen auszubilden (Rossouw et al. 2002). Aus diesem Grund wird verstärkt nach Substanzen geforscht, die eine Therapiealternative darstellen. Vor allem die Prävention und Behandlung der postmenopausalen Osteoporose, ohne die möglichen, unerwünschten Nebenwirkungen der herkömmlichen HRT, sind ein wichtiger Focus der derzeitigen Forschung und Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit.

Auf der Suche nach möglichen Substanzen stellte sich heraus, dass Auszüge der Pflanze *Tinospora Cordifolia* einen antiosteoporotischen Effekt haben (Kapur et al.

2008), wobei ein Ecdysteroid namens 20-Hydroxyecdysen (20-OH-Ecdysen = Ecdysterone =  $\beta$ -Ecdysen = Ecd) als wahrscheinlich aktive Komponente identifiziert wurde.

### 1.5.1 Die Ecdysteroide

Bei Ecdysteroiden handelt es sich um polyhydroxylierte Ketosteroide mit langen Carbonseitenketten (Gossauer 2006). Ecdysteroide sind weit verbreitet und kommen sowohl in der Pflanzenwelt als auch im Tierreich vor. Bei Arthropoden haben sie eine zumeist artspezifische, hormonelle Funktion, vor allem im Bereich der Reproduktion, der Embryogenese und der Diapause (Bathori et al. 2008). Die von Pflanzen produzierten Phytoecdysteroide dienen wahrscheinlich der Abwehr von Schädlingsbefall durch Raupen, indem sie deren vorzeitige Verpuppung stimulieren. Dementsprechend werden sie als selektive Schädlingsbekämpfungsmittel angesehen (Gossauer 2006).

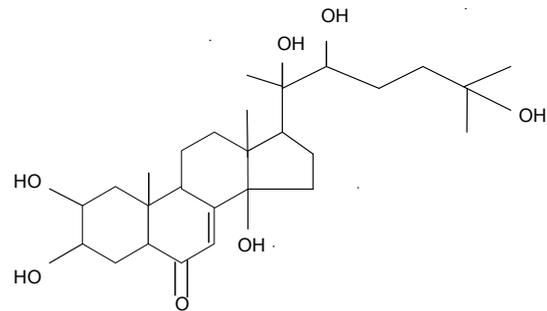
Im Organismus von Säugetieren ist bis dato kein funktioneller Ecdysteroidrezeptor nachgewiesen worden. Trotzdem zeigen oral aufgenommene und subkutan applizierte Ecdysteroide eine pharmakologische Wirkung. Vor allem der proteinanabole Effekt dieser Substanzgruppe hat zu einer kommerziellen Verwendung in der Fitnessindustrie geführt (Bathori et al. 2008).

Derzeit gibt es eine große Anzahl von ecdysteroidhaltigen Präparaten auf dem Markt, denen auf Höhe ihres Ecdysongehaltes basierend positive Eigenschaften im Bezug auf den Muskelaufbau, die Muskelregeneration und die Fettreduktion nachgesagt werden. Eine eindeutige wissenschaftliche Bestätigung der Wirkung dieser Produkte auf den Menschen steht allerdings aus (Bathori et al. 2008).

In tierexperimentellen Studien an Ratten hingegen konnte ein proteinanaboler, muskelaufbauender Effekt von Ecdysteroiden nachgewiesen werden (Gorelick-Feldman et al. 2008), der sich auch beim Menschen darstellen ließ. So zeigte sich vor allem bei muskulärem Training in Kombination mit einer Ecdysenbehandlung ein signifikanter Zuwachs an Muskelmasse, ohne dabei östrogene oder androgene Wirkung zu haben (Bathori et al. 2008, Dinan und Lafont 2006).

## 1.5.2 Das Ecdyson

Ecdyson ist ein in Pflanzen vorkommendes Ecdysteroid. Dabei vor allem in der Eibe *Taxus baccata* und im Farn *Polypodium vulgare* (Spiteller et al. 2000; Zhu et al. 2007). Es kann sowohl oral als auch via Injektion appliziert werden, um eine pharmakologisch relevante Wirkung zu erzielen, worauf komplexe metabolische Vorgänge im Säugetierorganismus erfolgen



**Abb. 4:** Die Struktur des im Versuch verwendeten 20-Hydroxyecdysone (Ecd)

(Dinan und Lafont 2006). Es weist gegenüber Säugern eine geringe Toxizität auf. Die mittlere letale Dosis (LD50) für oral appliziertes Ecd liegt bei  $>9\text{g/kg KG}$  und  $>6,4\text{g/kg KG}$  bei intraperitonealer Injektion (Bathori et al. 2008). Im Gewebe von Arthropoden gibt es einen spezifischen Ecdysonrezeptor (EcR), der aus zwei nukleären Rezeptoren und dem Ultraspiracle-Protein (USP) besteht (Zhu et al. 2007).

Bei Säugetieren hingegen ist es bisher nicht gelungen, einen entsprechenden EcR nachzuweisen, obwohl hier eine pharmakologische Wirksamkeit von Ecd besteht. Der genaue Weg der Signaltransduktion ist noch unklar. Es gibt jedoch Hinweise, darauf, dass die Wirkung von Ecd über Stimulation des Retinoid-X-Rezeptors (RXR) ausgelöst wird, welcher das Gegenstück des USP im Säugetierorganismus darstellt (Thomas et al. 1993; Yao et al. 1993).

Sicher jedoch ist, dass Ecd nicht an  $\text{ER}\alpha$  und  $\text{ER}\beta$  und Androgenrezeptoren (AR) von Säugetieren binden kann, obwohl Ecdysteroide und androgen-anabole Steroide ein gemeinsames Grundgerüst besitzen. Dies wurde durch Untersuchungen mittels Radioligandenbestimmung festgestellt (Seidlova-Wuttke et al. 2010b). Ohne die Möglichkeit, an die genannten Rezeptoren zu binden, können Ecdysteroide nicht die unerwünschten Nebenwirkungen auslösen, welche von der klassischen HRT bekannt sind und deren Wirkung über diese Rezeptoren vermittelt wird (Bathori et al. 2008). Diese Eigenschaft macht Ecdyson zu einem interessanten Kandidaten als Alternative zur klassischen Hormonersatztherapie. In Untersuchungen zum Verhältnis zwischen der Struktur und der Aktivität von Ecdysteroiden stellte sich heraus, dass die anabole Aktivität von 20-Hydroxyecdysone 2,7mal höher ist als die von Ecdyson (Bathori et al.

2008). Dementsprechend wurde in dieser Studie die potenteste Verbindung namens 20-Hydroxyecdysen (Ecd) verwendet.

## 1.6 Das Ziel der Studie

Im Laufe der letzten Jahre hat das Ansehen der klassischen HRT, trotz wissenschaftlich dargestellter Effektivität, nachgelassen. Vor allem die Risiken, auf die mehrfach in Studien hingewiesen wurde (Hulley et al. 1998; Rossouw et al. 2002; Beral 2003), sind vermehrt ins öffentliche Bewusstsein gedrungen. Aus diesem Grund lehnt eine Vielzahl von Frauen, die von der HRT profitieren könnten, diese Behandlungsmöglichkeit ab, mit dem Wunsch nach einer risikoärmeren Alternative.

Auf der Suche nach entsprechenden Therapiealternativen zur Behandlung von postmenopausalen Beschwerden und Erkrankungen stellte sich heraus, dass das Ecdysteroid 20-OH-Ecdysen (20-Hydroxyecdysen = Ecdysterone =  $\beta$ -Ecdysen = Ecd) eine knochenprotektive Wirkung hat (Kapur et al. 2008).

Das Ziel dieser Studie ist es festzustellen, ob Ecd im Hinblick auf die Therapie der postmenopausalen Osteoporose eine geeignete Alternative darstellt. Des Weiteren soll diese Arbeit Aufschlüsse im Bezug auf die Dosisfindung und Therapiedauer für eine Behandlung mit Ecd geben.

Um zu evaluieren, ob Ecd einen signifikant osteoprotektiven Effekt hat, wird es mit 17- $\beta$ -Estradiol (E2) verglichen. E2 ist als Bestandteil der klassischen HRT eine etablierte Substanz und wirkt nachgewiesenerweise osteoprotektiv. Zu diesem Zweck wurde Ecd in einem Kurz- sowie einem Langzeitversuch, in unterschiedlichen Dosierungen und Applikationsformen am etablierten Versuchsmodell der ovariectomierten Ratte getestet. Dabei wurden die Futteraufnahme, die Veränderung des Gewichts, aber vor allem der Knochenstoffwechsel und die Knochengeometrie beobachtet.

Um dies zu ermöglichen, wurden bei den Versuchstieren Aufnahmen der Tibiametaphyse mittels der quantitativen Computertomographie (qCT) gemacht, die sich als Goldstandard zur Messung verschiedener Knochenparameter an lebenden Kleintieren erwiesen hat (Helterbrand et al. 1997). Außerdem erfolgte eine Serundiagnostik zur Auswertung spezifischer Parameter des Knochenstoffwechsels.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Die Versuchstiere und ihre Haltungsbedingungen**

Für beide Versuche wurden Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten) verwendet. Es handelte sich dabei um weibliche, intakte, drei Monate alte Tiere, die von der Firma Winkelmann (Borken, Deutschland) bezogen wurden. Die Haltung der Tiere erfolgte in Tierställen der Universitätsklinik Göttingen in Makrolonkäfigen Typ IV (Firma Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg), wobei jeweils sechs Tiere in einem Käfig untergebracht waren.

Bei dem Kurzzeitversuch gab es einen Käfig mit drei und vier Tieren. Leitungswasser und Futter standen zur freien Verfügung. Während der Eingewöhnungsphase und im Kurzzeitversuch erhielten die Versuchstiere sojafreies Pellet-Futter (V 1355 R-Z, Firma ssniff, Soest, Deutschland). Für den Langzeitversuch wurde das sojafreie Pellet-Futter mit den Testsubstanzen angereichert (siehe Tabelle). Um äußere Störfaktoren zu vermeiden, wurden die Lebensbedingungen der Versuchstiere im Hinblick auf Stress, Lärm oder Schwankungen im Hell-Dunkel-Rhythmus kontrolliert. Die Belichtung des Raumes erfolgte von 6.00 bis 18.00 Uhr mit artifiziellm Licht. Die Raumtemperatur lag bei  $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , die Luftfeuchtigkeit betrug 55%. Die Kontrolle dieser Werte erfolgte durch Thermohygrometer.

Die tierexperimentelle Durchführung fand unter der Aufsicht von Dr. med. Dana Seidlova-Wuttke statt. Beide Tierversuche wurden durch die Bezirksregierung Braunschweig genehmigt (Aktenzeichen: 33.425002-082/06).

### **2.2 Der Versuchsablauf des Kurzzeitversuchs**

Die Anlieferung der Versuchstiere erfolgte am 23.03.2007. Dabei handelte es sich um 61 SD-Ratten, die zu Versuchsbeginn drei Monate alt waren und ein Ausgangsgewicht von  $230\text{g} \pm 27\text{g}$  hatten. Die Tiere wurden in fünf Gruppen aufgeteilt, wobei jeweils sechs Ratten gemeinsam in einem Käfig gehalten wurden.

Nach einer fünftägigen Eingewöhnungsphase wurde bei allen Versuchstieren eine computertomographische (qCT) Messung der Tibiametaphyse vorgenommen, um die Knochendichte beurteilen zu können. Die Tiere wurden hierbei noch unter der Narkose mit Isofluran (Forene, Abbott-AG, Baar, Schweiz), die für die qCT Messung

nötig war, mit einem ISO-Transponder 12 mm (UNO MICRO-ID System) versehen. Die Applikation des Transponders erfolgte subkutan im Nacken. Dadurch wurde jedes Tier mit einer individuellen Identifikationsnummer versehen, was es ermöglichte, jedes Tier im folgenden Versuchsablauf eindeutig mit einem ISO-kompatiblen Lesegerät (Gesreader II Ge S008, Transponder und Lesegerät von der Firma UNO ROEVSTAAL BV, Zereenaar, Holland) zu identifizieren.

Zwei Wochen nach Ankunft wurden die Versuchstiere ovariectomiert (ovx), um die endogene Östrogenproduktion auszuschalten. Bei der Ovariectomie wurde jedes Tier gewogen und im Bezug auf das Körpergewicht randomisiert. Dadurch hatten alle zehn Versuchsgruppen ein Durchschnittsgewicht von 237g. Körpergewicht und Futterverbrauch wurden ab der Anlieferung einmal pro Woche mit einer Waage (basic lite BL 3, Firma Sartorius, Deutschland) gemessen.

Die gelieferte Testsubstanz (Produktname  $\beta$ -Ecdysone mit >97% 20-Hydroxyecdysterone von Changzhou Dahua Imp. And Exp. Corp. Ltd., China) wurde auf Reinheit getestet (HPLC Analyse, Frau M. Metten, Dep. für Endokrinologie, Universität Göttingen). Unmittelbar nach der Ovx wurde mit dem vierwöchigen Applikationsintervall begonnen. Die tägliche Applikation erfolgte subkutan (s.c.) kranial des M. gluteus maximus zwischen 8.00 Uhr und 10.30 Uhr. Dabei wurde den Tieren Ecd in drei unterschiedlichen Konzentrationen und 17- $\beta$ -Östradiol (E2) appliziert. Für die Lösungsansätze von Ecd und E2 wurde jeweils eine negative Kontrolle mit sechs Tieren mitgeführt, die den entsprechenden Lösungsansatz ohne Testsubstanz erhielt.

Käfig	applizierte Substanz pro Tier (pro 100g KG)	Behandlung	Versuchsgruppe	Anzahl der Tiere
1	0,2 ml 2% Cremophor	Ovx	KO (negative Kontrolle von E2)	6
2	0,2 ml NaCl	Ovx	KO (negative Kontrolle von Ecd)	6
3	0,2 ml mit 1 $\mu$ g (0,4 $\mu$ g] E2	Ovx	E2	6
4	0,2 ml mit 1 $\mu$ g (0,4 $\mu$ g) E2	Ovx	E2	6
5	0,2 ml mit 2 mg (0,7 mg) Ecd	Ovx	Ecd 2	6
6	0,2 ml mit 2 mg (0,7mg) Ecd	Ovx	Ecd 2	6
7	0,5 ml mit 10 mg (3,7 mg) Ecd	Ovx	Ecd 10	6
8	0,5 ml mit 10 mg (3,7 mg) Ecd	Ovx	Ecd 10	6
9	0,5 ml mit 25 mg (9,1 mg) Ecd	Ovx	Ecd 25	6
10	0,5 ml mit 25 mg (9,1 mg) Ecd	Ovx	Ecd 25	4
11	0,5 ml mit 25 mg (9,1 mg) Ecd	Ovx	Ecd 25	3

**Tab. 3:** Gruppenübersicht des Kurzzeitversuchs

### 2.3 Der Versuchsablauf des Langzeitversuchs

Die Anlieferung der Versuchstiere erfolgte am 05.06.2007. Dabei handelte es sich um 80 weibliche, drei Monate alte SD-Ratten. Nach Eintreffen befanden sich die Tiere bis zum 02.07.2007 in der Eingewöhnungsphase. Wie beim Kurzzeitversuch wurden die Tiere in dieser Zeitspanne mit sojafreien Pellets gefüttert (Zusammensetzung etc. siehe KZV und Tabelle). Nach der Eingewöhnungsphase von fünf Tagen erfolgte bei allen Tieren die computertomographische Messung der Tibiametaphyse.

Wie beim Kurzzeitversuch wurden die Tiere hier markiert, gewogen und in Hinsicht auf ihr Körpergewicht randomisiert. Die Aufteilung der Versuchstierpopulation erfolgte in fünf Gruppen, wobei eine Gruppe aus jeweils zwölf Tieren bestand. Davon wurden jeweils sechs Tiere in einem Käfig gehalten. Das Durchschnittsgewicht aller Gruppen lag zu Versuchsbeginn bei  $250\text{g} \pm 13\text{g}$ . Im Anschluss an die Ovariectomie (Ovx) begann das dreimonatige Futterintervall, innerhalb dessen den Tieren die vorgesehene Testsubstanz mit dem Pellet-Futter zugeführt wurde. Je nach Versuchsgruppe war das Futter mit Ecd oder Estradiol-17 $\beta$ -Benzoat in unterschiedlichen Konzentrationen angereichert worden (Nr. E-9000, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Die Kontrolle der aufgenommenen Testsubstanzdosis erfolgte durch Berechnung des Futtermittelsverbrauchs. Dazu wurde zweimal pro Woche das Gewicht der aufgenommenen Futtermenge ermittelt, woraus sich der Durchschnittswert für eine Woche ergab. Aus diesen Werten wurde die durchschnittliche Futtermenge errechnet, die pro Tag aufgenommen wurde. Während der Eingewöhnungsphase, die vor dem eigentlichen Versuch stattfand, lag die tägliche Futtermenge bei  $17\text{g} \pm 3\text{g}$  pro Tier.

Gruppe	Testsubstanz	Behandlung	Testsubstanz [g/ Kg Futter]	Aufnahme an Testsubstanz (mg/ 100g KG/d)[mg/ Tier /d]
KO	Keine	Ovx		
intakt	Keine	Intakt		
E2	E2B	Ovx	10 mg/ Kg	(0,06mg) [0,16 mg]
Ecd 6	Ecd	Ovx	1 g/ Kg	(6 mg) [17,8 mg]
Ecd 17	Ecd	Ovx	3 g/ Kg	(17 mg) [56,2 mg]
Ecd 36	Ecd	Ovx	6 g/ Kg	(36 mg) [118,3 mg]

**Tab. 4:** Gruppenübersicht des Langzeitversuchs

Diese verringerte sich direkt nach Ovx um ca. 2g, stabilisierte sich dann aber wieder auf das Ausgangsniveau im weiteren Verlauf. Zur Berechnung der täglich aufgenommenen Testsubstanz diente die durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier im gesamten Versuchszeitraum von zwölf Wochen.

#### **2.4 Die Ovarektomie (Ovx)**

Bei allen Versuchstieren erfolgte eine Entfernung der Ovarien unter Inhalationsnarkose. Bei dem verwendeten Narkosegas handelte es sich um ein Luft-Isofluran-Gemisch (Forene, Abbott-AG, Baar, Schweiz) von 0,4L/min und 0,2L/min reinem Sauerstoff. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit einem Isofluranteil der Luft von 5-Vol%, was zur Narkoseerhaltung auf 3,5-Vol% reduziert wurde. Zur Analgesie wurde den Tieren direkt nach der Narkoseeinleitung 0,2 ml Rimadyl-Lösung subkutan injiziert (Rimadyl® gelöst in NaCl im Verhältnis 1:10, Wirkstoff Carprofen).

Die Ratten wurden beidseits am lateralen Abdomen rasiert. In diesem Bereich erfolgte ca. 1,7 cm unterhalb des Rippenbogens die Inzision der Haut sowie die schichtweise Durchtrennung von Muskulatur und Peritoneum zur Eröffnung des Cavum abdominis. Nach Darstellung von Uterus und Ovar wurden Letztere mit einer Pean-Klemme gefasst und nach Unterbindung entfernt. Die Blutungsfreiheit wurde sichergestellt und der Uterus ins Cavum uteri reponiert. Der Verschluss von Muskulatur und Peritoneum erfolgte durch eine Naht (Catgut 3 metric, Firma Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Die Haut wurde durch Klammern (Michael-Klammern®, Firma Martin, Tuttlingen, Deutschland) verschlossen.

