

**Aus der Arbeitsgruppe Endokrinologie
(Prof. Dr. med. W. Wuttke)**

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Auswirkungen von 20-Hydroxyecdysen (β -Ecdysen) im Vergleich zu 17- β -
Östradiol auf den Knochenaufbau und Knochenstoffwechsel der Ratte als Modell für
die postmenopausale Osteoporose der Frau

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

vorgelegt von
Birthe Dettmer
aus
Celle

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

- I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Wuttke (Betreuer)
- II. Berichterstatter: Priv.Doz. Dr. med. Tezval (Korreferent)
- III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Oppermann (Promotor)

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Die postmenopausale Osteoporose der Frau.....	2
1.2 Die Hormonersatztherapie (HET).....	5
1.3 Östrogene.....	6
1.4 Ecdysteroide / Ecdyson.....	8
1.4.1 Ecdysteroid-Rezeptoren.	11
1.5 Die allgemeinen Grundlagen des Knochenaufbaus.....	12
1.5.1 Der anatomische Aufbau des Knochens.....	12
1.5.2 Die zellulären Bestandteile des Knochens.....	13
1.5.3 Das Knochenmark.....	14
1.5.4 Lipotoxizität und Knochenmark.....	14
1.6 Knochenstoffwechsel	16
1.6.1 Osteoprotegerin.....	16
1.6.2 RANK und RANKL.....	17
1.6.3 Osteocalcin.....	18
1.7 Knochenqualität und Osteoporose.....	19
1.8 Die Ratte als Tiermodell für Osteoporose.....	20
1.9 Zielsetzung.....	22

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuch.....	24
2.1.1 Versuchstiere.....	24
2.1.2 Haltungsbedingungen.....	24
2.1.3 Zeitlicher Versuchsablauf.....	24
2.1.4 Testsubstanzen.....	25
2.1.5 Ovariectomie.....	26
2.2 Herstellung der Knochenpräparate.....	26
2.2.1 Acrylat-Einbettung.....	26

2.2.2 Herstellung der Präparat-Schnitte.....	26
2.2.3 Färbung der Präparate.....	26
2.3 Histologische Auswertung.....	27
2.3.1 Bestimmung der metaphysären und diaphysären Kortikalisdicke.....	28
2.3.2 Bestimmung der relativen Anteile von Trabekeln, rotem und gelbem Mark am Knochengewebe in der Metaphyse.....	28
2.3.3 Methoden zur Beschreibung von Trabekel­eigenschaften und des trabekulären Netzwerkes.....	30
2.4 Statistische Methoden.....	31

3 Ergebnisse

3.1 Tiergewichte.....	32
3.1.1 Tiergewicht Versuchsende.....	33
3.1.2 Gewichtszunahme.....	34
3.2 Knochenhistologie.....	35
3.2.1 Tibialänge.....	37
3.2.2 Kortikalisdurchmesser der Diaphyse.....	38
3.2.3 Kortikalisdurchmesser der Metaphyse.....	39
3.2.4 Rotes Knochenmark.....	40
3.2.5 Gelbes Knochenmark.....	42
3.2.6 Trabekel.....	43
3.2.7 Nodes.....	45
3.2.8 Termini.....	46
3.2.9 Trabekuläres Netzwerk.....	47
3.3 Analyse der Knochenumbau­marker im Serum.....	48
3.3.1 Serum-Osteocalcin.....	48
3.3.2 Serum-Osteoprotegerin.....	49
3.3.3 Serum-RANKL.....	50
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	51

4 Diskussion	
4.1 Ziel der Studie.....	53
4.2 Wirkung auf das Körpergewicht.....	54
4.3 Wirkung auf den Knochen.....	55
4.3.1 Wirkung auf die Tibialänge.....	57
4.3.2 Wirkung auf die Histomorphologie des Knochens.....	58
4.4 Wirkung auf die Serum-Parameter des Knochenstoffwechsels.....	60
4.4.1 Osteoprotegerin-Werte.....	61
4.4.2 RANKL-Werte.....	62
4.4.3 Osteocalcin-Werte.....	62
4.5 Limitierung der Studie.....	63
5 Zusammenfassung.....	65
6 Anlagen.....	67
7 Literaturverzeichnis.....	68

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
B.Ar	Knochenfläche (Ar = Maßeinheit der Fläche)
BGP	Bone γ -carboxyglutamic acid-containing protein
BMC	Bone mineral content
BMD	Bone mineral density
BMI	Body mass index
BV	Bone volume
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa
CA	Karzinom
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
cm ³	Kubikcentimeter
d.h.	das heißt
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DVO	Dachverband Osteoporose
D(E)XA	Dual-(Energy)-X-Ray.Absorption
E1	Östron
E2	Östradiol
E3	Östriol
Ec	Ecdyson
20-Ec	20-Hydroxyecdyson
EcR	Ecdysteroidrezeptor
ER	Östrogenrezeptor
evtl.	eventuell
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g	Gramm
g/d	Gramm pro Tag
GmbH	Gesellschaft mit begrenzter Haftung
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
HET	Hormonersatztherapie
I.E.	Internationale Einheiten

i.v.	intravenös
KM	Knochenmark
KPS	Klimakterisch-postmenopausales Syndrom
LH	Luteinisierendes Hormon
mg	Milligramm
mg/d	Milligramm pro Tag
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µm ²	Quadratmikrometer
MMA	Methylmethacrylat
n	number (= Anzahl der Versuchstiere)
Nd	Nodes (=Knoten)
NF	Nekrosefaktor
NIH	National Institute of Health
OCIT	Osteoclast inhibitory factor
OPAC	Office proficiency assessment & certification
OPG	Osteoprotegerin
ovx.	ovarektomiert
Pbm	Peak bone mass
Pkt.	Punkt
p.o.	per os
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PTH	Parathormon
qCT	quantitative Computer-Tomographie
RANK	Receptor activator of NF-κB
RANKL	RANK-Ligand
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichungen
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
SERM	Selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator
sf	sojafrei
Tab.	Tabelle
T. Ar	Trabekelfläche

Tm	Termini
TNF	Tumornekrosefaktor
TV	Trabecular volume
USA	United States of America
v. a.	vor allem
WHI	Women's Health Initiative
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel
ZTE	Zentrale Tiereinrichtung