#### **2.5 Der Versuchsabschluss**

Im Anschluss an die 4-wöchige bzw. 3-monatige Testreihe erfolgte jeweils eine zweite qCT (CT2) der Tibiametaphyse. Einen Tag nach CT2, zwischen 8.30 Uhr und 12.00 Uhr, wurden die Tiere unter Ethernarkose dekapitiert. Darauf folgte die Obduktion und Entnahme studienrelevanter Organe. Das Blut wurde in Serumröhrchen übertragen, zentrifugiert (3000xg, 10 Min.) und anschließend zur weiteren Analyse bei -20°C aufbewahrt. Die Organe wurden in Eppendorfcups (Firma

Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt, sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und zur weiteren Verarbeitung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

## 2.6 Die quantitative Computertomographie (qCT)

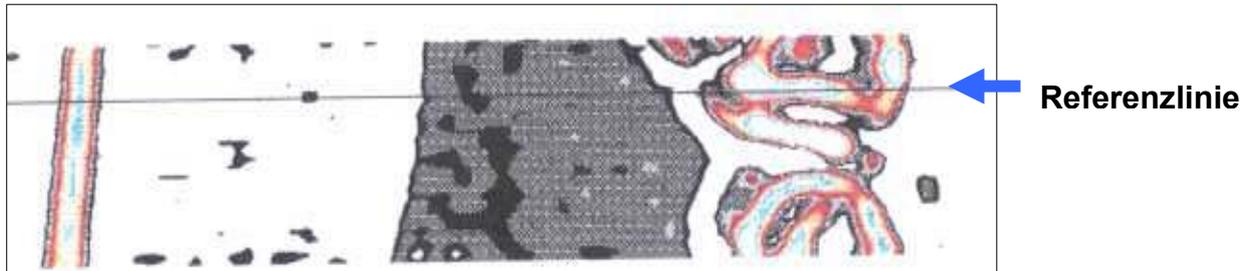
Die Messungen der Tibiametaphyse wurden mit Hilfe eines pCT-Gerätes (XCT Research SA, Firma Stratec, Pforzheim, Deutschland) durchgeführt, das speziell für Kleintiere entwickelt wurde und zugelassen ist.

Die qCT ist zurzeit eine der etabliertesten Methoden, um Knochendichteveränderungen an lebenden Kleintieren darzustellen (Helterbrand et al. 1997). Nach ovx kommt es vor allem im Bereich der Tibiametaphyse innerhalb von drei Monaten zu einem ausgeprägten Verlust der Knochensubstanz von bis zu 50% und mehr (Garner et al. 1991; Seidlova-Wuttke et al. 2003a/b, 2008b, 2010b; Perry et al. 2005). Die Methode der Wahl, um den Verlust von Knochensubstanz differenziert untersuchen zu können, ist die qCT. Dementsprechend wird dieses Verfahren von uns und vielen anderen Forschungsgruppen verwendet, um den östrogenartigen Effekt einer Testsubstanz anhand von verschiedenen Knochenparametern beurteilen zu können (Seidlova-Wuttke et al. 2003a/b, 2008a/b, 2010b; Sheng et al. 2007; Wei et al. 2007; Coelingh Bennink et al. 2008).

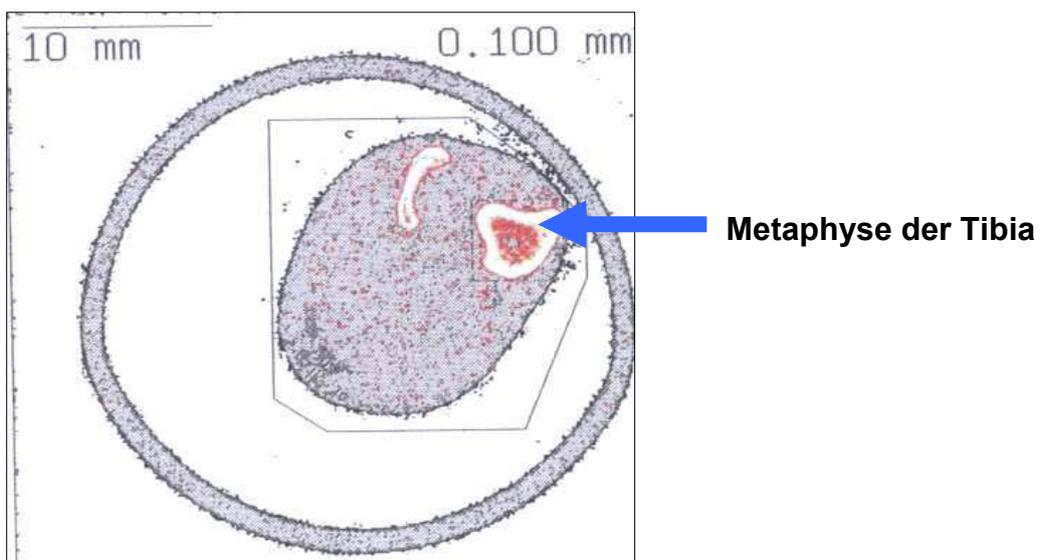
Das Messprinzip der qCT basiert auf einer gefilterten Rückprojektion, wobei zunächst ein Absorptionsprofil mittels der vom Untersuchungsobjekt absorbierten Röntgenstrahlen erstellt und im Anschluss korrigiert wird. Durch Verknüpfung vieler Absorptionsprofile aus unterschiedlichen Winkeln werden Querschnittsbilder errechnet, die dem Messobjekt entsprechen. Vor der eigentlichen Messung wird ein Übersichtsscan (SV-Scan) durchgeführt. Hierbei erfolgt die Festlegung des Messortes, welcher mittels Festlegung einer Referenzlinie durch die Epiphysenfuge konkretisiert wird. Der zu messende Bereich wird in Schichten von 1mm Dicke abgescannt, wobei der Messstrahl quer durch das Objekt hindurch geht. Bei der CT-Messung erfolgt eine Vermessung des Objekts in einem Winkelbereich von  $180^{\circ}$ , wobei nach jedem Linearscan das Messsystem um  $12^{\circ}$  gedreht wird. Nach 15 CT-Scanpositionen stehen 180 Winkelschnitte zur Bildauswertung zur Verfügung. Mittels der geräteeigenen Software (XCT 5.40, Firma Stratec, Norland Medizintechnik GmbH, Pforzheim, Deutschland) entsteht am Computer ein farblich kodiertes, digitales Rasterbild. Das Programm differenziert zuerst Knochen (hell) und

Weichteilgewebe (dunkel), wobei als Grenzwert eine Knochendichte von  $280 \text{ mg/cm}^3$  festgelegt ist. Im nächsten Schritt wird der Knochen in Spongiosa und Kortikalis mit einem Grenzwert von  $400 \text{ mg/cm}^3$  unterteilt. Danach ist es möglich, diverse Parameter des Knochens und des umliegenden Gewebes zu bestimmen.

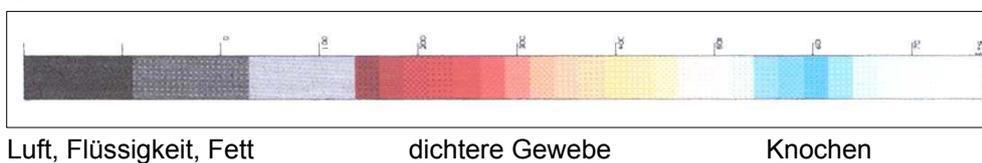
**A**



**B**



**C**



**Abb. 5:**

- A)** Darstellung des Übersichtsscans zur Kontrolle und Justierung der Referenzlinie.
- B)** Beispiel für einen Querschnittsscan zur Beurteilung der Knochendichte.
- C)** Farbliche Codierung zur visuellen Differenzierung der Dichteunterschiede

## 2.7 Der Messvorgang

Um eine störungsfreie Messung zu gewährleisten, die durch Bewegungen der Tiere beeinträchtigt hätte werden können, mussten die Versuchstiere für den Zeitraum der qCT narkotisiert werden. Hierzu wurde eine Inhalationsnarkose mit Isofluran (Forene, Abbott-AG, Baar, Schweiz) verwendet. Das Narkosegas setzte sich aus 0,2% Luft und 0,2% reinem Sauerstoff zusammen, wobei der Isoflurananteil der Luft zur Narkoseeinleitung 5% und zur Narkoseerhaltung 3,5% betrug. Zur Messung der linken Tibia wurden die Tiere in Rechtsseitenlage in einer speziellen Halterung fixiert. Hierbei wurde die linke Extremität in einen Trichter eingespannt und an dessen Ende befestigt. Eine Messung dauerte ca. acht Minuten und die durchschnittliche Narkosedauer lag bei ca. zwölf Minuten. Nach Beendigung der Messung und Narkose wurden die Tiere für die Aufwachphase in einem separaten Käfig untergebracht und standen unter ständiger Beobachtung.

## 2.8 Die statistische Auswertung

Die Berechnung der Werte für die Statistik wurde mit Hilfe des Programms GraphPad PRISM™ vorgenommen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels „ANOVA“, einer Anwendung zur Varianzanalyse für wiederholte Messungen eines Faktors, und in einem anschließenden multiplen t-Test nach Dunnett. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwerte (Means)  $\pm$  Standardabweichung.

## 2.9 Die Serumanalyse

Am Ende beider Versuchsreihen wurde das Blut der Tiere durch Dekapitation gewonnen, aus dem diverse Blutparameter bestimmt wurden. Zu Versuchsbeginn stand kein Blut zur Verfügung, dementsprechend beziehen sich alle gemessenen Serumparameter auf die der Kontrolltiere. Zur Erhebung der Osteokalzin-Werte wurde das Elecsys-System (Firma Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Zur Ermittlung der Cross-(Rat-)Laps wurde ein Elisa (Osteometer, Bio Tech AIS, Dänemark) benutzt. Die Bestimmung der verschiedenen Blutparameter wurde durch das technische Personal der Abteilung vorgenommen.

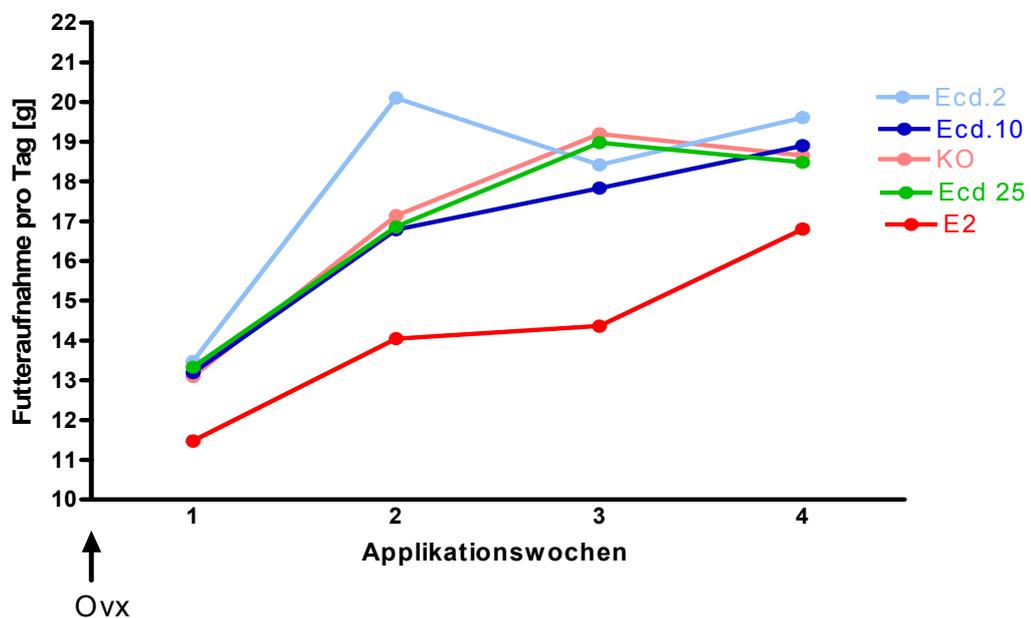
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Die Futteraufnahme

Die Ermittlung der Futteraufnahme erfolgte während des Kurzzeitversuchs einmal pro Woche und beim Langzeitversuch zweimal wöchentlich. Dazu wurde der Futterverbrauch aller Tiere eines Käfigs pro Woche gemessen. Mit Hilfe dieses Wertes erfolgte für jede Versuchsgruppe die Berechnung der durchschnittlichen Futtermenge, die von einem Tier pro Tag [g / Tier/ d] aufgenommen wurde.

##### 3.1.1 Die Futteraufnahme im Kurzzeitversuch

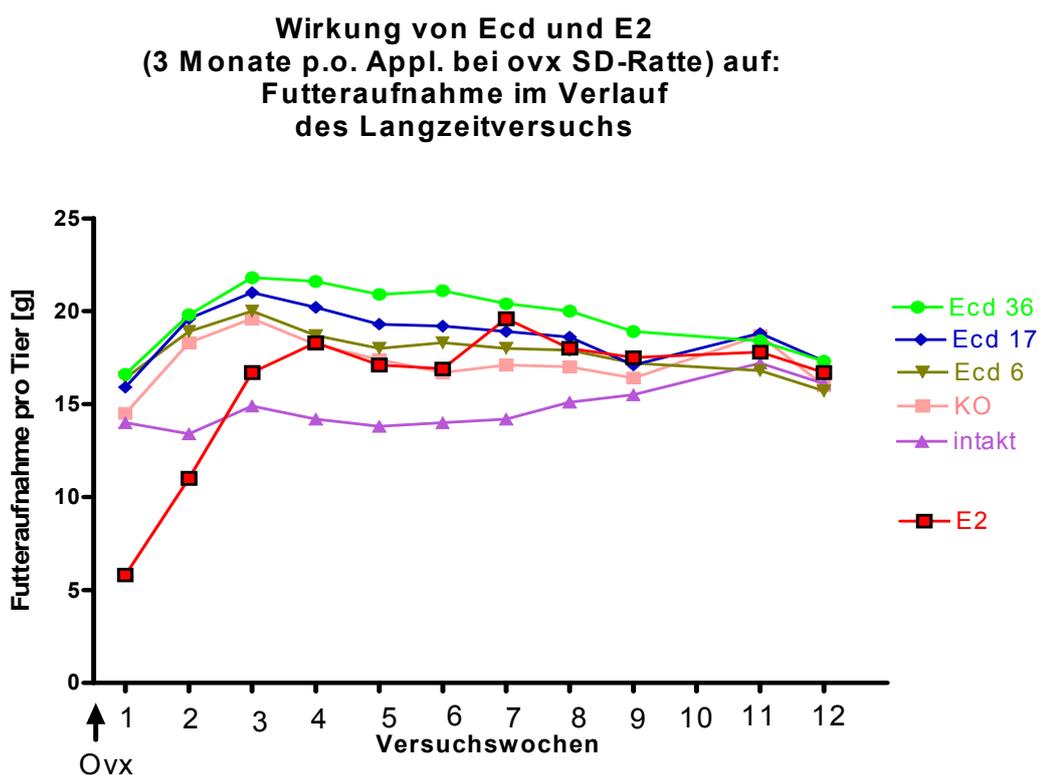
**Wirkung von Ecd und E2  
(4 Wochen s.c. Appl. bei ovx SD-Ratte) auf:  
Futteraufnahme im Verlauf des Kurzzeitversuchs**



**Abb. 6:** Durchschnittliche Futteraufnahme der jeweiligen Behandlungsgruppen [g/ Tier/ d], welche wöchentlich für jeden Käfig dokumentiert wurde. Daraus wurde in jeder Versuchsgruppe die durchschnittliche Futteraufnahme eines Tieres pro Tag errechnet.

Die mit Ecd behandelten Gruppen sowie die ovariectomierte Kontrollgruppe (KO) hatten eine durchschnittliche Futteraufnahme von  $17,5 \pm 0,5$  g/Tier/d bei tendenziell einheitlichem Verlauf. Die mit E2 behandelte Gruppe hatte schon nach einer Woche einen geringeren Futterverbrauch als die anderen Gruppen, wobei der Futterverbrauch der E2-Gruppe bei 14 g/Tier/d lag. Dementsprechend hatten die Ecd-Gruppen und die KO-Gruppe (mit 3,5 g) eine durchschnittlich höhere Futteraufnahme als die E2-Gruppe. Im vierwöchigen Versuchsverlauf zeigte sich, dass alle Gruppen ihren Futterverbrauch steigerten. Die Ecd-Gruppen und die KO-Gruppe erhöhten ihre durchschnittliche Futteraufnahme auf bis zu 19,6 g/Tier/d, die E2-Gruppe auf 17 g/Tier/d.

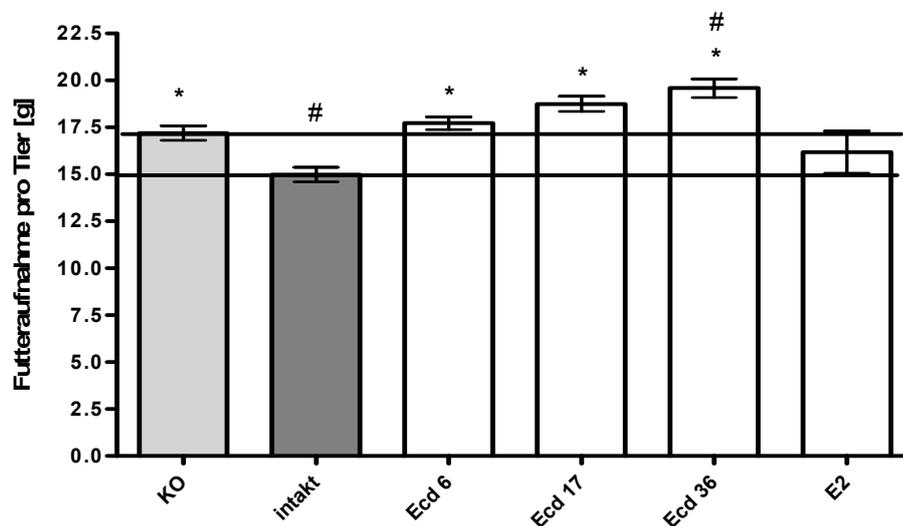
### 3.1.2 Die Futteraufnahme im Langzeitversuch



**Abb. 7:** Durchschnittliche Futteraufnahme eines Tieres pro Tag in den jeweiligen Behandlungsgruppen [g/ Tier/ d], welche zweimal wöchentlich für jeden Käfig dokumentiert wurde. Daraus wurde in jeder Versuchsgruppe die durchschnittliche Futteraufnahme eines Tieres pro Tag errechnet.

Beim Langzeitversuch gab es zusätzlich zur ovariectomierten Kontrollgruppe (KO) noch eine intakte Kontrollgruppe („intakt“), mit der die einzelnen Behandlungsgruppen verglichen wurden. Im Verlauf dieser Versuchsreihe näherten sich alle Gruppen einem durchschnittlichen Futterverbrauch von 16 – 17,3 g/Tier/d an. Die höchste Futteraufnahme, ermittelt über den ganzen Versuchszeitraum, hatte die Ecd-36-Gruppe mit durchschnittlich 20 g/Tier/d. Danach folgten Ecd 17, Ecd 6, KO und „intakt“, die mit durchschnittlich 15 g/Tier/d den geringsten Futterverbrauch hatte. Die E2-Gruppe hatte unmittelbar nach OvX einen wesentlich geringeren Futterverbrauch, der sich aber im Versuchsverlauf den anderen Gruppen annäherte. Verglichen mit der KO-Gruppe wies die Ecd-36-Gruppe einen signifikant höheren und die „intakt“-Gruppe einen signifikant niedrigeren Futterverbrauch auf. Des Weiteren hatten alle Gruppen die mit Ecd behandelt wurden, eine signifikant höhere Futteraufnahme als die „intakt“-Gruppe.

**Die Wirkung von Ecd und E2  
(3 Monate p.o. Appl. bei ovx SD-Ratte) auf:  
Aufgenommene Futtermenge pro Tag  
im Langzeitversuch**

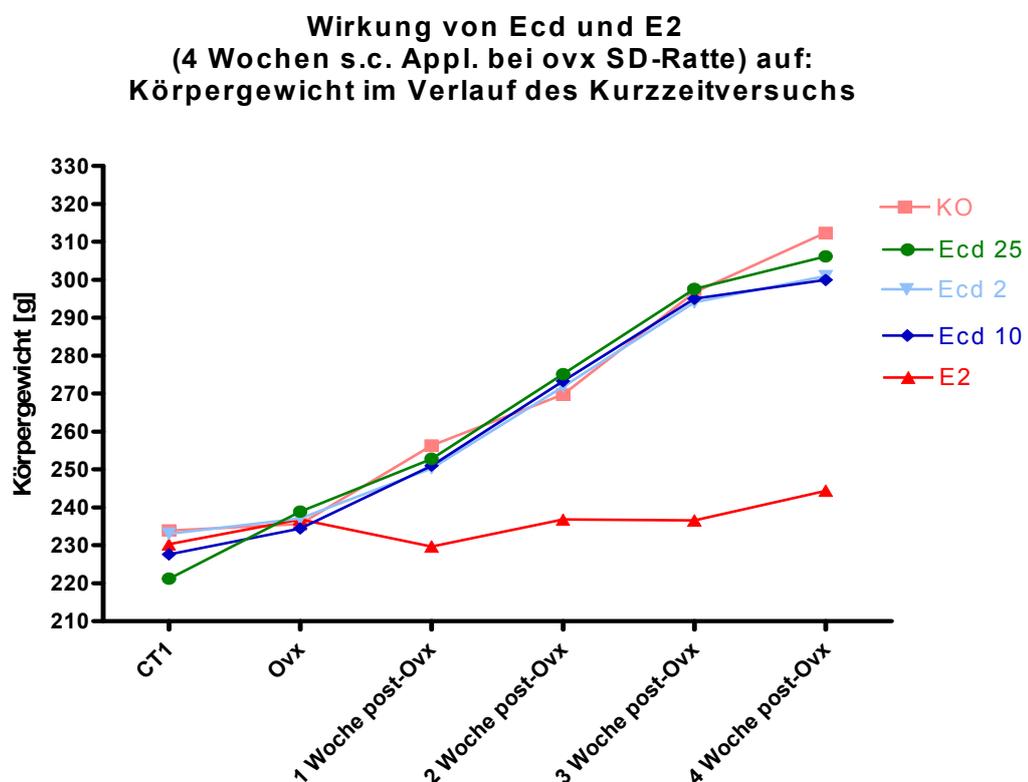


**Abb. 8:** Darstellung der aufgenommenen Futtermenge in Gramm. Die Werte beziehen sich auf die durchschnittliche Futtermenge, die eine Ratte an einem Tag konsumiert hat (errechnet über 12 Versuchswochen). Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau: #= $p < 0,05$  versus KO; \*= $p < 0,05$  versus intakt).

## 3.2 Das Körpergewicht

Vor dem Beginn beider Versuchsreihen wurden die Tiere im Bezug auf ihr Gewicht randomisiert, damit das Körpergewicht der jeweiligen Gruppen dem Durchschnitt aller Tiere entsprach.

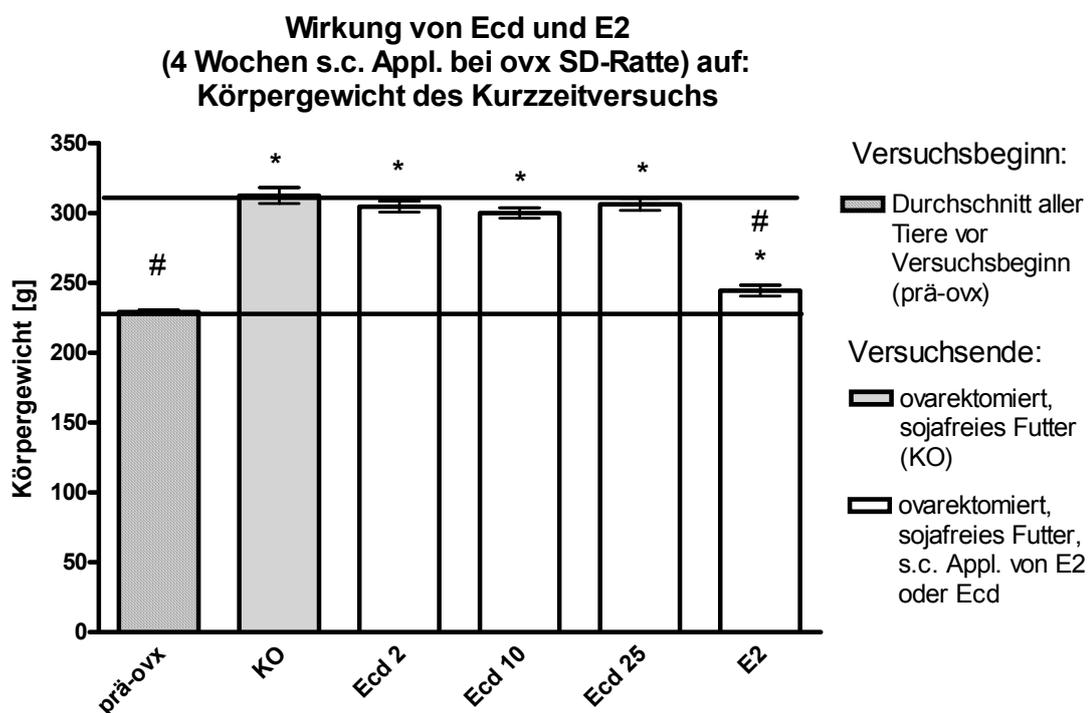
### 3.2.1 Das Körpergewicht im Kurzzeitversuch



**Abb. 9:** Gewichtsverlauf der unterschiedlichen Versuchsgruppen über den gesamten Versuchszeitraum. Der Versuchsbeginn ist mit Ovx auf der x-Achse angezeigt. Das Körpergewicht jeder Gruppe ist als linearer Graph dargestellt. Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau:  $\#p < 0,05$  versus KO).

Am Anfang dieser Versuchsreihe lag das durchschnittliche Körpergewicht aller Tiere bei 229 g. Nach 4-wöchiger Applikation der Testsubstanzen hatten alle Versuchsgruppen, mit Ausnahme der E2-Gruppe, ihr Körpergewicht signifikant gegenüber ihrem durchschnittlichen Ausgangsgewicht erhöht. Die höchste

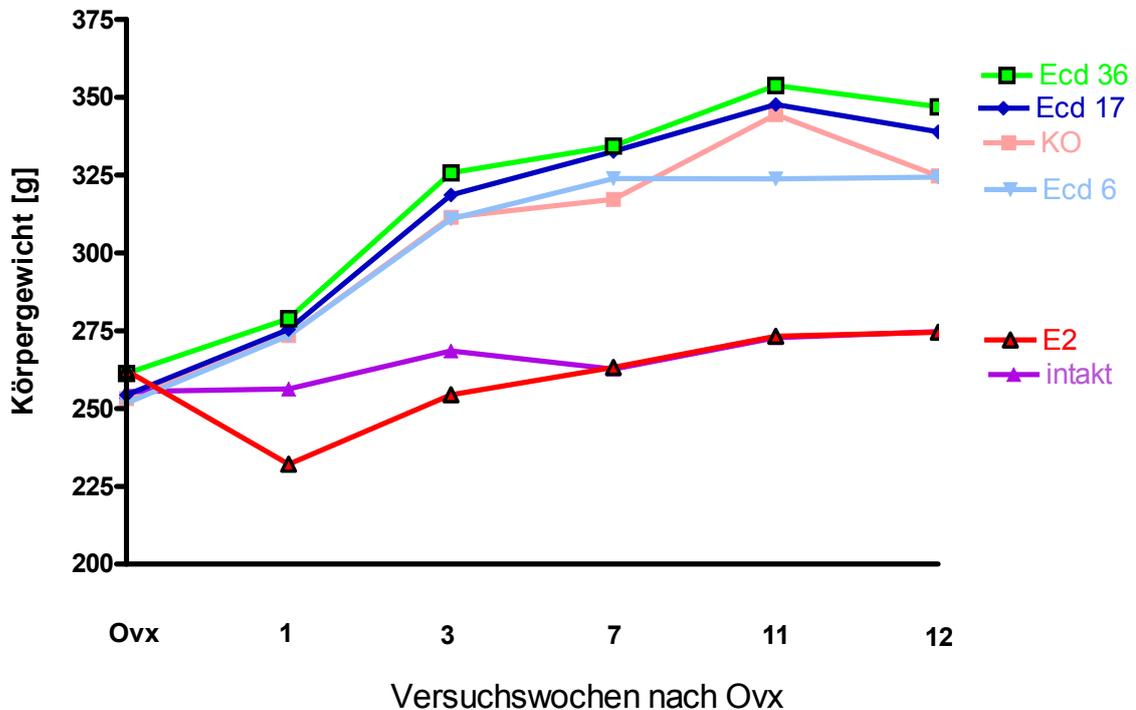
Gewichtszunahme hatte die KO-Gruppe mit einem Körpergewicht von 312 g im Durchschnitt, was 134 % des Ausgangsgewichtes entspricht. Die niedrigste Zunahme des Körpergewichts wies die E2-Gruppe auf, deren Gewicht am Ende der Versuchsreihe 244 g betrug und sich mit einer durchschnittlichen Steigerung von 6 % kaum verändert hatte. Verglichen mit der KO-Gruppe war die ausbleibende Körpergewichtszunahme der E2-Gruppe bereits nach der ersten Versuchswoche und allen weiteren Gewichtsbestimmungen signifikant niedriger. Mit einer durchschnittlichen Gewichtszunahme von 7,5 g unterschied sich das Körpergewicht der E2-Gruppe am Ende des Versuchs nur unwesentlich vom durchschnittlichen Gewicht aller Tiere zu Versuchsanfang. Die Ecd-Gruppen und die KO-Gruppe wiesen ein ähnliches Verhalten bei Körpergewichtszunahme auf: eine Steigerung des Körpergewichtes von ca. 77 g. Die mit Ecd behandelten Versuchsgruppen erreichten ein Körpergewicht von 300 – 306 g unabhängig von der applizierten Ecd-Konzentration.



**Abb. 10:** Mittelwerte des Körpergewichtes der einzelnen Versuchsgruppen in Gramm [g]. Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau: #p<0,05 versus prä-ovx; \*p<0,05 versus KO).

### 3.2.2 Das Körpergewicht im Langzeitversuch

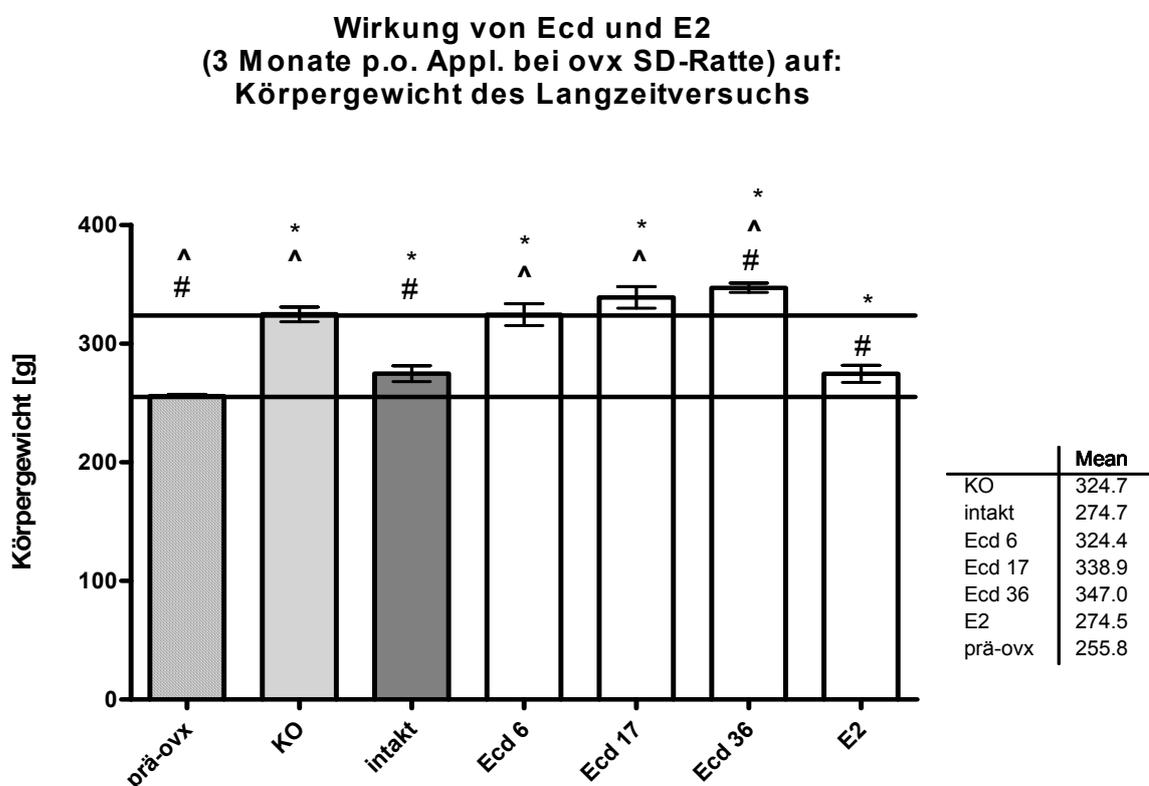
#### Wirkung von Ecd und E2 (3 Monate p.o. Appl. bei ovx SD-Ratte) auf: Körpergewicht im Verlauf des Langzeitversuchs



**Abb. 11:** Verhalten des Körpergewichtes der einzelnen Versuchsgruppen über den gesamten Versuchsverlauf. Die einzelnen Versuchsgruppen sind jeweils als lineare Graphen dargestellt. Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau:  $\# = p < 0,05$  versus KO).

Innerhalb dieser Versuchsreihe steigerten alle Gruppen signifikant ihr Körpergewicht gegenüber dem durchschnittlichen Ausgangsgewicht aller Tiere vor Behandlungsbeginn (prä-ovx). Die höchste Gewichtssteigerung war bei der Ecd-36-Gruppe ersichtlich, mit einem Körpergewicht von 347 g bei Versuchsende. Damit war diese Gewichtszunahme signifikant höher als bei der KO-Gruppe. Die niedrigste Steigerung des Körpergewichts wiesen die Gruppen „intakt“ und E2 auf. Deren Gewicht lag am Ende der Versuchsreihe bei 275 g und war damit signifikant niedriger als das Gewicht der KO-Gruppe. Bis auf die Gruppe E2 hatten alle anderen Versuchsgruppen am Ende der Testreihe ein signifikant höheres Körpergewicht als die Gruppe „intakt“. Bei allen Messungen nach Ovx lag das Körpergewicht der E2-Gruppe signifikant unter dem der KO-Gruppe, wobei das durchschnittliche Gewicht

dieser Gruppe zum Zeitpunkt der Ovx bei 262 g lag. Bei einer durchschnittlichen Steigerung von 12,5 g auf 275,5 g zu Versuchsende hatte sich das Gewicht dieser Gruppe, verglichen mit dem Ausgangsgewicht, nur unwesentlich verändert. Die Körpergewichtssteigerung der Ecd-Gruppen und der KO-Gruppe verhielten sich ähnlich, was auch schon im Kurzzeitversuch zu beobachten war. So kam es bei diesen Gruppen zu einer durchschnittlichen Körpergewichtszunahme von 71,5 g auf durchschnittlich 325 g.



**Abb. 12:** Körpergewicht der einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsende. Ebenfalls dargestellt ist das Durchschnittsgewicht aller Tiere zu Versuchsbeginn am Tag der Ovariectomie (prä-ovx). Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau: #= $p < 0,05$  versus KO, ^= $p < 0,05$  versus intakt und \*= $p < 0,05$  versus prä-ovx).

### 3.3 Die Ergebnisse der quantitativen Computertomographie (qCT)

Um die Auswirkung von Ecd auf die Knochen der Versuchstiere untersuchen zu können, wurde zu Beginn und am Ende beider Versuchsreihen eine Messung mittels qCT durchgeführt. Diese Methode ermöglicht die Quantifizierung von Oberfläche und Dichte der kortikalen und trabekulären Knochenanteile im Bereich der proximalen Tibiametaphyse, die in ausgeprägtem Maße der Regulation durch Östrogene unterliegen (Seidlova-Wuttke et al. 2003a/b; Hertrampf et al. 2006).

Die Spongiosa ist innerhalb des endostealen Areals lokalisiert und besteht aus Trabekeln, Knochenmark und Fettzellen, wobei die Trabekel die essentielle Struktur für die Stabilität des Knochens darstellen. Die Kortikalis bildet den Knochenmantel, der die Spongiosa umschließt. Innerhalb dieser Studie wurden drei spezifische Knochenparameter mit Hilfe der qCT ermittelt und ausgewertet:

#### 1. Die endosteale Dichte (ED):

Hierbei handelt es sich um die Dichte des Trabekelgeflechtes innerhalb des endostealen Raumes (Spongiosa) angegeben in  $\text{mg}/\text{cm}^3$ .

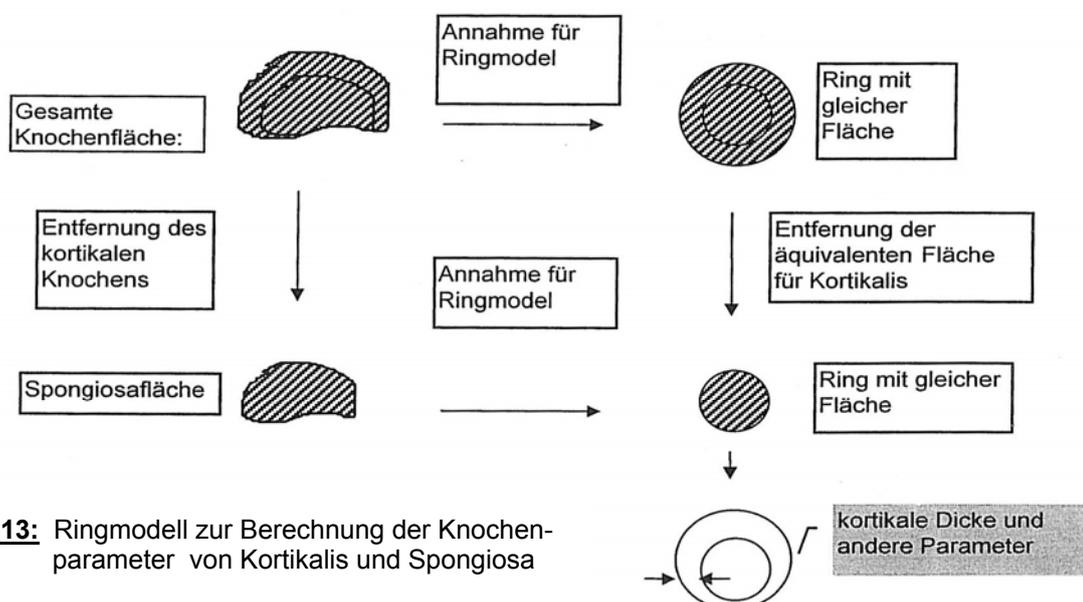
#### 2. Die intraosteale Fläche (IF):

Dies bezeichnet die Querschnittsfläche des endostealen von Kortikalis umschlossenen Raumes (Spongiosa) angegeben in  $\text{mm}^2$ .

#### 3. Die kortikale Dichte (KD):

Es handelt sich hierbei um die Dichte der Kortikalis, also die des Spongiosa umschließenden Knochenmantels, angegeben in  $\text{mg}/\text{cm}^3$ .