1 Einleitung

Die auf dem klimakterisch bedingten Östrogenmangel basierende Osteoporose der Frau zählt derzeit zu einer der häufigsten Erkrankungen des postmenopausalen Lebensabschnittes. In den letzten Jahren sind verschiedenste Ansätze zur Therapie der postmenopausalen Osteoporose auf der Grundlage klinischer Studien publiziert und diskutiert worden. Nicht immer zeigen die hierbei verwendeten Substanzen nur positive Effekte und sind teilweise auf Grund der mit der Dauer der Anwendung steigenden unerwünschten Nebenwirkungen, wie z.B. bei der klassischen Hormonersatztherapie (HET), lediglich zeitlich begrenzt einsetzbar. Zudem zielt der Großteil der heute zur Verfügung stehenden Präparate rein auf die Therapie der bereits manifesten Krankheit und nicht auf prophylaktische Verfahren. Gerade bei der aktuellen demographischen Entwicklungslage mit steigender Lebenserwartung der Bevölkerung und der damit einhergehenden zunehmenden Prävalenz der postmenopausalen Osteoporose sollten jedoch insbesondere präventive Substanzen in den Focus der Forschung rücken. Die Suche nach alternativen, präventiven Therapiemöglichkeiten ist dementsprechend von großem wissenschaftlichem und nicht zuletzt auch wirtschaftlichem Interesse.

Ziel der vorliegenden Studie ist es nun, die verwendete Substanz 20-Hydroxyecdysen (β -Ecdysen) hinsichtlich dieser Ansprüche einzuordnen. Dieses zur Gruppe der Ecdysteroide gehörige Hormon kommt in Anthropoden und in der Pflanzenwelt vor (Schmelz et al. 2002). In verschiedenen Studien konnte bereits ein anaboler Effekt der Hormone auf den Proteinstoffwechsel, das Muskel- und Längenwachstum, die Zellproliferation und -differenzierung demonstriert werden (Syrov 1984).

Für die Untersuchungen der Ecdysen-Auswirkungen auf den Knochen im Vergleich zu Östrogenen setzen wir die weibliche ovariectomierte Ratte als ein seit langem etabliertes Osteoporosemodell ein, da sie bei endokrinologischen Fragestellungen zahlreiche Parallelen zur menschlichen Physiologie aufweist (Kalu et al. 1991).

1.1 Die postmenopausale Osteoporose der Frau

Die Osteoporose wird als eine Erkrankung des Skelettsystems definiert, die für ein erhöhtes Frakturrisiko prädisponiert und der eine verminderte Knochendichte (bone mineral density, BMD) und Knochenfestigkeit zugrunde liegen (Kanis 1994).

Eine Osteoporose liegt laut WHO dann vor, wenn die BMD um mehr als 2,5 Standardabweichungen (SD) vom Mittelwert des Referenzkollektives gesunder Erwachsener gleicher Rasse und gleichen Geschlechts abweicht (Kanis 1994).

Normalbefund	BMD > -1.0 SD unter der Pbm
Osteopenie	BMD - 1.0 SD bis -2.5 SD unter der Pbm
Osteoporose	BMD ≤ -2.5 SD unter der Pbm
Schwere / manifeste Osteoporose	BMD ≤ -2.5 SD unter der Pbm + ≥ 1 Frakturen

Tab. 1: Osteoporosestadien (definiert nach der Abweichung vom Mittelwert der Knochendichte gesunder Erwachsener (20-40 Jahre). T-Score = Knochendichte in Prozent der mittleren Knochendichte von 20-40 Jährigen (differenziert nach Geschlecht); Pbm = peak bone mass.

Einer Definition des nordamerikanischen National Institute of Health (NIH) zufolge, rückt die Knochenmasse bzw. Knochendichte zugunsten der Knochenqualität in den Hintergrund, welche eine wichtige Rolle in der Ätiologie der Osteoporose spielt. Der Begriff Knochenqualität wird hierbei repräsentiert durch die Mikroarchitektur und Materialeigenschaften des Knochens sowie den Knochenumbau (NIH 2000).

Bei ca. 30 % aller Frauen kommt es in der Menopause zu einer postmenopausalen Osteoporose, welche zu den primären Osteoporoseformen gehört, und die insbesondere in einem Verlust der trabekulären Knochenstrukturen resultiert (Sipos et al. 2009).

Der Knochen unterliegt auch beim Gesunden einer ständigen Erneuerung (Remodeling), bestehend aus osteoklatärem Ab- sowie osteoblastärem Aufbau. Bei an Osteoporose erkrankten Patienten ist dieses physiologische Gleichgewicht nachhaltig gestört. Es kommt durch das postmenopausale Östrogendefizit (s.u.) sowohl zu einer Hochregulation der Osteoklasten als auch der Osteoblasten, wobei aber im Verhältnis das resorptive Potential der Osteoklasten überwiegt und somit eine negative Knochenbilanz, d.h. ein Knochenverlust, resultiert (Rosen CJ 2000).

Man unterscheidet zwischen der High-turnover-Osteoporose - hier überwiegt der osteoklastäre Abbau - und der Low-turnover-Osteoporose, bei der der osteoblastäre Anbau vermindert ist (Wüster und Ziegler 1999).

Ursächlich für die postmenopausale Form der Osteoporose ist das während des Klimakteriums aus der nachlassenden Ovarialfunktion resultierende Östrogendefizit auf Grund des physiologischen ovariellen Alterungsprozesses (Göretzlehner und Lauritzen 2000).

Dies ist auch der Grund, warum im Vergleich zu gleichaltrigen Männern wesentlich häufiger Frauen mit 80 % aller Osteoporose-Patienten von der Osteoporose allgemein betroffen sind (Schmidt-Matthiesen und Wallwiener 2004). Bei weltweit ca. 200 Millionen (Cooper 1999) erkrankten Menschen stellen die primäre Osteoporose und damit im Zusammenhang stehende Frakturen (70 % aller distaler Radiusfrakturen, 80-90 % aller Oberschenkelhals- und Wirbelkörper-Frakturen (DVO 2006)) vor allem in der westlichen Welt ein bedeutendes öffentliches gesundheitspolitisches Problem dar, da sie mit hoher Morbidität und Mortalität, aber auch mit hohen Gesundheitskosten durch die therapeutisch notwendigen Krankenhausaufenthalte verbunden sind (Samelson und Hannan 2006).

Die Diagnosestellung der Osteoporose stützt sich auf mehrere Säulen, die in ihrer Wertigkeit unterschiedlich zu beurteilen sind. Bildgebende Verfahren wie die Osteodensitometrie oder das konventionelle Röntgen sind hinlänglich bekannt. Im Folgenden wird nun auf die in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden näher eingegangen.