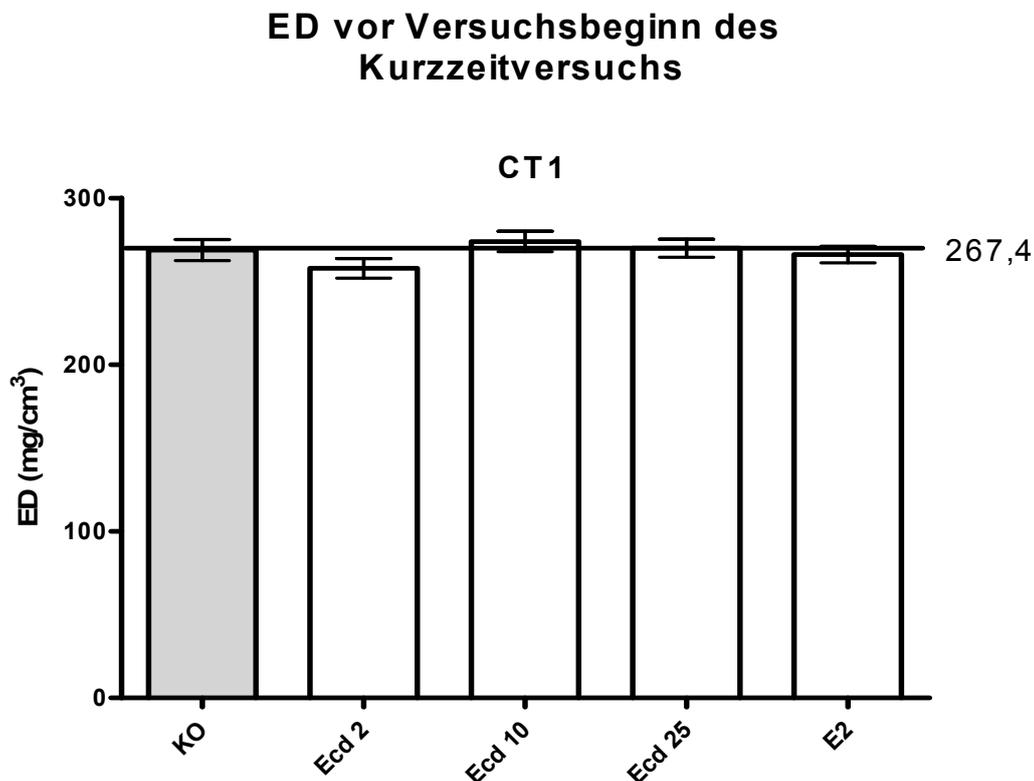
#### Ringmodell:



**Abb. 13:** Ringmodell zur Berechnung der Knochenparameter von Kortikalis und Spongiosa

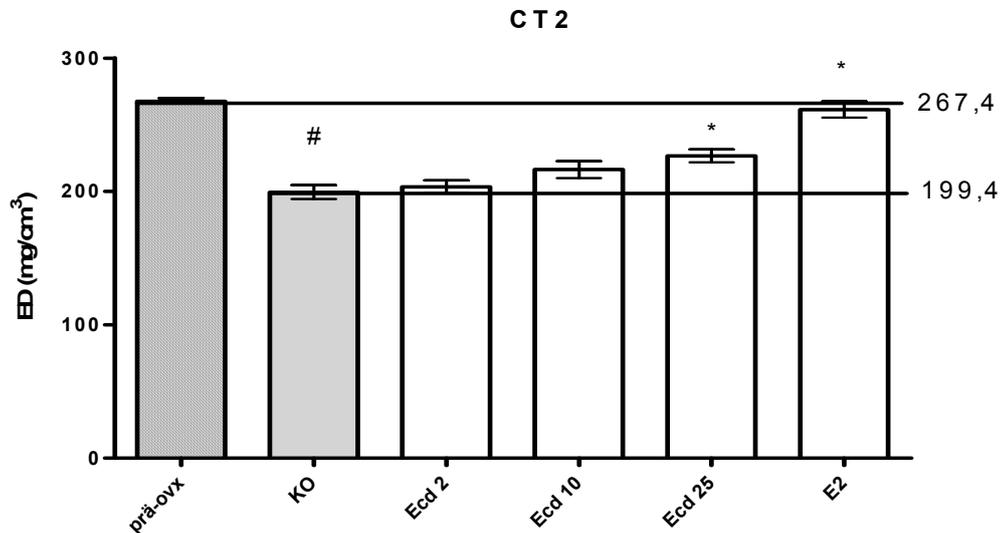
### 3.3.1 Die endosteale Dichte (ED) im Kurzzeitversuch

Die durchschnittliche ED aller Versuchsgruppen (prä-ovx) lag vor Applikation der Testsubstanzen bei 267,4 mg/cm<sup>3</sup>. Nach 4-wöchiger Applikation lag die ED der Kontrollgruppe bei 199,4 mg/cm<sup>3</sup>. Alle Gruppen verloren an durchschnittlicher ED. Den höchsten Verlust hatte, wie zu erwarten, die KO-Gruppe (-28 %) und den niedrigsten die E2-Gruppe (-2 %). Auch in den niedriger dosierten Gruppen Ecd 2 und Ecd 10 wurde der Abbau der ED verringert, aber nur in geringfügigem Ausmaß. Die Gruppen E2 (-2 %) und Ecd 25 (-17 %) hatten im Vergleich zur KO-Gruppe einen signifikant niedrigeren Abbau der ED. Dementsprechend wurde vor allem in der Gruppe E2 und Ecd 25 der Abbau von ED in signifikantem Maß verhindert.



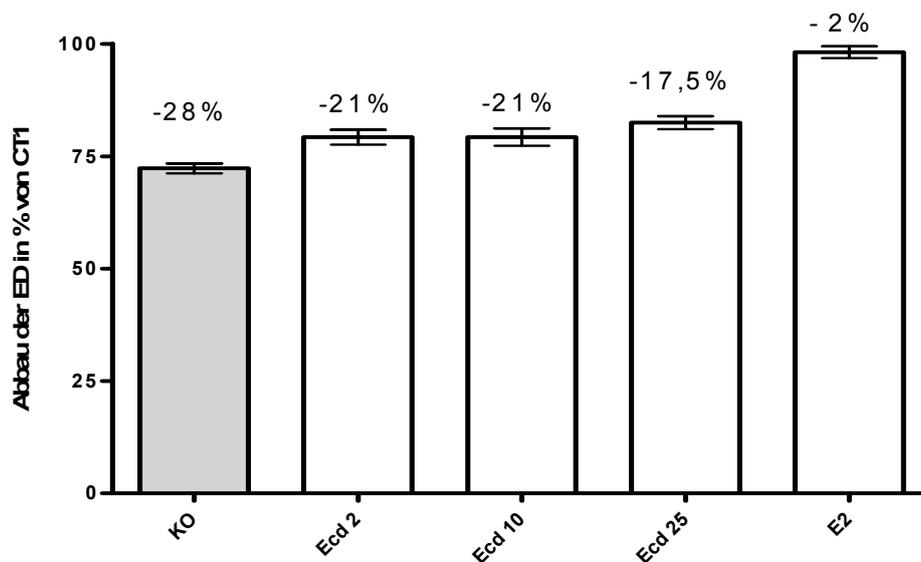
**Abb. 14:** Durchschnittliche endosteale Dichte (ED) der einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsbeginn. Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlusstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau: \*= $p < 0,05$  versus KO).

**Wirkung von Ecd und E2  
(4 Wochen s.c. Appl. bei ovx SD-Ratten) auf:  
ED im Kurzzeitversuch**



**Abb. 15:** Durchschnittliche endostale Dichte (ED) der einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsende nach 4 Wochen. Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau: \*=p<0,05 versus KO, #=p<0,05 versus prä-ovx).

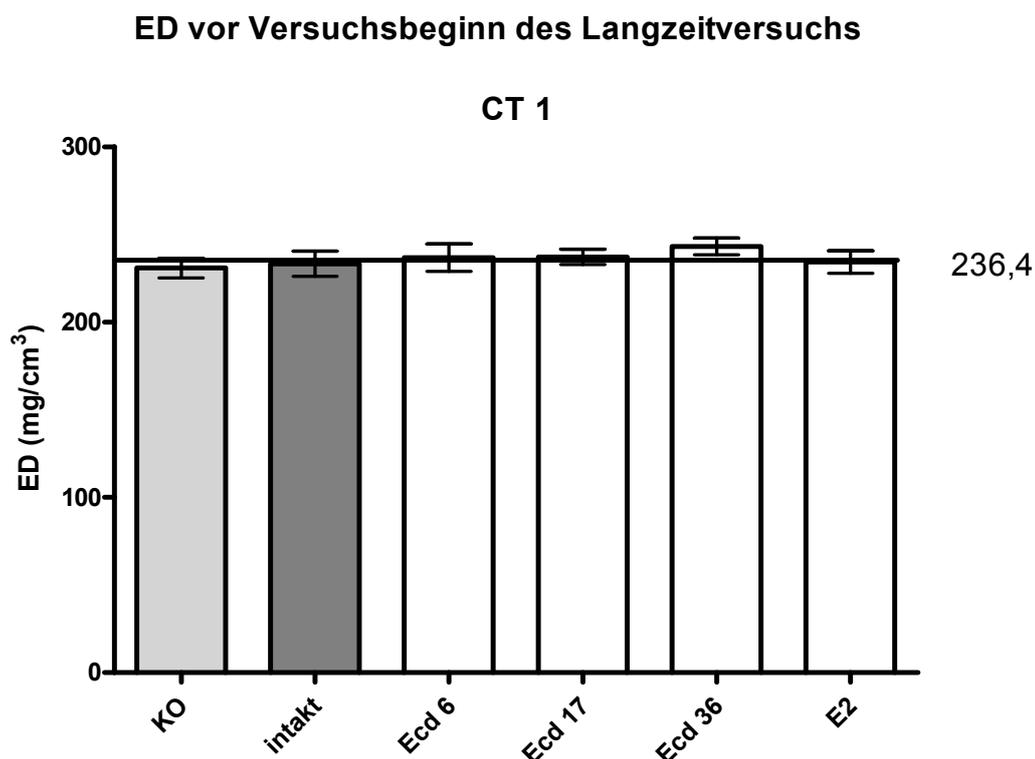
**Wirkung von Ecd und E2  
(4 Wochen s.c. Appl. bei ovx SD-Ratten) auf:  
ED in % im Kurzzeitversuch**



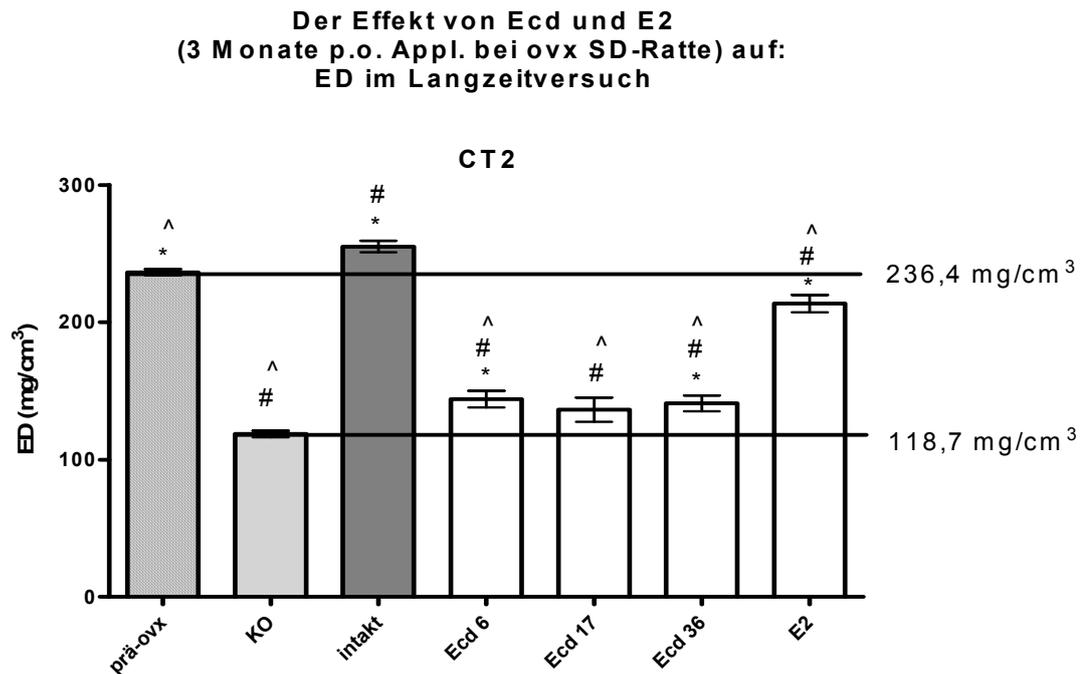
**Abb. 16:** Darstellung der prozentualen Veränderungen der endostealen Dichte (ED) in der Zeit zwischen CT1 und CT2. In jeder Gruppe wurden die Werte eines Tieres aus CT1 und CT2 verglichen und aus diesen Werten die durchschnittliche prozentuale Veränderung einer Gruppe errechnet.

### 3.3.2 Die endosteale Dichte (ED) im Langzeitversuch

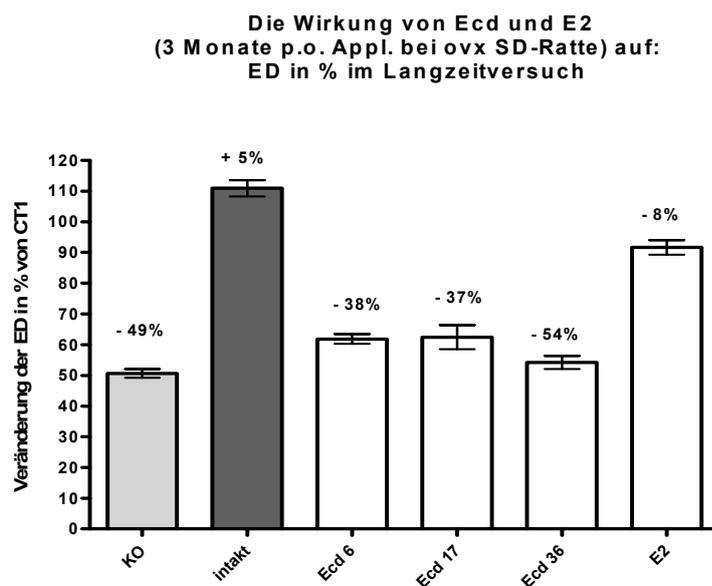
In diesem Versuch gab es zusätzlich eine Kontrollgruppe intakter Tiere ("intakt"), die mit sojafreiem Futter ernährt wurden, welches keine Testsubstanzen enthielt, um die Auswirkungen der applizierten Substanzen differenzierter betrachten zu können. Der prä-ovx Wert der ED lag in diesem Versuch bei 236,4 mg/cm<sup>3</sup>. Im Versuchsverlauf verloren alle Gruppen an ED. Ausgenommen die Gruppe "intakt", die im Verlauf einen Zuwachs von 5 % hatte. Die KO-Gruppe verzeichnete einen Verlust von fast 50 % auf 118,7 mg/cm<sup>3</sup> und die ED der E2-Gruppe wurde mit 8% kaum reduziert. Des Weiteren war festzustellen, dass bei allen drei Ecd-Gruppen ein Abbau von ED in signifikantem Maße reduziert wurde. Interessanterweise war hier die mittlere Dosierung der Ecd-17-Gruppe effektiver als die höchste Dosierung der Ecd-36-Gruppe.



**Abb. 17:** Durchschnittliche endosteale Dichte (ED) der einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsbeginn. Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau : \*=p<0,05 versus KO).



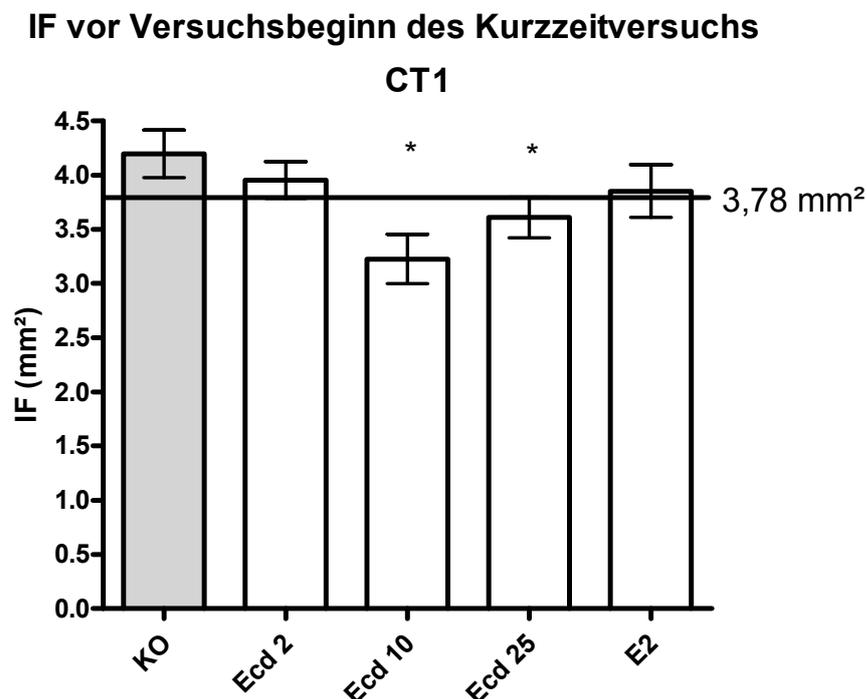
**Abb. 18:** Durchschnittliche endostale Dichte (ED) der einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsende nach 3 Monaten. Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau: \* =  $p < 0,05$  versus KO, # =  $p < 0,05$  versus prä-ovx, ^ =  $p < 0,05$  versus intakt).



**Abb. 19:** Darstellung der prozentualen Veränderungen der endostealen Dichte (ED) in der Zeit zwischen CT1 und CT2. In jeder Gruppe wurden die Werte eines Tieres aus CT1 und CT2 verglichen und aus diesen Werten die durchschnittliche prozentuale Veränderung einer Gruppe errechnet.

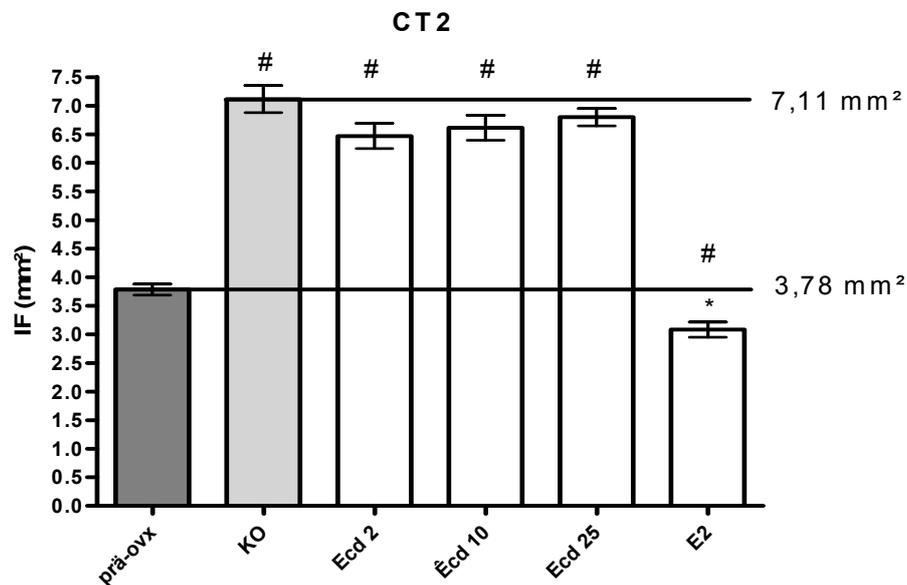
### 3.3.3 Die intraosteale Fläche (IF) im Kurzzeitversuch

Zu Beginn des Versuchs bestanden signifikante Unterschiede im Bezug auf die IF der einzelnen Versuchsgruppen. Dies ist auf die Randomisierung der Tiere nach Körpergewicht zurückzuführen, welche die individuelle IF unberücksichtigt ließ. Um trotzdem einen Vergleich zwischen Versuchsbeginn und Versuchende zu ermöglichen, wurde ein als prä-ovx bezeichneter Mittelwert gebildet, der die durchschnittliche IF aller Gruppen enthielt, welche zu Versuchsbeginn vor Ovx ermittelt wurde. Dieser Wert lag bei 3,78 mm<sup>2</sup>. Im Laufe des Versuchs veränderten sich alle Gruppen gegenüber prä-ovx signifikant, wobei sich die IF der KO-Gruppe mit einem abschließenden Durchschnittswert von 7,11 mm<sup>2</sup> gegenüber prä-ovx fast verdoppelte. Auch bei den mit Ecd behandelten Gruppen Ecd 2, Ecd 10 und Ecd 25 kam es zu einem signifikanten Anstieg der IF. Nur die E2-Gruppe wies eine Reduktion der IF auf, die sowohl gegenüber prä-ovx als auch KO signifikant war.



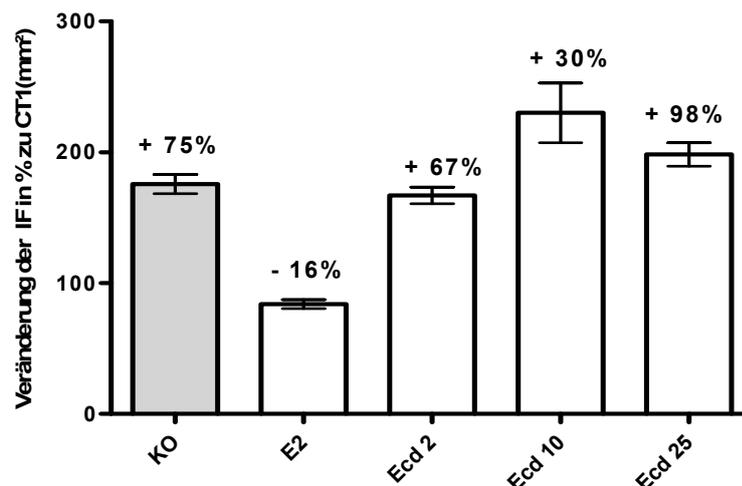
**Abb. 20:** Durchschnittliche intraosteale Fläche (IF) der einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsbeginn. Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlusstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau : \*=p<0,05 versus KO)

**Wirkung von Ecd und E2  
(4 Wochen s.c. Appl. bei ovx SD-Ratte) auf:  
IF im Kurzzeitversuch**



**Abb. 21:** Durchschnittliche intraosteoale Fläche (IF) der einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsende nach 4 Wochen. Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau: \* $p < 0,05$  versus prä-ovx, # $p < 0,05$  versus prä-ovx).

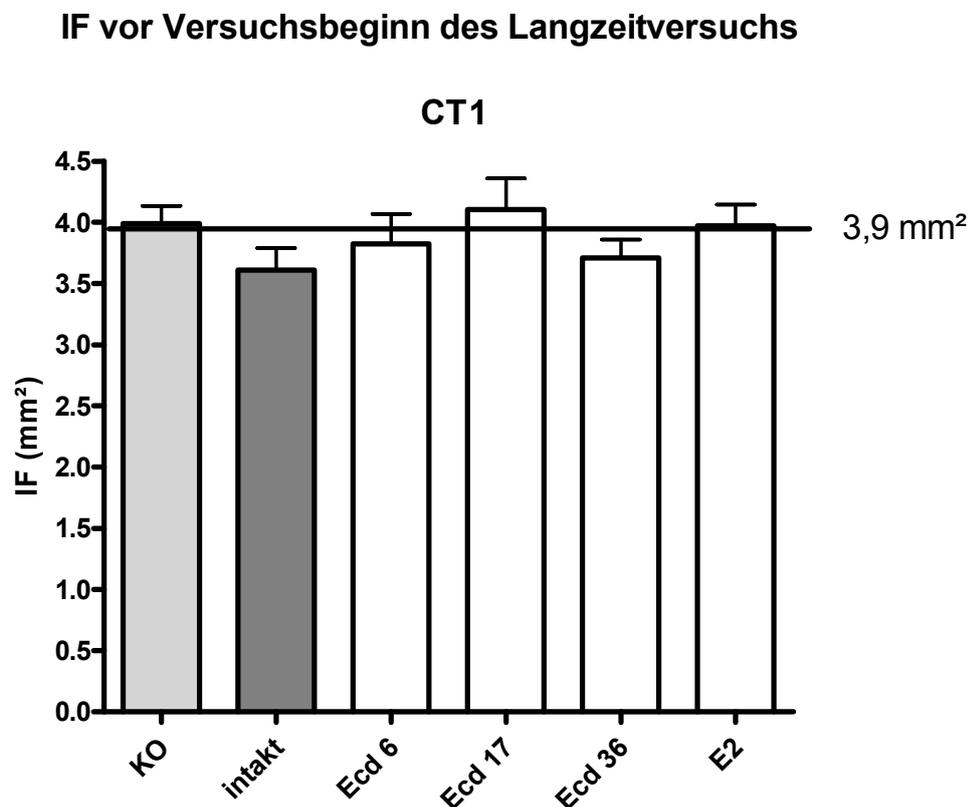
**Wirkung von Ecd und E2  
(4 Wochen s.c. Appl. bei ovx SD-Ratten) auf:  
IF in % im Kurzzeitversuch**



**Abb. 22:** Darstellung der prozentualen Veränderungen der intraostealen Fläche (IF) in der Zeit zwischen CT1 und CT2. In jeder Gruppe wurden die Werte eines Tieres aus CT1 und CT2 verglichen und aus diesen Werten die durchschnittliche prozentuale Veränderung einer Gruppe errechnet.

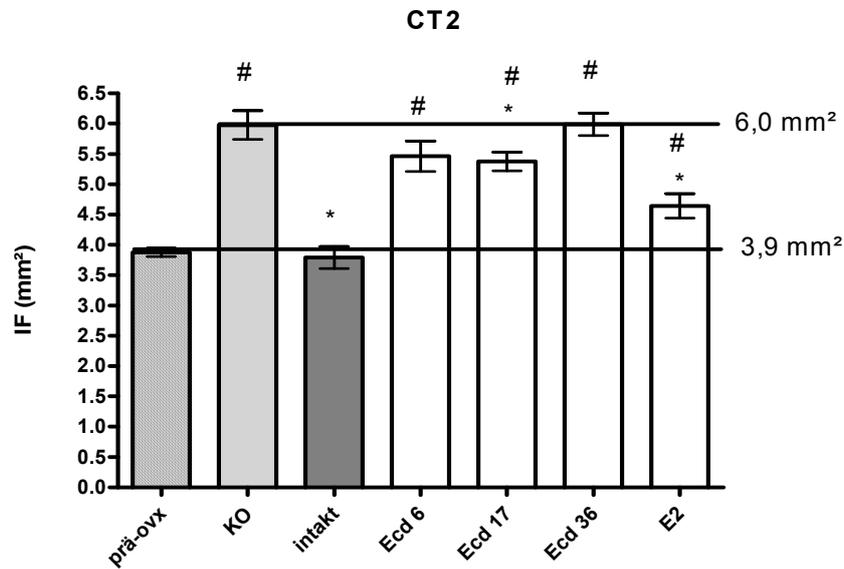
### 3.3.4 Die intraosteoale Fläche (IF) im Langzeitversuch

Mit Ausnahme der intakten Kontrollgruppe ("intakt") kam es bei allen Versuchsgruppen zu einer signifikanten Erhöhung der IF gegenüber prä-ovx, die einen Wert von 3,9 mm<sup>2</sup> aufwies. Den geringsten Zuwachs an IF hatte die Gruppe "intakt" mit 5 % und die Gruppe E2 mit 17 %. Der höchste Zuwachs an IF war in der Gruppe Ecd 121 mit 61 % zu finden, gefolgt von der KO-Gruppe mit einer IF-Zunahme von 50 %. Auch die mit Ecd behandelten Gruppen Ecd 6 und Ecd 17 legten mit jeweils 43 % und 31 % in signifikantem Maß an IF zu. Von allen Ecd Gruppen war der Zuwachs an IF bei der mittleren Ecd-17-Gruppe am geringsten.



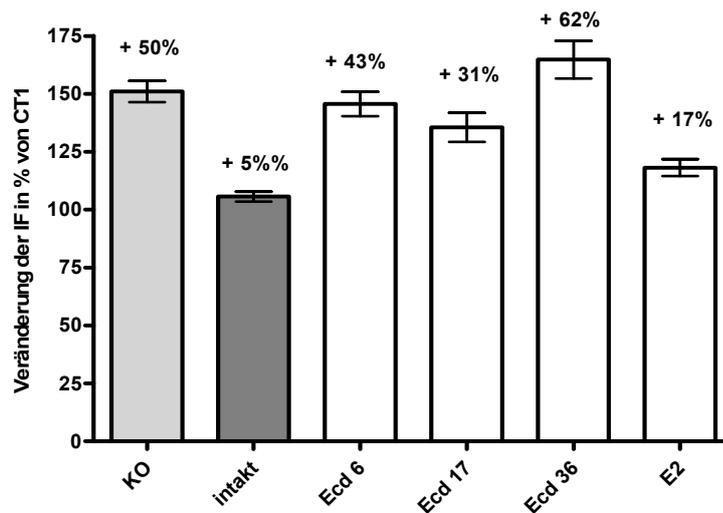
**Abb. 23:** Durchschnittliche intraosteoale Fläche (IF) der einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsbeginn. Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau : \*=p<0,05 versus KO).

**Wirkung von Ecd und E2  
(3 Monate p.o. Appl. bei ovx SD-Ratte) auf:  
IF im Langzeitversuch**



**Abb. 24:** Durchschnittliche intraosteoale Fläche (IF) der einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsende nach 3 Monaten. Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau:  $*=p<0,05$  versus prä-ovx,  $\#=p<0,05$  versus KO).

**Wirkung von Ecd und E2  
(3 Monate p.o. Appl. bei ovx SD-Ratten) auf:  
IF in % im Langzeitversuch**

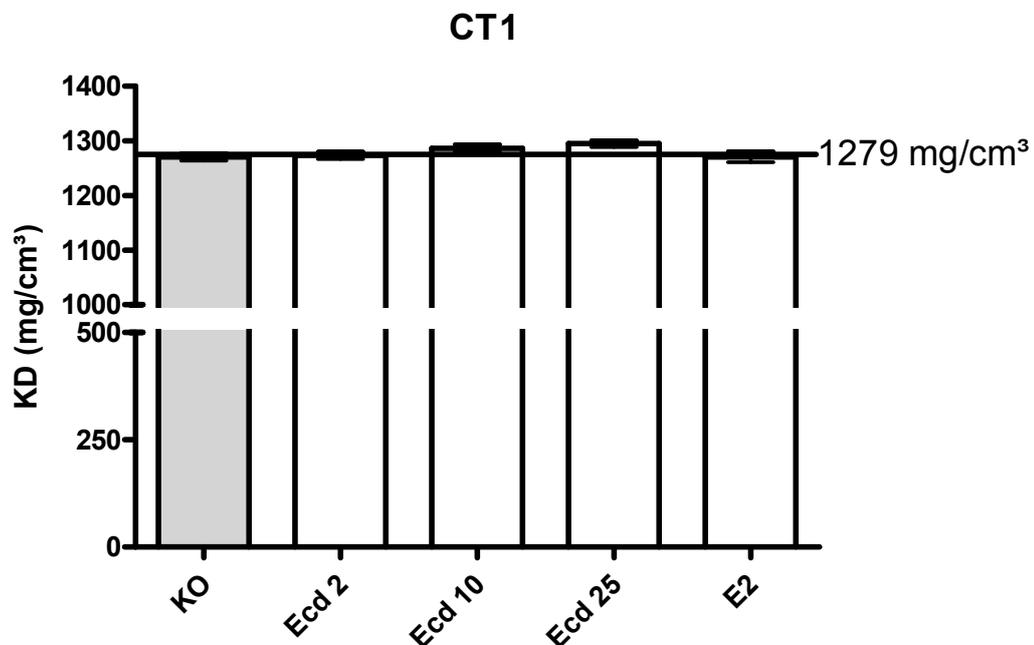


**Abb. 25:** Darstellung der prozentualen Veränderungen der intraostealen Fläche (IF) in der Zeit zwischen CT1 und CT2. In jeder Gruppe wurden die Werte eines Tieres aus CT1 und CT2 verglichen und aus diesen Werten die durchschnittliche prozentuale Veränderung einer Gruppe errechnet.

### 3.3.5 Die kortikale Dichte (KD) im Kurzzeitversuch

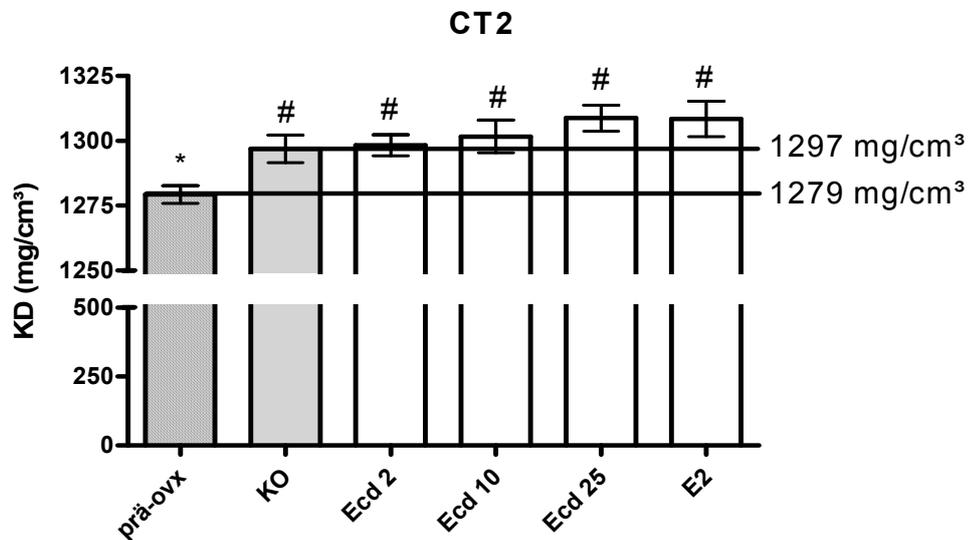
Zu Vergleichszwecken wurde auch in dieser Versuchsreihe ein prä-ovx Wert errechnet, der die durchschnittliche KD der Tiere aller Gruppen vor Versuchsbeginn beinhaltete. Dieser lag bei 1279 mg/cm<sup>3</sup>. Im Laufe der Versuchsreihe kam es bei allen Gruppen gegenüber prä-ovx zu einer signifikanten Zunahme der KD wobei sich die KD der Ecd-25-Gruppe mit einem Durchschnittswert von 1309 mg/cm<sup>3</sup> am stärksten erhöhte. Bei allen Versuchsgruppen kam es gegenüber prä-ovx zu einer signifikanten Erhöhung der KD im Verlauf dieser Versuchsreihe.

#### KD vor Versuchsbeginn des Kurzzeitversuchs



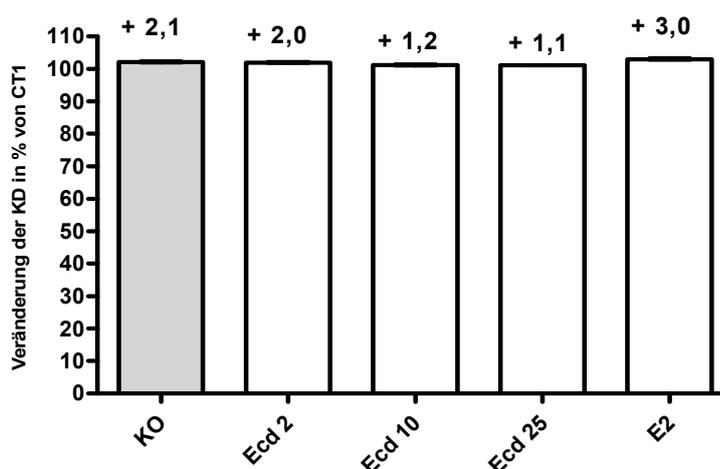
**Abb. 26:** Durchschnittliche kortikale Dichte (KD) der einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsbeginn. Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau : \*=p<0,05 versus KO).

**Wirkung von Ecd und E2  
(4 Wochen s.c. Appl. ovx SD-Ratten) auf:  
KD im Kurzzeitversuch**



**Abb. 27:** Durchschnittliche kortikale Dichte (K D) der einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsende nach 4 Wochen. Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau:  $*=p<0,05$  versus KO,  $\#=p<0,05$  versus prä-ovx).

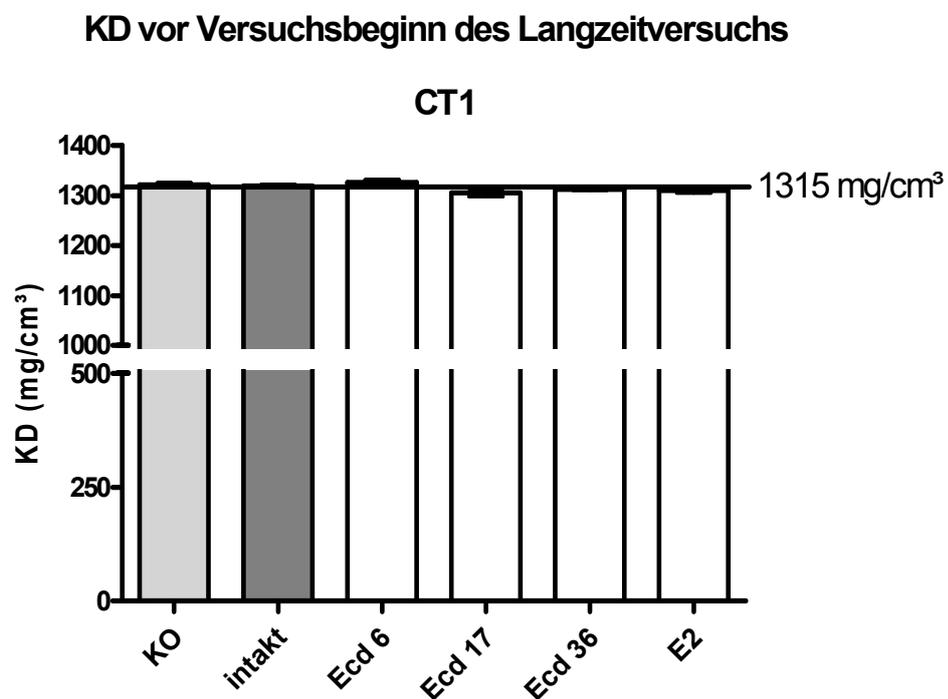
**Wirkung von Ecd und E2  
(4 Wochen s.c. Appl. ovx SD-Ratten) auf:  
KD in % im Kurzzeitversuch**



**Abb. 28:** Darstellung der prozentualen Veränderungen der kortikalen Dichte (KD) in der Zeit zwischen CT1 und CT2. In jeder Gruppe wurden die Werte eines Tieres aus CT1 und CT2 verglichen und aus diesen Werten die durchschnittliche prozentuale Veränderung einer Gruppe errechnet.