Da sich die Variabilität in der Knochenfestigkeit nur zum Teil durch die Knochendichte erklären lässt, spielen zunehmend auch mikroarchitektonische Merkmale bezüglich der knochenmechanischen Kompetenzen eine unterstützende Rolle (Dempster 2003). Kombinationen aus Knochenvolumen und Mikroarchitektur lassen verbesserte Schlüsse zur Bewertung der Knochenqualität zu (Carbonare et al. 2005).

Die Strut-Analyse, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, ist hierfür eine gute Methode. Sie kann auf histologische Verfahren angewandt werden. Es handelt sich hierbei um ein spezielles Procedere, mit welchem die zweidimensionale Struktur des trabekulären Knochens quantifiziert werden kann. Hierfür werden Nodi (Nd), die sich

durch den Kreuzungspunkt von zwei oder mehr Knochen-Trabekeln ergeben, und Enden (Termini) der trabekulären Strukturen, die Unterbrechungen im trabekulären Netzwerk repräsentieren, bestimmt (Numayama et al. 2002) (s.a. unter Material und Methoden, 2.3.3, Seite 30).

Eine histologische Untersuchung mittels Acrylat-Einbettung erlaubt eine exakte Einschätzung der Knochenarchitektur und -struktur, des Mineralisationsgehaltes des Knochens, des Knochenmarkes und des Knochenremodeling. Ebenso können frakturrelevante Parameter wie die Trabekeldicke und -verteilung oder ihr Vernetzungsgrad aufgezeigt werden (Gerok et al. 2007). Diese Verfahren werden gegenwärtig jedoch durch eine Kombination aus Knochendichtemessung und Bestimmung biochemischer Remodeling-Marker und Hormonspiegel weitestgehend ersetzt (Kasper et al. 2005).

Laboruntersuchungen im Rahmen der Osteoporosediagnostik, die nicht in erster Linie dem Nachweis oder Ausschluss sekundärer Ursachen (z.B. endokrin, myelogen) einer Osteoporose dienen, zählen derzeit zur „Superdiagnostik“. Ein prophylaktischer Einsatz zur Früherkennung der postmenopausalen Osteoporose besteht aktuell (noch) nicht. Neben relevanten Parametern für den Knochenstoffwechsel (Parathormon, gonadale Hormone) können sogenannte Knochenumbau-marker, z.B. Osteocalcin, Osteoprotegerin, RANKL/RANK, bestimmt werden, welche Aufschluss über das aktuelle Ausmaß des Knochenan- bzw. -abbaus geben können. Eine über diese Marker gewonnene Einschätzung der Remodeling-Rate ist v. a. zur Kontrolle des Therapieerfolges einer Osteoporose hilfreich (Kasper et al. 2005).

Vor dem Hintergrund der epidemiologischen Aspekte werden seit Jahren von der Pharmaindustrie knochenwirksame Substanzen zur Prävention bzw. Therapie der postmenopausalen Osteoporose (weiter-)entwickelt.

Die nachstehende Tabelle soll einen Überblick über die aktuellen prophylaktischen und therapeutischen allgemeinen Empfehlungen und die spezifische medikamentöse Therapie geben.

Prophylaxe	Calcium 1200-1500mg
	Sonnenlicht bzw. Vit. D3 400-1200 I.E.
	Bewegung (3-4x/Woche mind. 30 min)
	Ecdyson? (Gegenstand dieser Arbeit)
Therapie	Bisphosphonate: Alendronat (Fosamax), Risedronat (Actonel), Ibandronat (Boniva), Etidronat, Zoledronat
	selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren: Raloxifen (Evista)
	Parathormon-Derivate: 1-34 PTH-Teriparatid, 1-84-PTH
	Strontiumralenat: Protelos (2g/d über 3 Jahre)
	humaner RANKL-Antikörper: Denosumab (0,1-3mg/kg s.c.)
	Clodronate (800 mg/d über 3 Jahre)

Tab. 2: Prophylaxe und Therapie der Osteoporose.

1.2 Die Hormonersatztherapie (HET)

Die medikamentöse Behandlung des klimakterischen Syndroms und der Osteoporose beruhte auf der Hormonersatztherapie durch die Behebung des Östrogenmangels und wird zur Linderung von vegetativen und psychischen Symptomen bei peri- und postmenopausalen Frauen eingesetzt. Seit dem Abbruch der 1993 gestarteten, 161.809 postmenopausale Frauen einschließenden, Women's Health Initiative (WHI) Studie im Jahre 2002, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Herzerkrankungen, Schlaganfällen, Venenthrombosen und Brustkrebs zeigte, ist die HET mit einer gewissen Verunsicherung verbunden und sollte differenziert betrachtet werden (Ettinger et al. 2003, Rossouw et al. 2002). Der Einsatz von Östrogenen bei der klassischen Form der HET ist auf Grund der oben genannten potenziellen unerwünschten Nebenwirkungen mit Zurückhaltung vorzunehmen und sollte nur bei klarer Indikationsstellung, z.B. bei starker Beeinträchtigung der Lebensqualität auf Grund vegetativer Symptome der Patientin, greifen.

Östrogen-Gestagen-Kombinationspräparate sind dann das Mittel der Wahl, um die Nebenwirkungsquote so gering wie möglich zu halten, da unter alleiniger Östrogentherapie ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Endometrium-Karzinomen nachgewiesen werden konnte (Boroditsky 2000).

Die Therapiedauer ist ebenfalls sehr variabel und erstreckt sich von ein bis zwei Jahren bei typischen vegetativen Beschwerden und mehreren Jahren bei Osteoporose-Gefahr. Eine Langzeittherapie ist obsolet.

Bereits die Verabreichung niedriger Dosen (0,3 mg konjugierte Östrogene; 0,5 mg oral oder 25 µg transdermal appliziertes Östradiol) kann den postmenopausalen Knochenmasseverlust senken und eine Reduktion des Frakturrisikos (Schenkelhals- und Wirbelkörperfrakturen) bewirken (Beckmann et al. 2003).

Das verfolgte Ziel der HET, gezielt die von einer Patientin geäußerten Beschwerden positiv zu beeinflussen ohne gleichzeitig auf andere Organe mit Östrogenrezeptoren (ER) einzuwirken, konnte durch die Entwicklung von selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM's) vorangetrieben werden. SERM's rufen in den verschiedenen mit ER ausgestatteten Geweben sowohl Östrogen-agonistische wie auch antagonistische Effekte hervor (Bramlett und Burris 2003). Zu dieser Substanzklasse gehören z.B. die erfolgreich in der hormonellen Mamma-CA-Therapie eingesetzten Tamoxifen und Raloxifen, wobei das später entwickelte Raloxifen eine geringere agonistische Wirkung am Endometrium und somit weniger Endometrium-Hyperplasien hervorruft (Stygar et al. 2003).