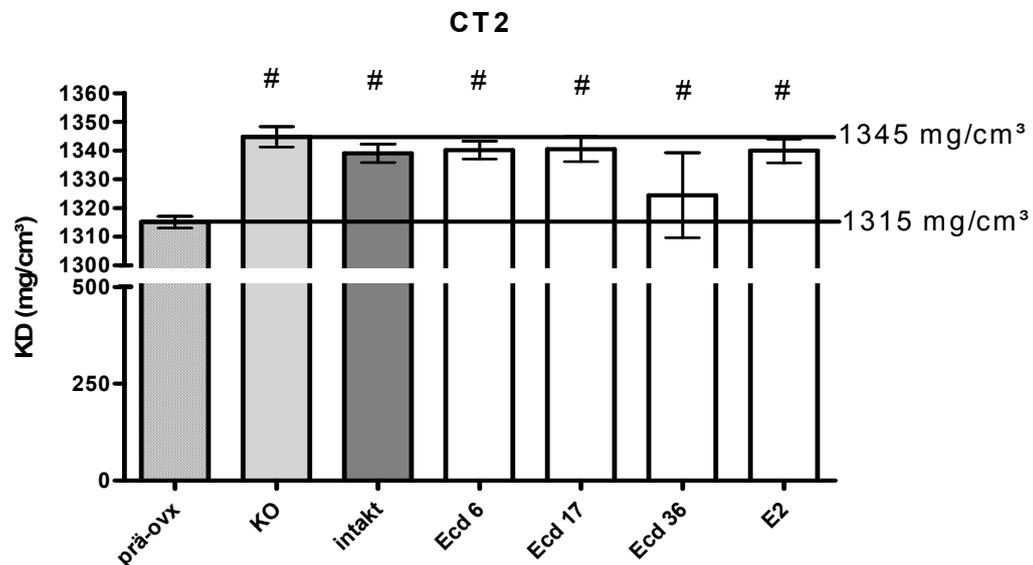
### 3.3.6 Die kortikale Dichte (KD) im Langzeitversuch

Wie auch im Kurzzeitversuch kam es bei allen ovariectomierten Tieren zu einer signifikanten Erhöhung der KD gegenüber des prä-ovx von  $1315 \text{ mg/cm}^3$ . Der meiste Zuwachs an KD war bei der KO-Gruppe zu verzeichnen, mit einem Wert von  $1345 \text{ mg/cm}^3$  bei Versuchsende. Auch die KD der mit Ecd behandelten Gruppen erhöhte sich signifikant gegenüber prä-ovx, wobei auch hier die mittlere Dosis Ecd 17 effektiver war als Ecd 36.



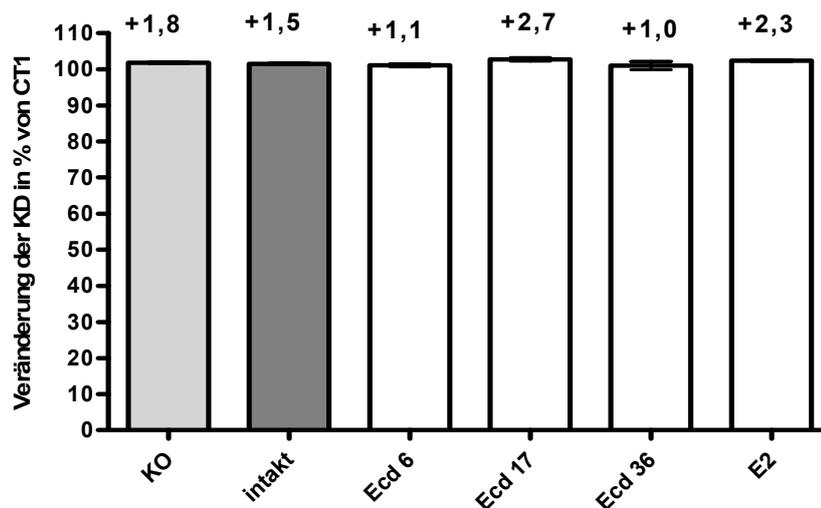
**Abb. 29:** Durchschnittliche kortikale Dichte (KD) der einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsbeginn. Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau :  $*=p<0,05$  versus KO).

**Wirkung von Ecd und E2  
(3 Monate p.o. Appl. bei ovx SD-Ratte) auf:  
KD im Langzeitversuch**



**Abb. 30:** Durchschnittliche kortikale Dichte (KD) der einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsende nach 3 Monaten. Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau:  $*=p<0,05$  versus KO,  $\#=p<0,05$  versus prä-ovx).

**Wirkung von Ecd und E2  
(3 Monate p.o. Appl. bei ovx SD-Ratte) auf:  
KD in % im Langzeitversuch**



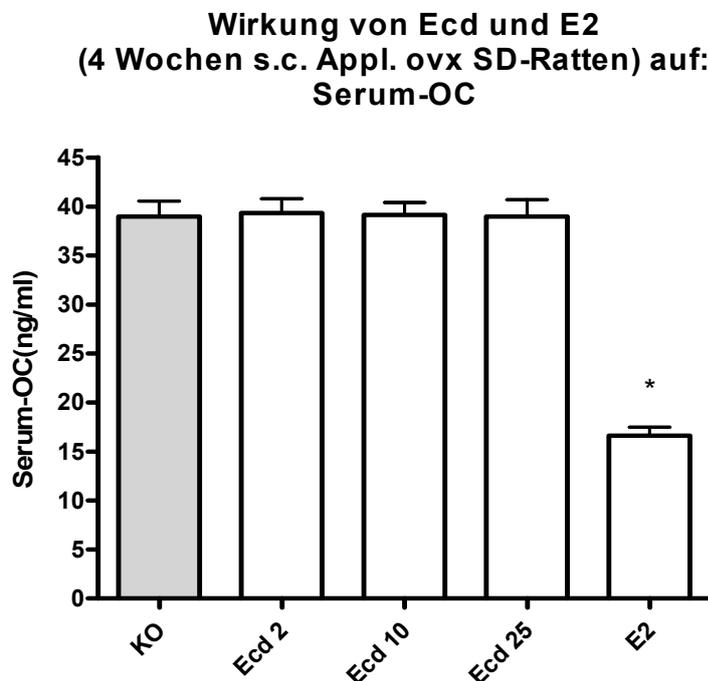
**Abb. 31:** Darstellung der prozentualen Veränderungen der kortikalen Dichte (KD) in der Zeit zwischen CT1 und CT2. In jeder Gruppe wurden die Werte eines Tieres aus CT1 und CT2 verglichen und aus diesen Werten die durchschnittliche prozentuale Veränderung einer Gruppe errechnet.

### 3.4 Die Ergebnisse der Serumanalyse

Zur Bestimmung der für diese Studie relevanten Serumparameter Osteokalzin (OC) und CrossLaps (CL) wurde am Ende der Versuchsreihen das Blut der Tiere durch Dekapitation gewonnen. Die Bestimmung der CL wurde nur am Ende des Langzeitversuchs durchgeführt. Da zu Versuchsbeginn kein Blut zur Verfügung stand, beziehen sich alle gemessenen Serumparameter auf die der Kontrolltiere.

#### 3.4.1 Das Osteokalzin (OC) im Kurzzeitversuch

Bei den am Ende dieses Versuchs erhobenen OC-Werten stellte sich heraus, dass diese sowohl bei der KO-Gruppe als auch bei den mit Ecd behandelten Gruppen auf gleichmäßig hohem Niveau (von ca. 39 ng/ml) waren. Weder unter den Ecd-Gruppen, noch im Vergleich der Ecd-Gruppen mit der Kontrollgruppe (KO) gab es signifikante Unterschiede. Die E2-Gruppe hingegen (mit 16,6 ng/ml) wies im Vergleich zur KO Gruppe einen signifikant niedrigeren OC-Spiegel auf.

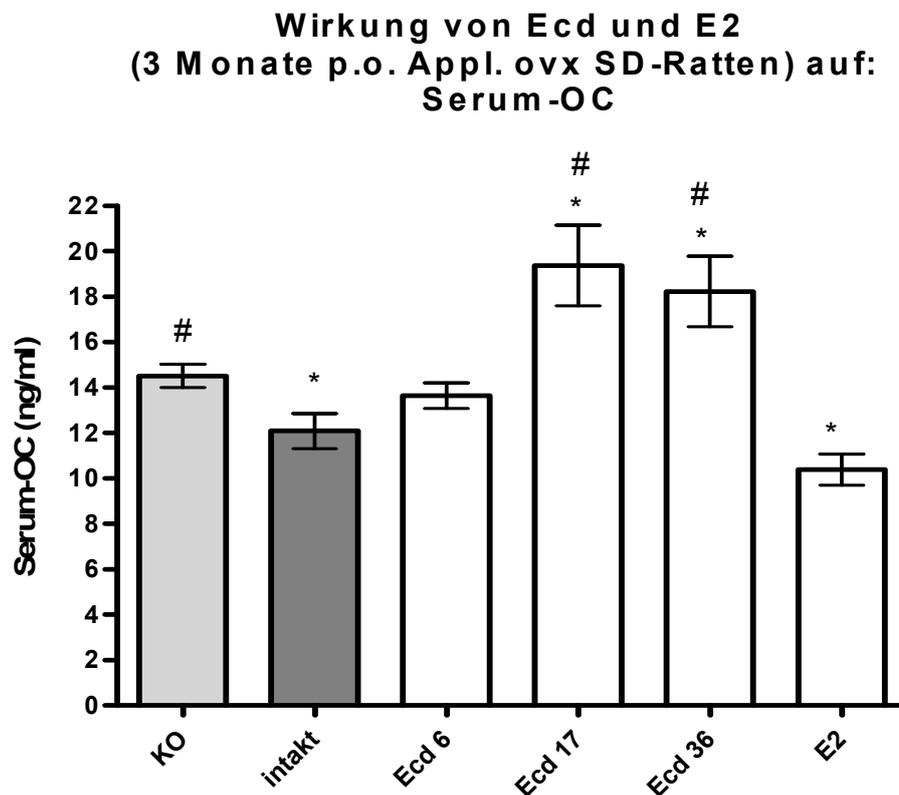


**Abb. 32:** Darstellung der Osteokalzinwerte im Serum der Tiere der einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsende nach 4 Wochen. Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau : \*= $p < 0,05$  versus KO).

### 3.4.2 Das Osteokalzin (OC) im Langzeitversuch

Die in dieser Versuchsreihe erhobenen OC-Werte waren insgesamt niedriger als die des Kurzzeitversuches. Allerdings waren auch hier die Werte sowohl bei der KO-Gruppe mit 14,5 ng/ml als auch bei der mit Ecd behandelten Tiere erhöht.

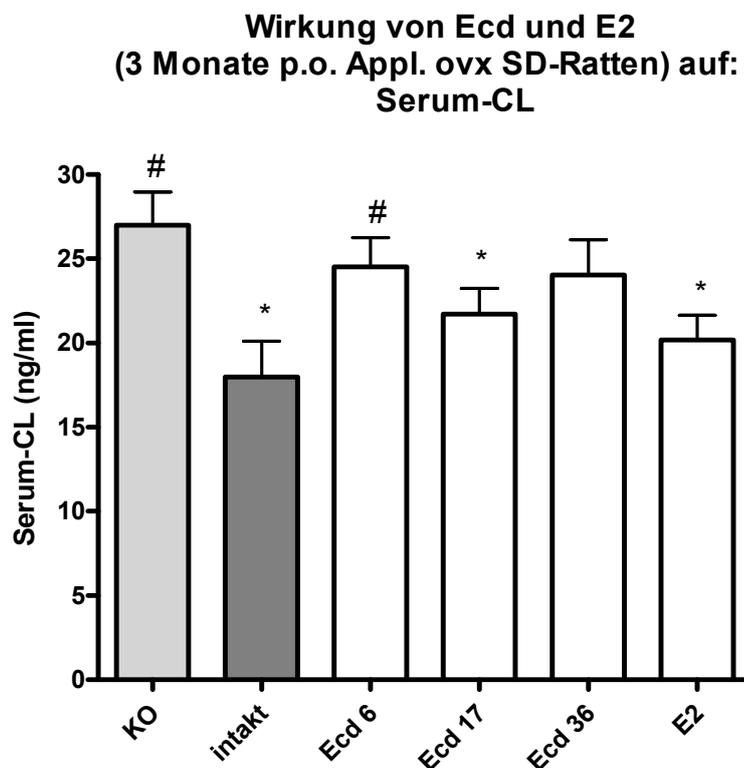
Nur bei der E2-Gruppe mit 10,3 ng/ml war eine signifikante Reduktion des OC im Vergleich zur KO-Gruppe nachzuweisen. Demgegenüber standen die Gruppen Ecd 17 und Ecd 36, die einen signifikant höheren OC-Wert hatten, als die ovx Kontrollgruppe, wobei die Ecd-17-Gruppe mit 19,3 ng/ml den höchsten OC-Serumspiegel aufwies.



**Abb. 33:** Darstellung der Serumwerte des Osteokalzins (OC) der einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsende nach 3 Monaten. Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau: \* =  $p < 0,05$  versus KO, # =  $p < 0,05$  versus intakt).

### 3.4.3 CrossLaps (CL) im Langzeitversuch

Auch die in dieser Versuchsreihe ermittelten CL-Werte waren bei der KO-Gruppe mit 26,9 ng/ml erhöht und sowohl bei der E2-Gruppe als auch bei den mit Ecd behandelten Tieren niedrig. Die stärkste Differenz des CL-Spiegels im Vergleich zur KO-Gruppe, war bei der E2-Gruppe mit einem Wert von 20,2 ng/ml zu beobachten. Gefolgt von der Ecd-17-Gruppe, die mit 21,7 ng/ml ebenfalls einen reduzierten CL-Spiegel aufwies, der von allen Ecd-Gruppen am niedrigsten war. Letztlich waren die CL-Spiegel der Ecd-17-Gruppe und die der mit E2 behandelten Tiere signifikant niedriger gegenüber der KO-Gruppe.



**Abb. 34:** Darstellung der Serumwerte der CrossLaps (CL) der einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsende nach 3 Monaten. Die Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und einem Anschlusstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau : \*=p<0,05 versus KO, #=p<0,05 versus intakt).

#### 4. Diskussion

Die durch Östrogenmangel verursachte postmenopausale Osteoporose ist ein weitläufig untersuchtes Gebiet. Das trifft auch auf die HRT zu, welche in letzter Zeit aufgrund der möglichen Nebenwirkungen zunehmend in ein negatives Licht gerückt wurde. Dementsprechend ist es ein wichtiges Anliegen, nach alternativen Therapiesubstanzen zu forschen, die einen positiven, mit Östradiol vergleichbaren Effekt besitzen, ohne die entsprechenden Risiken und Nebenwirkungen aufzuweisen. Dabei ist man darauf gestoßen, dass Auszüge der Pflanze *Tinospora cordifolia* einen antiosteoporotischen Effekt haben, wobei Ecd als wahrscheinlich aktive Komponente identifiziert wurde (Kapur et al. 2008).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels der zwei beschriebenen Versuchsreihen zu evaluieren, ob reines Extrakt von Ecd einen signifikanten, knochenprotektiven Effekt hat.

Zu diesem Zweck wurden bei beiden Versuchen jeweils zwei qCT Messungen der linken Tibiametaphyse durchgeführt. Eine Messung vor Applikationsbeginn und eine zum Ende des entsprechenden Versuchs. Danach wurden die jeweiligen Daten der spezifischen Knochenparameter miteinander verglichen und die Veränderungen im Ergebnisteil dargestellt.

Für den Langzeitversuch wurden die Testsubstanzen dem Futter beigemischt. Im Kurzzeitversuch erfolgte die Applikation der Testsubstanzen mittels subkutaner Injektion.

Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen, in denen Ecd an Ratten getestet wurde, daher ist die optimale Dosierung aus Studien nicht einwandfrei ersichtlich. Bei bisher bestehenden Untersuchungen am Rattenmodell wurde eine Ecd-Dosis von 0,5 mg/kg KG intraperitoneal angewendet (Catalan et al. 1985) und bei Studien am Menschen 5 mg/kg KG per os (Bathori et al. 2008). Zur Feststellung der optimalen Applikationsdosis wurden bei beiden Versuchsreihen jeweils drei verschiedene Substanzkonzentrationen getestet. Bezogen auf 100 g Körpergewicht waren dies bis zu 10 mg s.c. pro Tag während des Kurzzeitversuches und maximal 36 mg p.o. pro Tag im Rahmen des Langzeitversuchs. Um eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern, wurden die Tiere mit sojafreiem Futter ernährt, da Soja östrogenähnliche

Substanzen enthält, die sich negativ auf den Versuchsverlauf hätten auswirken können.

Bei der Bearbeitung und im Vergleich der Versuchsreihen wurden sowohl die Futteraufnahme und die Entwicklung des Körpergewichtes als auch die verschiedenen Parameter des Knochenaufbaus und des Knochenstoffwechsels berücksichtigt. Dabei richtet sich die Aufmerksamkeit dieser Arbeit hauptsächlich auf die Veränderungen des Knochens, die sich im Versuchsverlauf ergeben haben. Besonders die jeweiligen Flächen- und Dichteveränderungen von Kortikalis und Spongiosa der Tibiametaphyse waren von hervorgehobenem Interesse. Hier kommt vor allem den Veränderungen der Spongiosa eine spezielle Stellung zu. Letztere reagiert sehr sensibel auf Steroidmangel und ist durch ihren trabekulären Aufbau von besonderer Wichtigkeit für Stabilität und Belastungsfähigkeit des Knochens (Stürmer et al. 2006). Dementsprechend geben die Knochenparameter der Spongiosa, insbesondere die Spongiosadichte (ED), spezifisch Auskunft über das Vorliegen osteoporotischer Veränderungen.

#### **Die Futteraufnahme und das Körpergewicht:**

Es ist vielfach untersucht und dargestellt worden, dass ovx Ratten im Vergleich zu intakten Tieren an Körpergewicht zunehmen, was durch die Applikation von E2 verhindert werden kann (Wegorzewska et al. 2008). Dies konnte auch in dieser Studie bestätigt werden. Während des Kurzzeitversuches stand den Tieren nach Ovx unbegrenzt sojafreies Futter zur Verfügung. Im Durchschnitt kam es zu einer Gewichtszunahme von 83 g/Tier, was einer Zunahme des Körpergewichtes von 36 % bezogen auf das Ausgangsgewicht entspricht. Im Langzeitversuch kam es zu einer Gewichtszunahme der ovariectomierten Kontrollgruppe von 69 g/Tier, entsprechend einer Zunahme von 27 % des Ausgangsgewichtes. Im Langzeitversuch kam es also zu einer geringeren Zunahme des Körpergewichtes. Dies kann durch die längere Eingewöhnungsphase erklärt werden, an deren Ende die Tiere im Vergleich zum Kurzzeitversuch ein höheres Ausgangsgewicht hatten. Die Verlängerung der Eingewöhnungsphase erfolgte, weil die Tiere bei der Anlieferung eine überdurchschnittlich hohe Knochendichte besaßen, was wahrscheinlich auf die Fütterung beim Züchter zurückzuführen war. Durch Applikation von E2 konnte die Gewichtszunahme verhindert werden; sowohl im Kurzzeit- als auch im Langzeitversuch mit gleicher Effektivität. Demzufolge ist der gewichtsstabilisierende

Effekt von E2 wahrscheinlich nicht von der Behandlungsdauer abhängig. Die E2-Gruppen der jeweiligen Versuchsreihen hielten ihr Gewicht trotz Steigerung des Futtermittelsverbrauches von 11,5 g/Tier/d auf 16,8 g/Tier/d und entsprechender Erhöhung der Energiezufuhr konstant.