1.3 Östrogene

Die relevantesten natürlichen Östrogene sind Östradiol, Östron und Östriol. Sie gehören zur Familie der Steroidhormone und besitzen ein Grundgerüst aus 18 C-Atomen. Unterschiede bestehen in der Anzahl und Anordnung der Hydroxylgruppen am Kohlenstoffgerüst sowie in der biologischen Aktivität der einzelnen Substanzen. Während Östradiol die biologisch höchste Wirksamkeit aufweist, erreichen Östron und Östriol mit 1/3 beziehungsweise 1/10 nur noch einen Bruchteil der Aktivität des Östradiol (Stauder und Weyerstahl 2005).

Hauptsyntheseort sind die Granulosazellen des Ovars bei der prämenopausalen Frau. Ebenso werden Östrogene in geringem Maß in der Nebennierenrinde gebildet. Während der Schwangerschaft kommt es in der Plazenta zur Östrogenproduktion. Bei der postmenopausalen Frau sind dagegen das Fettgewebe und die Haut

Hauptproduktionsorte von Östrogenen. Weiterhin ist in Geweben wie Knochen, Muskel und Nerven Aromataseaktivität nachweisbar (Nelson und Bulun 2001). Zielgewebe der Östrogene sind der Genitaltrakt, die Brustdrüse, das kardiovaskuläre sowie das skelettale System, in denen sie zur Zellproliferation und Differenzierung der einzelnen Gewebe beitragen (Gruber et al. 2002).

Am Knochen exprimieren sowohl Osteoklasten als auch Osteoblasten Östrogenrezeptoren. Die Östrogene sind hier also, neben anderen Faktoren, für das Gleichgewicht von Resorptions- und Aufbauvorgängen mitverantwortlich. Insgesamt wirken die Östrogene allerdings antiresorptiv, indem sie die Osteoklasten direkt hemmen (Gruber et al. 2002). Bei der postmenopausalen Frau sowie auch bei der ovariectomierten Maus konnte gezeigt werden, dass verminderte Östrogenspiegel unter anderem über eine vermehrte Synthese von Interleukin-6 und -1 sowie TNF α die Osteoklasten-Differenzierung stimulieren, so dass es zu einem Knochendichteverlust und zu einem erhöhten Frakturrisiko kommt (Jilka 1998). Signifikant sind diese Merkmale im trabekulären Knochen des Femurs, der Wirbel und des distalen Radius zu beobachten. Östrogene eignen sich somit zur Osteoporosetherapie, indem sie das Frakturrisiko bei den betroffenen Frauen minimieren und den Knochendichteverlust aufhalten (Christiansen et al. 1981). Die Effekte der Östrogene werden von manchen Autoren in zwei Phasen unterteilt: die frühe Phase, in der initial über die Osteoblasten der Knochenaufbau stimuliert wird und eine spätere Phase, in der das Knochen-Remodeling inhibiert wird (Turner et al. 1999).

Neben diesen Osteoporose-hemmenden skelettalen Einflüssen der Östrogene existieren auch extraskelettale Prozesse, die bei Östrogenmangel die Pathophysiologie der Osteoporose fördern. Zu diesen gehören eine unter anderem erhöhte renale Calcium-Exkretion und verminderte intestinale Calcium-Aufnahme (Gennari et al. 1990). Unter Östrogen-Substitution steigt die intestinale Calcium-Resorption wieder an (Gallagher et al. 1979).

Ihre Wirkung erzielen Östrogene über intrazelluläre nukleäre Hormonrezeptoren (Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren). Die beiden physiologisch vorkommenden Formen der Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β werden unter anderem auch im Knochengewebe exprimiert (Kuiper et al. 1996).

Die Funktion beider Rezeptoren ist noch nicht im Detail geklärt, zusammenfassend kann ihre Wirkweise aber mit der von Lindberg et al. 2003 benannten „Yin-Yang-Theorie“ beschrieben werden, nach welcher ER- β modulierend Einfluss auf die Transkriptionsaktivierung von ER- α nimmt. Das Verteilungsmuster der ER ist in den einzelnen Geweben unterschiedlich. Am Knochen wird in der Substantia compacta von Osteozyten, Osteoblasten und Chondrozyten v. a. ER- α exprimiert, über welchen das proliferative Geschehen in dieser Zone vermittelt wird. Damit hat ER- α v. a. Bedeutung für die Festigkeit des Knochens und das Längenwachstum (Hertrampf et al. 2007). Über ER- β wird am Knochen überwiegend die Zelldifferenzierung in der Spongiosa dominiert. Der ER- α vermittelt am Knochen den anteilig größten Östrogeneffekt auf die Knochenzellen, während der ER- β eher modulierend durch antagonistische Effekte auf den ER- α wirkt (Hall und McDonnell 1999). Die Effekte auf zellulärer Ebene werden über verschiedene molekulare Mechanismen umgesetzt (Riggs et al. 2002). Hierzu zählt beispielsweise die vermehrte Bildung von Osteoprotegerin unter Östrogen-Einfluss (Hofbauer et al. 1999) und die konsekutive Hemmung der Osteoklastenfunktion. Eine zusätzliche Hemmung der Osteoklastenfunktion wird durch die unter Östrogenen vermehrte Bildung des Transforming Growth Factor- β vermittelt (Hughes et al. 1996). Zusätzlich werden Osteoklasten-stimulierende Faktoren durch die Anwesenheit von Östrogenen unterdrückt (Riggs et al. 2002).

1.4 Ecdysteroide / Ecdyson

Ecdysteroide zählen zu den polyhydroxylierten Steroidhormonen und kommen in Anthropoden und in der Pflanzenwelt (Phytoecdysteroide) vor (Galbraith et al. 1967). Das in der vorliegenden Studie untersuchte und zur Gruppe der Ecdysteroide gehörende 20-Hydroxyecdyson (β -Ecdyson) ist das Extrakt einer Pflanze (*Tinospora cordifolia*) und zählt somit zu den Phytohormonen. Für verschiedene Phytohormone konnte bereits ein positiver Einfluss auf den Knochenstoffwechsel und die Knochendichte nachgewiesen werden (Pie et al. 2006, Seidlová-Wuttke et al. 2003). Über 300 verschiedene, der Gruppe der Ecdysteroide zugehörige Hormone, wurden seit der Isolierung von Ecdyson 1954 durch Butenandt und Karlson aus Larven des Seidenspinners (*Bombyx mori*) identifiziert (Lafont und Dinan 2003). Zu den Ecdyson produzierenden Pflanzen zählt z.B. *Tinospora cordifolia*, der anti-osteoporotische Effekte nachgewiesen werden konnten (Kapur et al. 2008).

Die chemischen Unterschiede der Ecdysteroide ergeben sich aus der Anzahl der C-Atome, dem Vorkommen von Keto-Gruppen, der Anzahl von Hydroxyl-Gruppen, der Stereochemie am C-5 sowie der Konjugation von Alkoholgruppen mit unpolaren und polaren Substituenten (Lafont 1997).

Hauptbildungsort der Ecdysteroide sind die Prothorakaldrüsen (als Bestandteil der Ringdrüsen) von Insekten, mit besonders hoher Produktionsaktivität im Larvenstadium (Dai und Gilbert 1991). In adulten Insekten konnte Syntheseaktivität von Ecdysteroiden im Follikelepithel von Heuschrecken, in der Epidermis sowie im Abdomen des Tabakswärmers (*Manduca sexta*) und in den Y-Organen (entspricht den Prothorakaldrüsen der Insekten) von Krebsen nachgewiesen werden .

Cholesterin bildet, wie bei allen Steroidhormonen, den Ausgangspunkt für die Ecdysteroidhormon-Synthese (Toth et al. 2010). Bis heute ist es nicht gelungen, alle Zwischenschritte der Biosynthese des Endproduktes 3-Dehydroecdyson zu entschlüsseln. Der erste Schritt erfolgt Cytochrom-P-450-gesteuert in den Prothorakaldrüsen und besteht in der Bildung von 7-Dehydrocholesterin. Über verschiedene Hydroxylierungs-Reaktionen entsteht schließlich 3-Dehydroecdyson, welches in die Hämolymphe sezerniert, dort zu Ecdyson reduziert und in den Zielgeweben in 20-Hydroxyecdyson umgewandelt wird (Gilbert et al. 2002).



Abb. 1: A: Strukturformel des Ecdyson; B: Strukturformel des 20-Hydroxyecdyson (beta-Ecdyson).

Für den menschlichen Organismus sind die meisten über die Nahrung, z. B. Spinat, aufgenommenen Ecdysteroide allerdings nicht bioverfügbar und damit unwirksam (Lafont und Dinan 2003). Zu den wenigen für den Menschen mit relevanter Bioverfügbarkeit ausgestatteten Ecdysteroiden zählt das beta-Ecdyson (20-Hydroxyecdyson), welches auch im vorliegenden Tierversuch verwendet wurde.

In Studien an Menschen zeigte sich, dass Ec und 20-Ec einer niedrigen Eliminationszeit unterliegen und teils unverändert, teilweise aber auch als Metabolite sowohl über den Urin als auch mit dem Stuhl ausgeschieden werden (Lafont und Dinan 2003).

In Anthropoden dienen die Ecdysteroide in erster Linie der Steuerung des Häutungsvorganges, des Wachstums und der Reproduktion (Hoffmeister 2004). Das Wirkspektrum der Ecdysteroide in Vertebraten wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Ein anaboler Effekt der Hormone auf den Proteinstoffwechsel, das Muskel- und Längenwachstum, die Zellproliferation und -differenzierung konnte demonstriert werden (Syrov 1984).

Ein kataboler Effekt konnte hinsichtlich des Fettstoffwechsels demonstriert werden (Mironova et al. 1982), indem beispielweise zum einen die Cholesterin-Biosynthese reduziert als auch der Katabolismus des Cholesterin gesteigert werden (Uchiyama und Yoshida 1974). Schroepfer zeigte unter Ec-Gabe die Konversion von Cholesterin in Gallensäuren (Schroepfer 2000).

Zudem können Ec antidiabetische Effekte zugeschrieben werden. Yoshida et al. demonstrierten an Ratten, dass eine Vorbehandlung mit Ec beispielsweise durch den Abbau von B-Zellen des Pankreas induzierte Hyperglykämien vermindert (Yoshida et al. 1971). Auch für den Menschen kommen unter anderem in der chinesischen Medizin Ec-haltige Pflanzen für antidiabetische Zwecke zum Einsatz (Yang et al. 2001).

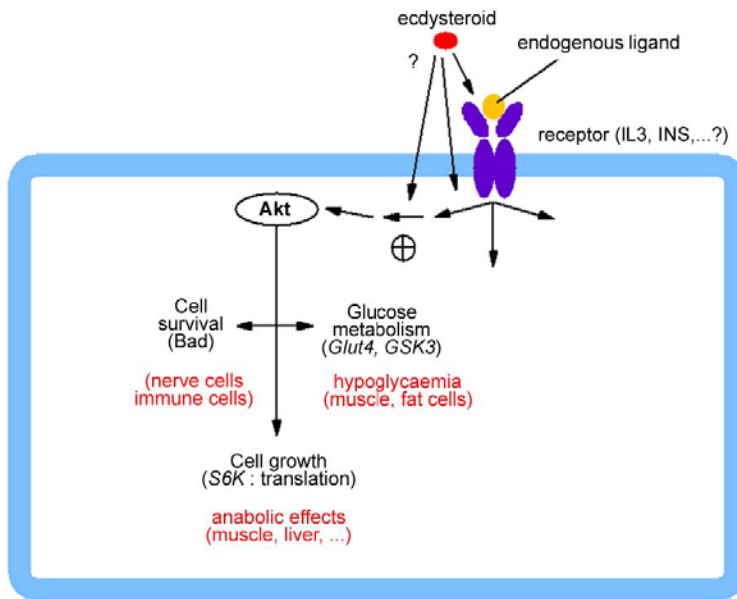


Abb. 2: Arbeitshypothese für Ecdysteroid-Aktion in Mammalia (Lafont und Dinan 2003, Seite 16).

Zur Anwendung kommen Ecdysteroide in Form von pflanzlichen Präparaten aktuell gerne bei Bodybuildern, die sich ihren Muskel-aufbauenden Effekt zunutze machen.

1.4.1 Ecdysteroid-Rezeptoren

Der Ecdysteroid-Rezeptor (EcR) wird zu den Kern-ständigen Rezeptoren gezählt (Lafont und Dinan 2003). Es wird vermutet, dass der heterodimere Rezeptor für den Liganden 20-Hydroxyecdysen zur Familie der Steroidhormonrezeptoren gehört. Er besteht aus einem von zwei Proteinen gebildeten Komplex: dem Ecdysen-Rezeptor und dem Ultraspiracle, welches das Homolog zum Retinoid-X-Rezeptor (einer der am meisten promiskuiten heterodimeren Partner für nukleäre Rezeptoren) der Vertebraten bildet. Bislang konnten ca. 30 verschiedene Komplexe in Anthropoden, v. a. aber in Insekten, nachgewiesen werden (Nakagawa et al. 2007). Grundsätzlich bestehen alle Komplexe aus verschiedenen Untereinheiten: der A/B- (transactivation domain), einer C- (DNA-binding domain), der D- (hinge region) und der E/F-Domäne (ligand- or hormone-binding domain) (Rees 2004).