Eine Erklärung hierfür könnte eine verminderte Futtermittelnutzung oder ein erhöhter Energieverbrauch durch gesteigerte körperliche Aktivität sein, wie sie bei den E2-substituierten Tieren zu beobachten war. Die mit Ecd behandelten Tiere erreichten während des Kurzzeitversuches, unabhängig von der applizierten Dosis, ein durchschnittliches Körpergewicht von 303 g. Dies war in signifikantem Maße höher als das Ausgangsgewicht und auf ähnlichem hohem Niveau wie die KO-Gruppen. Die Steigerung des Körpergewichtes unter Ecd im Langzeitversuch war dosisabhängig, wobei das Endgewicht der Gruppe Ecd 6 dem der KO-Gruppe entsprach und das Endgewicht der Ecd-36-Gruppe signifikant höher war als das der KO-Gruppe. Bezogen auf den Gewichtsverlauf gab es keinen Unterschied zwischen Ecd- und KO-Gruppen. Kalorienzufuhr und Futtermittelsverbrauch verhielten sich bei beiden Gruppen übereinstimmend. Die durch Ovx ausgelöste Gewichtszunahme konnte durch Ecd also nicht verhindert werden, dementsprechend hat Ecd im Bezug auf das Körpergewicht keinen östrogenartigen Effekt. Allerdings konnte im Rahmen dieses Forschungsprojekts in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass die mit Ecd behandelten Tiere im Vergleich zu den KO-Gruppen eine höhere Muskelmasse bei geringerem Fettdepotzuwachs hatten (Seidlova-Wuttke et al. 2010a). Bei den Ecd Gruppen ist die Gewichtszunahme also im Wesentlichen auf eine Erhöhung der Muskelmasse zurückzuführen; wohingegen die Gewichtszunahme der ovariectomierten Kontrolltiere aus einer Vergrößerung der Fettdepots resultiert (Seidlova-Wuttke et al. 2010a).

#### **Die Knochenparameter im Kurzzeitversuch:**

Während des Kurzzeitversuchs reduzierte sich die endostale Dichte (ED) der ovariectomierten Kontrollgruppe (KO) um fast 30 % (=Osteoporose) gegenüber deren Ausgangswert. Bei der mit E2 substituierten Versuchsgruppe wurde der Verlust an ED (mit nur 2 %) fast vollständig verhindert. Auch bei den mit Ecd behandelten Tieren wurde die Reduktion der ED verhindert. In signifikantem Maße gegenüber der ovariectomierten Kontrollgruppe allerdings nur bei der am höchsten dosierten Ecd-25-

Gruppe. Bei dieser Gruppe war die Reduktion der ED mit einem Verlust von 17 % (=Osteopenie) gegenüber dem Ausgangswert am höchsten.

Da es zu Beginn des Kurzzeitversuchs zwischen den Versuchsgruppen Unterschiede bei der durchschnittlichen intraostealen Fläche (IF) gab, wurde ein als prä-ovx bezeichneter Mittelwert gebildet, um einen Vergleich zwischen Versuchsbeginn und Versuchende zu ermöglichen. Dieser Wert beinhaltet die durchschnittliche IF aller Gruppen, welche zu Versuchsbeginn vor der Ovariectomie ermittelt wurde. Im Laufe des Versuchs veränderte sich die IF aller Gruppen gegenüber prä-ovx signifikant, wobei sich die IF der KO-Gruppe gegenüber prä-ovx fast verdoppelte. Auch bei den mit Ecd behandelten Gruppen kam es zu einem signifikanten Anstieg der IF, wobei eine Reduktion der IF feststellen, die sowohl gegenüber preovx als auch KO ovx signifikant war.

Die kortikale Dichte (KD) erhöhte sich im Laufe des Kurzzeitversuchs gegenüber prä-ovx bei allen Gruppen signifikant, wobei die Ecd-25-Gruppe den größten Zuwachs an KD verzeichnete.

Bezogen auf die genannten Knochenparameter war am Ende des Kurzzeitversuchs festzustellen, dass bei allen mit Ecd behandelten Tieren ein osteoprotektiver Effekt auftrat, welcher bei der Ecd-25-Gruppe am meisten ausgeprägt war. Die höchste applizierte Dosis des Kurzzeitversuchs war im Hinblick auf die Reduktion osteoporotischer Vorgänge am effektivsten.

### **Die Knochenparameter im Langzeitversuch:**

Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass die Tibiametaphyse von Ratten sehr sensibel auf den Entzug oder die Substitution von Östrogenen reagiert. Durch eine Vielzahl von Methoden wurde gezeigt, dass es hier innerhalb von drei Monaten nach Ovx zu einem Verlust der Knochensubstanz von bis zu 50 % kommt, der durch Substitution von E2 in nahezu vollständig verhindert werden kann. (Garner et al. 1991; Seidlova-Wuttke et al. 2003 a/b, 2008b, 2010b; Perry et al. 2005).

Dies war auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit festzustellen. Im Versuchsverlauf verloren alle Gruppen ED, wobei die KO-Gruppe einen Verlust von 49 % verzeichnete und der Verlust von ED der E2 Gruppe sich auf 8 % beschränkte. Des Weiteren war festzustellen, dass bei allen drei Ecd Gruppen ein Abbau von ED in signifikantem Maße reduziert wurde und damit auch die Entstehung von Osteoporose. Interessanterweise war hierbei die mittlere Dosierung der Ecd-17-

Gruppe effektiver als die höchste Dosierung der Ecd-36-Gruppe. Die höhere ED ist auch hier wahrscheinlich auf die Vergrößerung der IF zurückzuführen, welche im Vergleich zu prä-ovx in signifikantem Maß zunahm. Bei allen Gruppen, mit Ausnahme der intakten Kontrollgruppe (intakt), kam es zu einer signifikanten Erhöhung der IF gegenüber prä-ovx. Die geringste Erhöhung der IF fand bei den mit E2 behandelten Tieren statt. Die intakte Kontrollgruppe hatte nach drei Monaten eine IF, die sich kaum von prä-ovx unterschied.

Wie auch im Kurzzeitversuch kam es in dieser Versuchsreihe bei allen ovariectomierten Tieren zu einer signifikanten Erhöhung der KD gegenüber prä-ovx. Den stärksten Zuwachs an KD hatten die Gruppen Ecd 17 und E2.

Bezogen auf die Knochenparameter konnten die Ergebnisse des Kurzzeitversuches im Langzeitversuch bestätigt werden. Bei allen mit Ecd behandelten Tieren kam es zu einer Reduzierung osteoporotischer Vorgänge im Sinne einer knochenprotektiven Wirkung, wobei die mittlere Dosierung Ecd 17 am effektivsten war.

#### **Die Serumparameter im Kurzzeitversuch:**

Die beiden wichtigsten Zelltypen des Knochenstoffwechsels sind Osteoblasten und Osteoklasten. Osteoblasten sind für die Knochensynthese verantwortlich, während Osteoklasten den Knochenabbau vorantreiben. Deren Aktivität lässt sich durch spezifische Serumparameter ermitteln. Die Osteoblastenaktivität lässt sich mithilfe des Osteokalzins bestimmen und die Osteoklastenaktivität durch ein als CrossLaps bezeichnetes Kollagenabbauprodukt (Seidlova-Wuttke et al. 2003a/b; French et al. 2008; Coelingh Bennink et al. 2008).

Normalerweise stehen Knochenaufbau und Knochenabbau im Gleichgewicht. Nach Ausschalten der endogenen Produktion von Steroiden kommt es zu einer erhöhten metabolischen Aktivität sowohl von Osteoblasten, als auch Osteoklasten. Hierbei überwiegt allerdings die Aktivität der Osteoklasten gegenüber denen der Osteoblasten, woraus sich die Entwicklung osteoporotischer Veränderungen nach Ovx erklären lässt (Riggs et al. 2002; Seidlova-Wuttke et al. 2003a/b).

In der Abwesenheit von E2 kommt es also zu einer Zunahme der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten. Durch die Substitution von E2 hingegen werden die Serumosteokalzin- und CrossLapsspiegel wieder gesenkt (Seidlova-Wuttke et al. 2003a/b). Im Kurzzeitversuch gab es zwischen den Osteokalzinwerten der mit Ecd behandelten Tiere und der ovx Kontrolle (KO) kaum Differenzen. Alle Werte lagen

auf demselben hohen Niveau. Im Gegensatz dazu hatte die mit E2 substituierte Gruppe einen niedrigeren Serumosteokalzinwert. Mögliche Ursachen für das Ausbleiben differenzierterer Veränderungen der knochenstoffwechselspezifischen OC-Werte, könnten zum einen die kurze Versuchsdauer von vier Wochen und zum anderen die in diesem Versuch applizierte Dosis Ecd sein, welche in dieser Versuchreihe allgemein relativ niedrig angesetzt war. Des Weiteren wurden im Kurzzeitversuch die CL-Werte nicht ermittelt. Dementsprechend sind die Serumparameter des Kurzzeitversuchs nur bedingt aussagekräftig genug, um daraus Rückschlüsse über die Wirkung von Ecd auf den Knochenstoffwechsel zu ziehen.

### **Die Serumparameter im Langzeitversuch:**

Am Ende des drei Monate dauernden Langzeitversuches stellte sich ein differenzierteres Bild im Bezug auf die Serumparameter dar. So waren die OC-Werte aller Ecd-Gruppen gegenüber der intakten Kontrollgruppe ("intakt")erhöht, aber nur bei den Gruppen Ecd 17 und Ecd 36 in signifikantem Maße sowohl gegenüber ovariectomierten als auch der intakten Kontrollgruppe. Den höchsten OC-Spiegel hatte die Ecd-17-Gruppe, den niedrigsten die intakte Kontrolle. Das Serum-Osteokalzin der E2-Gruppe war, wie zu erwarten (Seidlova-Wuttke et al. 2003a/b), signifikant niedriger, als das der ovariectomierten Kontrolle

Die CL Werte der mit Ecd behandelten Gruppen waren niedriger als bei der ovariectomierten Kontrollgruppe, aber nur bei Ecd 17 in signifikantem Maße. Der CL-Spiegel der E2 Gruppe war, wie zu erwarten (Seidlova-Wuttke et al. 2003a/b), signifikant niedriger als der Wert der ovx Kontrollgruppe.

Bei den mit Ecd behandelten Gruppen blieben die OC-Werte hoch, hingegen waren die CL Werte im Vergleich zu den KO Gruppen reduziert, was vor allem bei der mittleren Dosierung des Langzeitversuchs am ausgeprägtesten war. Dies spricht für eine erhöhte Aktivität der Osteoblasten bei niedriger Aktivität der Osteoklasten und könnte einen Hinweis auf den knochenprotektiven Mechanismus von Ecd geben, was allerdings weiterer Untersuchungen bedarf.

Es wurde bereits in vielen Studien bewiesen, dass eine E2-Substitution osteoporotische Veränderungen der Tibia bei ovariectomierten Ratten unterdrückt. So auch, dass bei weiblichen Ratten eine Reduzierung osteoporotischer Prozesse durch Substitution von E2 um bis zu 50 % stattfindet (Garner et al. 1991; Seidlova-Wuttke

et al. 2003 a/b, 2008b, 2010b; Perry et al. 2005). Das kann auch in dieser Studie bestätigt werden. So kam es im Laufe beider Versuche zu einem sehr starken Abfall der ED bei den ovx Kontrollgruppen. Die knochenprotektive Wirkung von E2 wird dabei hauptsächlich über den ER $\alpha$  vermittelt (Riggs et al. 2002).

In Studien wurde dargestellt, dass es bei ER $\alpha$ -Knock-out-Mäusen zu ausgeprägten osteoporotischen Veränderungen kommt. Im Vergleich dazu kommt es bei ER $\beta$ -Knock-out-Mäusen nur zu geringen strukturellen Veränderung, aber nicht zu einer signifikanten Ausprägung von Osteoporose (Liegibel et al. 2003; Korach et al. 2003).

Wie sich in der vorliegenden Arbeit gezeigt hat, ist Ecd ebenfalls in der Lage osteoporotische Vorgänge zu reduzieren. Es verhindert in entsprechender Dosierung und Applikationsform den Verlust von ED in signifikantem Maße. Des Weiteren kommt es unter der Verabreichung von Ecd zu einer signifikanten Zunahme der IF und KD, woraus eine erhöhte Stabilität der Knochenstruktur resultieren sollte.

In der vorliegenden Arbeit war es möglich zu demonstrieren, dass Ecd bei entsprechender Dosierung und Applikationsform einen signifikanten, knochenprotektiven Effekt hat. Anhand der dargestellten Knochenparameter hat sich gezeigt, dass osteoporotische Veränderungen am Modell der ovariectomierten SD-Ratte in relevantem Maße reduziert werden können. In beiden Versuchsreihen kam es gegenüber den prä-ovx Werten zu einer signifikanten Reduktion des Verlusts an ED; wobei im Kurzzeitversuch die höchste Dosierung am effektivsten war und im Langzeitversuch die mittlere Applikationsdosis. Im Gegensatz dazu erhöhte sich im Laufe beider Versuchreihen sowohl die IF als auch die KD unter der Substitution mit Ecd, was gegenüber dem osteoporotischen Knochen für eine Stärkung der Knochenstruktur spricht. In beiden Versuchen waren die OC Werte der Ecd-Gruppen gegenüber den Werten der mit E2 behandelten Tiere erhöht. Im Gegensatz dazu waren die CrossLaps Werte sowohl bei den E2 Tieren als auch bei den Ecd-Gruppen am Ende des Langzeitversuchs reduziert. Dies legt nahe, dass der antiosteoporotische Effekt von Ecd auf einer Stimulation der Osteoblasten und Inhibition der Osteoklasten beruhen könnte.

Letztlich bleibt aber immer noch die Frage, über welchen Mechanismus die Wirkung von Ecd ausgelöst wird. Es ist bis jetzt noch nicht gelungen, einen spezifischen Ecd-Rezeptor im Gewebe von Säugetieren nachzuweisen. Des Weiteren konnte in einer aktuellen Studie gezeigt werden, dass Ecd nicht an den ER bindet und die protektive

Wirkung am Knochen nicht über einen östrogenartigen Effekt von Ecd vermittelt wird (Seidlova-Wuttke et al. 2010b). Auch ein androgenartiger Effekt von Ecd konnte nicht dargestellt werden (Semeikin et al. 1991; Gorlick-Feldman et al. 2008). Wie aber wird der protektive Effekt von Ecd am Knochen vermittelt?

Wie bereits erwähnt, ist es bis jetzt nicht gelungen einen Ecd-Rezeptor bei Säugetieren darzustellen. Es bestehen aber Hinweise darauf, dass Ecd und andere Ecdsteroidoide die Transkription über Stimulierung des Retinoid-X-Rezeptors (RXR) der Säugetiere aktivieren (Thomas et al. 1993; Yao et al. 1993). Dieser ist im dimerisierten Zustand Bindungspartner einer großen Zahl von nukleären Rezeptoren, u.a. für den Retinsäure Rezeptor (RAR) (Germain et al. 2006) für Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) (Michalik et al. 2006) oder dem Vitamin D (VD) Rezeptor (Baudino et al. 1998; Farmer et al. 2000; Bathori et al. 2008). Von Vitamin D ist bekannt, dass es die intestinale Calciumresorption fördert. Außerdem stimuliert es bei Osteoblasten die Produktion von Osteokalzin (Nagpal et al. 2001), einem Protein, das zum Aufbau der Knochenmatrix benötigt wird. Infolgedessen ist es möglich, dass die positive Wirkung von Ecd auf den Knochen über die Interaktion mit dem RXR/VD Dimer vermittelt wird. Für diese Theorie spricht, dass es bei den mit Ecd behandelten Gruppen zu einer signifikanten Erhöhung des Osteokalzins gekommen ist. Ein Effekt der auch durch VD ausgelöst wird (Shiraishi et al. 2000; Peleg et al. 2002).

Es ist bekannt, dass Ecd einen proteinanabolen Effekt auf den Säugetierorganismus hat (Gorlick-Feldman et al. 2008). Im Versuch am Menschen zeigte sich, dass besonders eine Ecd Substitution in Kombination mit muskulärem Training zu einer Erhöhung der Muskelmasse führt (Bathori et al. 2008). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auch festgestellt, dass die Ecd-Gruppen des Langzeitversuches eine höhere Muskelmasse bei geringerem Fettdepotzuwachs im Vergleich zu den ovariectomierten Kontrolltieren (Seidlova-Wuttke et al. 2010a) aufwiesen. Dementsprechend ist die in diesem Versuch dargestellte Gewichtszunahme bei den ovariectomierten Kontrolltieren hauptsächlich auf eine Vergrößerung des Fettdepots zurückzuführen. Bei den Ecd Gruppen hingegen ist die Erhöhung der Muskelmasse der ausschlaggebende Faktor für die Gewichtszunahme (Seidlova-Wuttke et al. 2010a). Resultierend aus dem vermehrten Muskelzuwachs kann es zu einer erhöhten mechanischen Stimulierung des Knochens gekommen sein und es ist bekannt, dass die mechanische Stimulierung des Knochengewebes einen

knochenprotektiven Effekt hat (Flieger et al 1998; Rubin et al 2002; Ferretti et al 2003; Luu et al 2009). Dementsprechend kann der osteoprotektive Effekt von Ecd auch teilweise über diesen indirekten Weg entstanden sein.

Von PPARs ist bekannt, dass sie in besonderem Maße in den Fettmetabolismus involviert sind. Agonisten des PPAR $\alpha$  werden in der Klinik als Medikamente zur Lipolyse eingesetzt (Guerre-Millo et al. 2000; Berger and Moller. 2002; Michalik et al. 2006). Agonisten des PPAR $\gamma$  hingegen regen die Entwicklung von Lipozyten auf Kosten der Osteoblasten an. Es ist möglich, dass Ecd einen selektiven PPAR modulierenden Effekt hat und im Knochen mehr co-Repressoren als co-Aktivatoren des Knochenabbaus rekrutiert. Auch von Retinoiden weiß man, dass sie einen knochenprotektiven Effekt haben (Weston et al. 2003) und es möglich ist, dass die Stimulierung des RXR/RAR Dimers in einer erhöhten Osteoblastenaktivität resultiert.

Alles in allem sieht es so aus, dass Ecd einen Wirkmechanismus hat, der sich fundamental von E2 unterscheidet, welches über ER $\alpha$  den Knochenmetabolismus vermindert. Letztlich ist aber die Frage, auf welchem Weg Ecd seine osteoprotektive Wirkung erzielt, noch nicht geklärt und bedarf noch weiterer Forschung.

## 5. Zusammenfassung

Die in dieser Studie untersuchte Substanz 20-Hydroxyecdysen (Ecd) ist ein Ecdysteroid mit anaboler und osteoprotektiver Wirkung (Seidlova-Wuttke et al. 2010a/b). Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob Ecd als mögliche Therapiealternative zur herkömmlichen HRT eingesetzt werden kann. Um zu ermitteln, ob Ecd in der Behandlung der postmenopausalen Osteoporose Einsatz finden könnte, wurde dessen Wirkung auf den Knochenstoffwechsel untersucht und mit E2 verglichen, das derzeit die wirksamste Substanz im Rahmen der klassischen HRT darstellt. Zu diesem Zweck wurden zwei Versuchsreihen konzipiert. Ein vierwöchiger Kurzzeitversuch, bei dem Ecd und E2 ovariectomierten Ratten mittels subkutaner Injektion appliziert wurden, und ein drei Monate dauernder Langzeitversuch, bei dem die Versuchstiere die Testsubstanzen über das Futter bekamen.

Die Veränderungen der Knochenstruktur wurden mit Hilfe der qCT untersucht und der Einfluss von Ecd und E2 auf den Knochenstoffwechsel durch Serumanalysen untersucht. Im Rahmen dieser Studie wurde der bekannte knochenprotektive Effekt von E2 bei postmenopausaler Osteoporose erneut bestätigt. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Substanz Ecd konzentrationsabhängig in der Lage ist, osteoporotische Veränderungen am Modell der ovariectomierten Ratte in signifikantem Maße zu reduzieren.

Nach der Menopause verliert der Knochen einer Frau jedes Jahr ca. 1-2 % seiner BMD. Vergleicht man die Lebensspanne einer Ratte mit der des Menschen, so entsprechen drei Lebensmonate der Ratte ca. 10 Lebensjahren beim Menschen. Aus mehreren in dieser Abteilung bereits durchgeführten Studien ist bekannt, dass die endostale Dichte der Tibia der Ratte, einen Monat nach ovx, ca. 25-30 % abnimmt. Das entspricht in etwa dem Knochensubstanzverlust einer Frau 15 Jahre nach der Menopause.