Mammalia, und somit auch der menschliche Organismus, exprimieren nach heutigem Kenntnisstand keine Ec-Rezeptoren. Vielmehr entfaltet 20-OH-Ecd seine Wirkung im Säugetier durch Stimulation eines bereits zuvor erwähnten Retinoid-X-Rezeptors (Thomas et al. 1993), der daraufhin mit verschiedenen anderen Rezeptortypen, z.B. dem Vitamin-D-Rezeptor oder sogenannten Peroxisom-Proliferator-aktivierten

Rezeptoren (PPAR), dimerisiert (Bathori et al. 2008) und so unter anderem protektiven Einfluss auf den Knochen nehmen kann.

1.5 Die allgemeinen Grundlagen des Knochenaufbaus

1.5.1 Der anatomische Aufbau des Knochens

Makroskopisch lassen sich am Röhrenknochen die Diaphyse (Knochenschaft), die beiden Epiphysen (Knochenenden) und die Metaphyse voneinander abgrenzen (Schiebler und Schmidt 2002).

Die Metaphyse stellt im ausgewachsenen reifen Knochen eine Übergangszone zwischen Epi- und Diaphyse dar; im noch in der Entwicklung befindlichen unreifen Knochen beinhaltet sie die Epiphysenplatte - die für das Längenwachstum der Röhrenknochen verantwortliche Zone aus hyalinem Knorpel.

Im Inneren der Diaphyse befindet sich die Cavitas medullaris (Markhöhle), die beim Erwachsenen vor allem aus gelbem Fett bestehendes Knochenmark enthält (Tortora und Derrickson 2005).

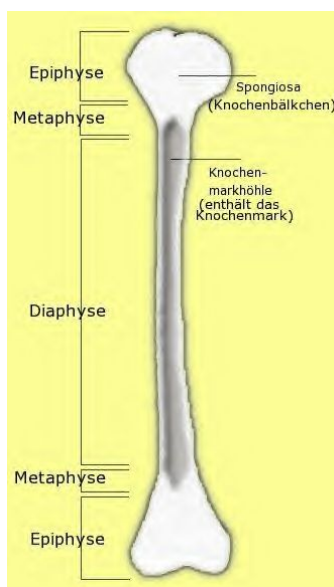


Abb. 3: Anatomie langer Röhrenknochen (Wikipedia).

Jeder Knochen besteht aus zwei an den verschiedenen Knochenabschnitten unterschiedlich stark ausgeprägten Schichten: der Substantia compacta (Kortikalis) und der Substantia spongiosa. Die äußere Substantia compacta wird aus dem für den Erwachsenen typischen Lamellenknochen gebildet. Die Substantia spongiosa

bildet das innere, schwammartig angeordnete Balkenwerk des Knochens (Junqueira et al. 2004). Die Hohlräume zwischen den Knochenbälkchen kommunizieren mit der Markhöhle und sind mit rotem Knochenmark ausgefüllt (Drenckhahn und Kugler 2008).

Die Diaphysen bestehen überwiegend aus Substantia compacta, welche die Markhöhle des Knochens umschließt, und nur zu einem geringen Anteil aus Substantia spongiosa. Bei der Epi- sowie der Metaphyse hingegen ist das Verhältnis invers. Es findet sich lediglich eine dünne Schicht Kortikalis, den größten Anteil nimmt hier der spongiöse Knochen ein (Drenckhahn und Kugler 2008).

Außen ist der Knochen bedeckt vom Periost, einer unter anderem der Ernährung und dem konzentrischen Wachstum des Knochens dienenden bindegewebigen Schutzhülle - ausgenommen sind hierbei die artikulierenden epiphysären Knorpelbereiche (Tortora und Derrickson 2005). Am Periost unterscheidet man ein äußeres, aus derben Kollagenfasern bestehendes Stratum fibrosum, von einer zweiten, innen gelegenen Schicht, dem stark vaskularisierten und Nerven führenden Stratum osteogenicum (Schiebler und Schmidt 2002).

Das Endost ist eine sowohl zur Markhöhle des Knochens hinweisende als auch die Spongiosabälkchen bedeckende Schicht retikulärer Zellen, die ebenfalls osteogenes Potential besitzt (Drenckhahn und Kugler 2008).

1.5. 2 Die zellulären Bestandteile des Knochens

Grundsätzlich werden vier unterschiedliche knochenspezifische Zellen unterschieden. Hierzu zählen die Osteoprogenitorzellen, die Osteoblasten, die Osteozyten sowie die Osteoklasten (Sobotta und Welsch 2005). Während die drei zuerst genannten Zelltypen auseinander hervorgehen, vermutet man bei den Osteoklasten einen anderen Ursprung (Junqueira et al. 2004). Die sich nicht teilenden Osteoprogenitorzellen entstammen mesenchymalem Gewebe. Sie sind undifferenzierte Stammzellen, die sich im periostalen Stratum osteogenicum sowie im Endost befinden und sich weiter zu Osteoblasten entwickeln (Tortora und Derrickson 2005). Die Osteoblasten synthetisieren die organischen Komponenten der Knochenmatrix und festigen so die zunächst aus weicher Grundsubstanz und kollagenen Fibrillen bestehende Interzellulärschicht, das Osteoid (Bucher und Wartenberg 1992). Die Osteoblasten ummauern sich schließlich mit den selbst produzierten Bestandteilen und differenzieren sich so zu Osteozyten, den

eigentlichen reifen Knochenzellen, die für die Ernährung des Knochens verantwortlich sind (Tortora und Derrickson 2005).

Der vierte Zelltyp, der Osteoklast, ist eine mehrkernige, von der weißen Blutzellreihe abstammende Riesenzelle und ist hauptsächlich im Endost lokalisiert. Osteoklasten sind am Knochenabbau beteiligt, indem sie die Knochengrundsubstanz mittels lysosomaler Enzyme und Säuren resorbieren (Tortora und Derrickson 2005).