Im Kurzzeitversuch hatten die mit Ecd behandelten Tiere bis zu 10 % weniger Knochendichteverlust als die ovariectomierte Kontrolle. Auch im Langzeitversuch war die Knochendichte der mit Ecd behandelten Tiere bis zu 12 % höher als bei der ovariectomierten Kontrolle. Übertragen auf die Lebensspanne und den postmenopausalen Knochensubstanzverlust der Frau ist dies ein beachtliches Ergebnis. Des Weiteren wirkt Ecd nicht über die ER-Rezeptoren und löst

dementsprechend wahrscheinlich auch nicht die Nebenwirkungen der herkömmlichen HRT aus. Es ist allerdings noch nicht ersichtlich, auf welchem Weg die Wirkung von Ecd vermittelt wird, da bis heute kein Ecd-Rezeptor im Organismus von Säugetieren entdeckt werden konnte (Dinan und Lafont 2006; Bathori et al. 2008; Gorelick-Feldman et al. 2008). Vermutlich interagieren Ecdysteroide mit dem Retinoid-X-Rezeptor von Säugetieren. Letztendlich ist es aber noch nicht klar, wie Ecdysteroide im Organismus von Säugetieren funktionieren und in welcher Dosierung die optimale Wirkung erreicht wird. Dies sind Fragen, die weiter untersucht werden müssen, um den positiven Wirkmechanismus von Ecd erklären zu können.

Abschließend kann gesagt werden, dass Ecd am Modell der ovariectomierten Ratte keine Nebenwirkungen aufweist und einen signifikanten, osteoprotektiven Effekt hat. Diese Faktoren machen Ecd, im Bezug auf die Behandlung der Osteoporose, zu einer vielversprechenden Substanz, die weiter erforscht werden sollte.

## 6. Methodischer Anhang

### 6.1 Futtertabelle ssniff® R-Z, phytoöstrogenarm (sojafrei)

<b>Rohnährstoffe</b>	<b>%</b>	<b>Mineralstoffe</b>	<b>%</b>	<b>Fettsäuren</b>	<b>%</b>
Trockensubstanz	88,2	Kalzium	1	C 12:0	
Rohprotein	21,7	Phosphor	0,7	C 14:0	0,01
Rohfett	4,3	Natrium	0,19	C 16:0	0,56
Rohfaser	4,2	Magnesium	0,2	C 16:1	0,01
Rohasche	6,1	Kalium	0,76	C 18:0	0,08
N freie Extraktstoffe	52,2	<b>Aminosäuren</b>		C 18:1	0,82
Stärke	43	Lysin	1,22	C 18:2	2,26
Zucker	3	Methionin	0,44	C 18:3	0,22
<b>Vitamine</b>	<b>pro Kg</b>	Met + Cys	0,83	C 20:0	0,01
Vitamin A	15.000 IE	Threonin	0,97	C 20:1	0,02
Vitamin D <sup>3</sup>	1.000 IE	Tryptophan	0,28	C 20:5	
Vitamin E	115 mg	Arginin	1,13	C 22:6	
Vitamin K	5 mg	Histidin	0,51	<b>Spurenelemente</b>	<b>per kg</b>
Vitamin B <sup>1</sup> (Thiamin)	18 mg	Valin	1,25	Eisen	169 mg
Vitamin B <sup>2</sup> (Riboflavin)	22 mg	Isoleucin	1,03	Mangan	78 mg
Vitamin B <sup>12</sup> (Cobalamin)	20 mg	Leucin	1,95	Zink	101 mg
Vitamin B (Pyridoxin)	100 µg	Phenylalanin	1,21	Kupfer	14 mg
Nicotinsäure	120 mg	Phe + Tyr	2,2	Iod	2,2 mg
Folsäure	7 mg	Glycin	1,05	Selen	0,4 mg
Biotin	460 µg	Glutaminsäure	3,96	Cobalt	2,2 mg
Cholin – Cl	2.380 mg	Asparaginsäure	2,18	<b>Energie</b>	<b>MJ / Kg</b>
Inositol	100 mg	Prolin	1,53	Bruttoenergie	16,8
		Alanin	1,26	Umsetzbare Energie	13,3
		Serin	1,17		

Tab. 5: Futtertabelle

### 6.2 Lösungen zur subkutanen Applikation

#### Ecdyson, 2mg/ 0,2ml:

- Gesamtmenge 40 ml
- 0,4 g in 1 ml 70% EtOH gelöst
- auf 8 ml mit 2% Cremophor aufgefüllt
- mit NaCl auf das Gesamtvolumen von 40 ml aufgefüllt
- Resultat ist eine klare Lösung.

#### Ecdyson, 10mg/ 0,5ml:

- Gesamtmenge 40ml
- 0,8g in 1ml 70% EtOH gelöst
- auf 8 ml mit 2% Cremophor aufgefüllt
- mit NaCl auf das Gesamtvolumen von 40 ml aufgefüllt
- Resultat ist eine trübe Lösung.

Ecdyson, 25mg/ 0,5ml

- Gesamtmenge 40ml
- 2g in 2ml 70% EtOH gelöst
- auf 8 ml mit 2% Cremophor aufgefüllt
- mit NaCl auf das Gesamtvolumen von 40 ml aufgefüllt
- Resultat ist eine gesättigte Lösung.

Kontrollen

- 0,2 ml NaCl jeweils für 6 Tiere
- 0,2 ml 2% Cremophor jeweils für 6 Tiere.

Östradiol, 1µg/ 0,2ml

- 5 µg/ ml 17-β-Östradiol in Benzylbenzoat (B-9550, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)/ Rizinusöl 1:4.

**6.3 Tabellenverzeichnis**

Tab. 1	Stadieneinteilung der Osteoporose	8
Tab. 2	Medikamentöse Therapie der Osteoporose	10
Tab. 3	Gruppenübersicht des Kurzzeitversuchs	19
Tab. 4	Gruppenübersicht des Langzeitversuchs	21
Tab. 5	Futternabelle	59

**6.4 Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1	Struktur von normalem und osteoporot. Knochen im Vergleich	9
Abb. 2	Struktur des Knochenaufbaus	11
Abb. 3	Strukturformel des 17-β-Östradiol (E2)	12
Abb. 4	Strukturformel des 20-Hydroxyecdysen (Ecd)	16
Abb. 5	A) Übersichtsscan B) Querschnittsscan C) Farbliche Codierung	23
Abb. 6	Futteraufnahme im Kurzzeitversuchs (KZV) im Verlauf	25
Abb. 7	Futteraufnahme im Langzeitversuchs (LZV) im Verlauf	26
Abb. 8	Aufgenommene Futtermenge pro Tag im Langzeitversuch	27
Abb. 9	Körpergewicht des KZV im Verlauf	28
Abb. 10	Körpergewicht des KZV am Versuchsende	29
Abb. 11	Körpergewicht des LZV im Verlauf	30
Abb. 12	Körpergewicht des LZV am Versuchsende	31

---

Abb. 13	Ringmodell zur Berechnung der Knochenparameter	32
Abb. 14	Endosteale Dichte (ED) des KZV CT1	33
Abb. 15	Endosteale Dichte (ED) des KZV CT2	34
Abb. 16	Abbau der Endostealen Dichte (ED) des KZV in %	34
Abb. 17	Endosteale Dichte (ED) des LZV CT1	35
Abb. 18	Endosteale Dichte (ED) des LZV CT2	36
Abb. 19	Veränderung der Endostealen Dichte (ED) des LZV in %	36
Abb. 20	Intraosteale Fläche (IF) des KZV CT1	37
Abb. 21	Intraosteale Fläche (IF) des KZV CT2	38
Abb. 22	Veränderung der Intraostealen Fläche (IF) des LZV in %	38
Abb. 23	Intraosteale Fläche (IF) des LZV CT1	39
Abb. 24	Intraosteale Fläche (IF) des LZV CT2	40
Abb. 25	Veränderung der Intraostealen (IF) Fläche des LZV in %	40
Abb. 26	Kortikale Dichte (KD) des KZV CT1	41
Abb. 27	Kortikale Dichte (KD) des KZV CT2	42
Abb. 28	Veränderung der Kortikalen Dichte (KD) des KZV in %	42
Abb. 29	Kortikale Dichte (KD) des LZV CT1	43
Abb. 30	Kortikale Dichte (KD) des LZV CT2	44
Abb. 31	Veränderung der Kortikalen Dichte (KD) des LZV in %	44
Abb. 32	Osteokalzin (OC) im KZV	45
Abb. 33	Osteokalzin (OC) im LZV	46
Abb. 34	CrossLaps (CL) im LZV	47

## 7. Literaturverzeichnis

Bathori M, Toth N, Hunyadi A, Marki A, Zador E (2008): Phytoecdysteroids and anabolic-androgenic steroids--structure and effects on humans. *Curr Med Chem* 15, 75-91.

Baudino TA, Kraichely DM, Jefcoat SC Jr, Winchester SK, Partridge NC, MacDonald PN (1998): Isolation and characterization of a novel coactivator protein, NCoA-62, involved in vitamin D-mediated transcription. *J Biol Chem* 273, 16434-41.

Beral V (2003): Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362, 419-27.

Berchtold R, Hamelmann H, Peiper HJ, Bruch HP, Trentz O: *Chirurgie*. 5. Auflage, Urban&Fischer Verlag, München 2006, 456-60.

Berger J, Moller DE (2002): The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 53, 409-35.

Catalan RE, Martinez AM, Aragones MD, Miguel BG, Robles A, Godoy JE (1985): Alterations in rat lipid metabolism following ecdysterone treatment. *Comp Biochem Physiol B* 81, 771-5.

Coelingh Bennink HJ, Heegaard AM, Visser M, Holinka CF, Christiansen C (2008): Oral bioavailability and bone-sparing effects of estetrol in an osteoporosis model. *Climacteric* 11 Suppl 1, 2-14.

Deutsche Forschungsgemeinschaft: DFG Forschergruppe 793 ([www.biomechanics.de/dfg793/vernetzung.html](http://www.biomechanics.de/dfg793/vernetzung.html)). Letzter Zugriff 25.04.2011.

Dinan L, Lafont R (2006): Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. *J Endocrinol* 191, 1-8.

DVO 2009: Leitlinie zur Diagnostik, Prophylaxe und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen (Langfassung). Dachverband Osteologie e.v. 04/2009, 304; [www.dv.-osteologie.de](http://www.dv.-osteologie.de)

Farmer PK, He X, Schmitz ML, Rubin J, Nanes MS (2000): Inhibitory effect of NF-kappaB on 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and retinoid X receptor function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E213-20.

Ferretti JL, Cointry GR, Capozza RF, Frost HM (2003): Bone mass, bone strength, muscle-bone interactions, osteopenias and osteoporoses. *Mech Ageing Dev* 124, 269-79.

Flieger J, Karachalios T, Khaldi L, Raptou P, Lyritis G (1998): Mechanical stimulation in the form of vibration prevents postmenopausal bone loss in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 63, 510-4.

French DL, Muir JM, Webber CE (2008): The ovariectomized, mature rat model of postmenopausal osteoporosis: An assessment of the bone sparing effects of curcumin. *Phytomedicine* 15(12), 1069-78. Epub 2008 Aug 6.

Garner SC, Anderson JJ, Mar MH, Parikh I (1991): Estrogens reduce bone loss in the ovariectomized, lactating rat model. *Bone Miner* 15, 19-31.

Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H (2006): International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacol Rev* 58, 712-25.

Gorelick-Feldman J, Maclean D, Ilic N, Poulev A, Lila MA, Cheng D, Raskin I (2008) Phytoecdysteroids increase protein synthesis in skeletal muscle cells. *J Agric Food Chem* 56, 3532-7.

Gossauer A: Struktur und Reaktivität der Biomoleküle. Eine Einführung in die organische Chemie. 1.Auflage; Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich 2006, 273.

Guerre-Millo M, Gervois P, Raspe E, Madsen L, Poulain P, Derudas B, Herbert JM, Winegar DA, Willson TM, Fruchart JC, Berge RK, Staels B (2000): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *J Biol Chem* 275, 16638-42.

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, 401-9.

Hertrampf T, Degen GH, Kaid AA, Laudenschach-Leschowsky U, Seibel J, Di Virgilio AL, Diel P (2006): Combined effects of physical activity, dietary isoflavones and 17beta-estradiol on movement drive, body weight and bone mineral density in ovariectomized female rats. *Planta Med* 72, 484-487.

Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S (1999): Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid induced osteoporosis. *Endocrinology* 140(10), 4382-9.

Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Munday GR, Boyce BF (1996): Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med* 2(10), 1132-1136.

Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E (1998): Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* 280, 605-13.

Junqueira LC, Carneiro J, Gratzl M: Histologie. 5. Auflage; Springer Verlag, Heidelberg 2002.

- Kapur P, Jarry H, Wuttke W, Pereira BM, Seidlova-Wuttke D (2008): Evaluation of the antiosteoporotic potential of *Tinospora cordifolia* in female rats. *Maturitas* 59, 329-38.
- Korach KS, Emmen JM, Walker VR, Hewitt SC, Yates M, Hall JM, Swope DL, Harrell JC, Couse JF (2003): Update on animal models developed for analyses of estrogen receptor biological activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86(3-5), 387-91.
- Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S and Gustafsson JA (1996): Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 5925-5930
- Liegibel UM, Sommer U, Boercsoek I, Hilscher U, Bierhaus A, Schweikert HU, Nawroth P, Kasperk C (2003): Androgen receptor isoforms AR-A and AR-B display functional differences in cultured human bone cells and genital skin fibroblasts. *Steroids* 68(14), 1179-87.
- Luu Y, Capilla E, Rosen C, Gilsanz V, Pessin J, Judex S, Rubin CT (2009): Mechanical Stimulation of Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation Promotes Osteogenesis While Preventing Dietary Induced Obesity. *J Bone Miner Res* 24(1), 50-61
- Manolagas SC (2000): Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *End Rev* 21(2) 115-137.
- Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels B, Wahli W (2006): International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 58, 726-41.
- Nagpal S, Lu J, Boehm MF(2001): Vitamin D analogs: mechanism of action and therapeutic applications. *Curr Med Chem* 8, 1661-79.
- Peleg S, Uskokovic M, Ahene A, Vickery B, Avnur Z (2002): Cellular and molecular events associated with the bone-protecting activity of the noncalcemic vitamin D analog Ro-26-9228 in osteopenic rats. *Endocrinology* 143, 1625-36.
- Perry MJ, Gujra S, Whitworth T, Tobias JH (2005): Tamoxifen stimulates cancellous bone formation in long bones of female mice. *Endocrinology* 146, 1060-5.
- Pfeilschifter J, Pientka L, Scheidt-Nave CH (2003): Osteoporosis in germany – a stock taking. *MMW Fortschr Med* 145(9), 42-3.
- Riggs BL, Khoshla S, Melton LJ 3rd. (2002): Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev Jun* 23(3): 279-302
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women:

principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288, 321-33.

Rubin C, Turner AS, Mallinckrodt C, Jerome C, McLeod K, Bain S (2002): Mechanical strain, induced noninvasively in the high-frequency domain, is anabolic to cancellous bone, but not cortical bone. *Bone* 30, 445-52.

Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Becker T, Christoffel V, Wuttke W (2003a): Pharmacology of *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. *Maturitas* 44 Suppl 1, S39-50.

Seidlova-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T, Wuttke W (2003b): Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: comparison with estradiol-17beta. *Eur J Endocrinol* 149, 351-62.

Seidlova-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, 321-7.

Seidlova-Wuttke D, Prella K, Fritzeimer 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, 849-55.

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):121-6.

Seidlová-Wuttke D, Christel D, Kapur P, Nguyen BT, Jarry H, Wuttke W (2010b) Beta-ecdysone has bone protective but no estrogenic effects in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17(11), 884-9.

Semeikin AV, Stanevskaja T, Chermnykh NS, Sergeev PV (1991): The mechanism of the thymolytic action of anabolic steroids. *Farmakol Toksikol* 54, 37-8.

Sheng ZF, Dai RC, Wu XP, Fang LN, Fan HJ, Liao EY(2007): Regionally specific compensation for bone loss in the tibial trabeculae of estrogen-deficient rats. *Acta Radiol* 48, 531-9.

Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW (2000): Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(14), 7829-34.

Shiraishi A, Takeda S, Masaki T, Higuchi Y, Uchiyama Y, Kubodera N, Sato K, Ikeda K, Nakamura T, Matsumoto T, Ogata E (2000): Alfacalcidol inhibits bone resorption and stimulates formation in an ovariectomized rat model of osteoporosis: distinct actions from estrogen. *J Bone Miner Res* 15, 770-9.

Spiteller M, Bahadir M, Parlar H: Springer Umweltlexikon. 2. Auflage; Springer Verlag, Hamburg 2000, 351.

Stürmer EK, Seidlová-Wuttke D, Sehmisch S, Rack T, Wille J, Frosch KH, Wuttke W, Stürmer KM (2006): Standardized bending and breaking test for the normal and osteoporotic metaphyseal tibias of the rat: effect of estradiol, testosterone, and raloxifene. *J Bone Miner Res* 21(1), 89-96. Epub 2005 Sep 26.

Thomas HE, Stunnenberg HG, Stewart AF (1993): Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle. *Nature* 362, 471-5.

Trebsdorf M: Biologie, Anatomie, Physiologie. Lau-Verlag, Reinbek 2000. Übernommen aus [www.biofachforum.ch/biofile1/zushummusk2.html](http://www.biofachforum.ch/biofile1/zushummusk2.html). Letzter Zugriff 25.04.2011

Wegorzewska IN, Walters K, Weiser MJ, Cruthirds DF, Ewell E, Larco DO, Handa RJ, Wu TJ (2008): Postovariectomy weight gain in female rats is reversed by estrogen receptor alpha agonist, propylpyrazoletriol. *Am J Obstet Gynecol* 199, 67 e1-5.

Wei M, Yang Z, Li P, Zhang Y, Sse WC (2007): Anti-osteoporosis activity of naringin in the retinoic acid-induced osteoporosis model. *Am J Chin Med* 35, 663-7.

Weston AD, Hoffman LM, Underhill TM (2003): Revisiting the role of retinoid signaling in skeletal development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69, 156-73.

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, 1-192.

Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM (1993): Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* 366, 476-9.

Zhu J, Chen L, Raikhel AS (2007): Distinct roles of Broad isoforms in regulation of the 20-hydroxyecdysone effector gene, Vitellogenin, in the mosquito *Aedes aegypti*. *Mol Cell Endocrinol* 267, 97-105.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. med. W. Wuttke bedanken, der es mir ermöglichte in seiner Abteilung über ein anspruchsvolles und spannendes Thema zu promovieren.

Besonderer Dank gebührt Frau Dr. med. D. Seidlová-Wuttke, die für Fragen stets ein offenes Ohr hatte. Ihre kompetente Unterstützung, vom ersten Tag der experimentellen Studie bis zum letzten geschriebenen Satz, hat das Leben eines geplagten Doktoranden sehr erleichtert.

Selbstverständlich gilt mein Dank auch den Mitarbeiterinnen der Abteilung Frau S. Lüdemann, Frau H. Brüggemann-Meyer und Frau C. Neitzel, ohne die ein Reibungsloser Versuchsablauf nicht möglich gewesen wäre.

## Lebenslauf

Am 06.07.1976 wurde ich, David Christel, als drittes Kind von Gerlinde Christel und Dr. med. Wolfgang Christel in Detmold / Ostwestfalen-Lippe geboren.

Von 1982 bis 1986 besuchte ich die Von-Haxthausen-Grundschule und von 1986 bis 1996 das städtische Gymnasium in Barntrup. Im Jahr 1999 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen. Im Laufe des Jahres 2007 begann ich unter Leitung von Prof. Dr. W. Wuttke die experimentellen Arbeiten zu dieser Dissertation in der Abteilung für klinische und experimentelle Endokrinologie im Bereich Gynäkologie der Universität Göttingen. Im Jahr 2009 beendete ich erfolgreich das Studium der Humanmedizin mit der Approbation als Arzt.