1.5.3 Das Knochenmark

Das Knochenmark füllt die Spongiosa der Knochen und stellt ab dem 4. Embryonalmonat das wichtigste blutbildende Gewebe des menschlichen Organismus dar. Während bei Neugeborenen das Knochenmark ubiquitär in den Knochen vorkommt, ist es bei Adulten primär im Brustbein, den Rippen, in den Schädelknochen, den Schlüsselbeinen, den Wirbelkörpern, im Becken und den Oberarm- und Oberschenkelknochen zu finden. 10% des menschlichen Blutes sind im Knochenmark lokalisiert. Man unterscheidet zwischen rotem Knochenmark - nur hier sind die blutbildenden Stammzellen der Erythro-, Granulo- und Thrombozytopoese lokalisiert - und gelbem Fettmark. Beide sind anteilig mit ca. 50% vertreten. Mit zunehmendem Alter wird im Bereich der Diaphysen das rote durch gelbes Knochenmark ersetzt (Sipos et al. 2009). Das gelbe Knochenmark besteht vor allem aus in Retikulumzellen eingelagertem Fettgewebe und befindet sich hauptsächlich im Schaftbereich der langen Röhrenknochen. Bei Bedarf, z.B. hohen Blutverlusten, kann das gelbe wieder in rotes Knochenmark umgewandelt werden.

1.5.4 Lipotoxizität und Knochenmark

Bislang wurde davon ausgegangen, dass mäßiges Übergewicht einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung einer Osteoporose habe (Guney et al. 2003). Als ursächlich wird zum einen der mechanische Reiz der höheren Masse auf den Knochen und damit eine Stimulation des Knochengewebes mit daraus resultierender erhöhter Knochendichte vermutet. Zum anderen sind in postmenopausalen Frauen die Fettzellen einer der Hauptproduktionsorte von Östrogenen, welche den Knochenabbau hemmen (Kameda et al. 1997). Dabei muss aber zwischen dem Körpergewicht per se und dem Anteil der Fettmasse hieran unterschieden werden, da die Fettmasse nur zwischen 16 % und 25 % des gesamten Körpergewichtes ausmacht. So konnten andere Studien eine inverse Beziehung zwischen Fett- und

Knochenmasse demonstrieren, wenn die mechanische Beanspruchung des Knochens statistisch entfernt wurde (Zaho et al. 2007).

Zusätzlich muss zwischen der Lokalisation des Fettgewebes differenziert werden. So konnte gezeigt werden, dass die sogenannte abdominale Adipositas (Viszerafett, im Bauchraum lokalisiert) neben negativen Einflüssen auf das Herz-Kreislaufsystem (Unger 2002) auch mit einer erhöhten Osteoporose-Inzidenz einhergeht und somit als Risikofaktor für den Knochenverlust gilt. Im Gegensatz hierzu steigert eine eher im Bereich der Hüften konzentrierte Fettansammlung das Risiko, eine Osteoporose zu entwickeln, nicht.

Neben dieser systemischen Verknüpfung von Fett- und Knochengewebe existiert auch eine lokale Beziehung, die sich im Knochen selbst abspielt (Duque 2008).

Wie in-vitro-Studien zeigten, vermindert die Co-Existenz von Adipozyten und Osteoblasten die Osteoblasten-Proliferation, so dass eine Zunahme des gelben Knochenmarkes (Fettmark) mit einem Verlust von trabekulären Knochenstrukturen einher geht (Maurin et al. 2000, Maurin et al. 2002). Zu gleichen Resultaten gelangten Maurin et al. (2002) hinsichtlich mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Eine Untermauerung dieser These stellt die Tatsache dar, dass Adipozyten und Osteoblasten den gleichen Vorläuferzellen entstammen und so die vermehrte Entwicklung der einen Zellreihe auf Kosten der anderen durch eine direkte Hemmung der Osteoblastogenese verursachen (Diascro et al. 1998).

Elbaz et al. (2010) zeigten im Gegenzug, dass eine Hemmung der Fettsäure-Biosynthese zum Schutz von Osteoblasten führt. Somit konnte eine lipotoxische Wirkung der Adipozyten auf die Knochenentwicklung in vitro bewiesen werden, da sie neben einer Hemmung der Proliferation von Osteoblasten auch Einfluss auf ihre Funktion und die Überlebenszeit der Zellen ausüben (Duque 2008). Als potentielle Mechanismen konnten verschiedene vom Viszerafettgewebe gebildete Hormone und Botenstoffe, welche eine toxische Wirkung auf die Entwicklung menschlicher Knochenzellen ausüben, identifiziert werden. Neben einer Hemmung der Fettsäure-Synthese spielen die Aktivierung von Osteoblasten-Apoptose-fördernden Faktoren und eine Induktion von PPAR- γ -Rezeptor abhängigen Kaskaden eine Rolle (Lecka-Czernik und Suva 2006, Rosen ED und Spiegelman 2001).

1.6 Knochenstoffwechsel

Das Längenwachstum des Knochens („modeling“) ist mit Verknöcherung der Wachstumsfugen im Metaphysenbereich in der Pubertät abgeschlossen. Hiernach wechseln Zyklen des Knochenabbaus und -aufbaus einander ab. So kann die Knochenstruktur den ständig wechselnden Bedürfnissen und Bedingungen der verschiedenen Lebensabschnitte angepasst werden. Die Knochensubstanz wird in regelmäßigen Abständen ausgetauscht („remodeling“), was den entscheidenden Faktor für die Knochengesundheit bildet. Es handelt sich um ein gut organisiertes Zusammenspiel der am Knochenstoffwechsel beteiligten Zellen, die als „bone remodeling units“ bezeichnet werden und die funktionelle Einheit des Knochens stellen. Der Prozess besteht aus Knochenabbau durch die Osteoklasten und dem Knochenaufbau der Osteoblasten, die neue Knochensubstanz bilden, um den entstandenen Platz wieder aufzufüllen (Martin und Rodan 2001). Die skelettale Homöostase beruht damit auf einem empfindlichen Gleichgewicht zwischen Osteoklasten und Osteoblasten. Unterschiedlichste regulierende Hormone steuern diese Prozesse. Im Weiteren wird hier lediglich auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten steuernden Faktoren näher eingegangen. Drei zur Familie der Tumornekrosefaktoren gehörige Liganden, die als Osteoklasten-Modulatoren fungieren, konnten als extrazelluläre Regulatoren der Knochenresorption identifiziert werden: Osteoprotegerin, RANK und RANKL (Khare 2007).

1.6.1 Osteoprotegerin

Das Osteoprotegerin (OPG), auch bekannt unter der Abkürzung OCIT = osteoclast inhibitory factor, ist ein Zytokin und gehört zu der Familie der Tumornekrosefaktoren (Khare 2007). Das Glykoprotein ist ein aus 401 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, das sowohl in mono- als auch in dimerer Form vorliegen kann und von Osteoblasten produziert und sezerniert wird (Simonet et al. 1997). OPG hemmt über eine Inaktivierung des RANKL/RANK-Komplexes die Osteoklastenreifung und -aktivität von Vorläuferzellen und ist somit ein Gegenspieler der Knochenresorption (Lacey et al. 1998).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass unter anderem die durch das postmenopausale Östrogendefizit induzierte Hochregulation von RANKL auf Knochenmarkszellen für die Knochenresorption verantwortlich ist (Eghbali et al. 2003). Durch Blockierung der Bindung von RANKL an RANK reduziert OPG die

Knochenresorption (Kostenuik et al. 2001). Bereits 12 Stunden nach einer Einzelinjektion von OPG in postmenopausale Frauen konnte ein Abfall von bestimmten biochemischen Markern im Urin gemessen und so eine Reduktion des Knochenumsatzes nachgewiesen werden (Bekker et al. 2001).

Zusätzlich konnte an ovariectomierten Mäusen demonstriert werden, dass OPG nicht nur vor Knochenabbau schützt, sondern auch die Knochendichte steigert und bei Überexpression von OPG sogar eine Osteopetrose induzieren kann (Hofbauer et al. 1999).

Sowohl in vitro als auch in vivo konnte dem OPG sowohl eine hemmende Wirkung auf die osteoklasteninduzierte Knochenresorption durch Unterbindung der Aktivierung und Differenzierung von Osteoklasten als auch eine Apoptose-fördernde Wirkung auf reife Osteoklasten nachgewiesen werden (Keck und Pechestorfer 2003). Ein Beispiel aus dem klinischen Alltag bietet der Einsatz von Denosumab, einem humanen monoklonalen anti-RANKL Antikörper, der in seiner Funktion OPG gleicht und den RANKL/RANK-Komplex hemmt und sich so protektiv auf den Knochenstoffwechsel auswirkt (Gogakos et al 2009).

1.6.2 RANK (receptor activator of NF- κ B) und RANKL (RANK-Ligand)

RANKL kommt in verschiedenen Geweben (Muskel, Lunge, Schilddrüse) vor, in höherer Konzentration wurde es im Knochen und in lymphatischen Geweben nachgewiesen (Keck und Pechestorfer 2003).

Beim RANKL handelt es sich ebenfalls um ein Protein, das zu den Tumornekrosefaktoren gezählt und unter anderem von Osteoblasten sowie fibroblastischen und osteoblastischen Stromazellen sezerniert wird.

In seiner Funktion als Stimulator der Osteoklasten-Differenzierung bindet es an seinen membranständigen Rezeptor RANK, der auf der Oberfläche von monozytären Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimiert wird, und induziert so die weitere Entwicklung und Aktivierung der Zielzellen (Hofbauer et al. 2000).

Das RANK/RANKL-System steht im direkten Bezug zu seinem Antagonisten Osteoprotegerin und unterstützt das physiologische Gleichgewicht zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau.

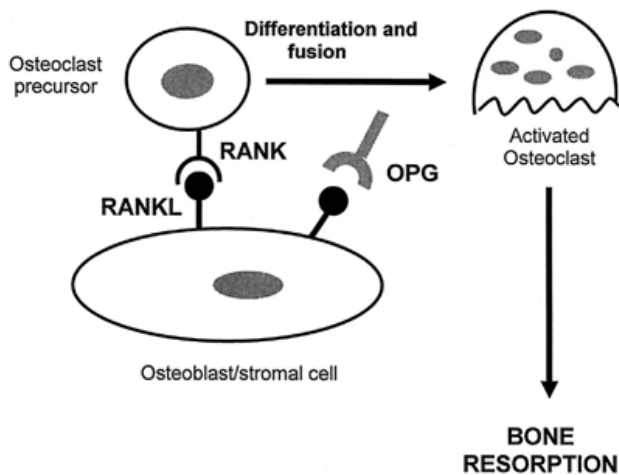


Abb. 4: Das Zusammenspiel von Osteoprotegerin und RANK/RANKL (Coetzee und Kruger 2004, Seite 507).

Die Konzentration beider Gegenspieler, RANKL und OPG, bestimmt also maßgeblich den Knochenstoffwechsel: hohe Level an RANKL steigern die Knochenresorption, hohe Level OPG hemmen sie hingegen. Eine Störung dieser Homöostase wird unter anderem mit verschiedenen Knochenerkrankungen, so auch der postmenopausalen Osteoporose, in Verbindung gebracht (Li 2007). Einen fördernden Einfluss auf die Knochenumsatzrate scheinen Wachstumshormone, Schilddrüsenhormone und $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin D zu haben; Östrogene wirken sich bremsend aus (Fleisch 2000).

1.6.3 Osteocalcin

Neben dem Kollagen bildet das knochenspezifische Osteocalcin („bone γ -carboxyglutamic acid-containing protein“: BGP) den größten Proteinbestand des Knochens (Price et al. 1980). Es besteht aus 46-50 Aminosäureresten und wird, Vitamin-K-abhängig (Gundberg 1983) und Vitamin-D₃-induziert (Hauschka et al. 1975), von Osteoblasten synthetisiert. Osteocalcin ist ein Kalzium-bindendes Protein, das primär in die organische Knochenmatrix eingebaut wird und so zur Knochenmineralisierung beiträgt. Teils wird das Osteocalcin in die Blutbahn ausgeschüttet (Price et al. 1980). Dieses in den Kreislauf sezernierte Osteocalcin ist ein hochspezifischer Marker für die Osteoblasten-Aktivität und dient dem Nachweis von Knochenmineralisation und Knochenneubildung (Seidlová-Wuttke et al. 2003). Bei Störungen des Knochenstoffwechsels, z.B. der Osteoporose, kann so auf die Knochenumsatzrate rückgeschlossen werden. Bei Erkrankungen mit gesteigerter Knochenumsatzrate ist der Osteocalcin-Spiegel im Serum auf Grund der kompensatorisch gesteigerten Osteoblasten-Aktivität der betroffenen Patienten erhöht

(Stracke et al 1987). Neben den bildgebenden Verfahren haben sich in den vergangenen Jahren auch biochemische Marker zur Verlaufskontrolle und Beurteilung sowohl benigner als auch maligner osteodestruktiver Prozesse bewährt. Das knochenspezifische Isoenzym der alkalischen Phosphatase, das Osteocalcin, zählt bereits zu diesen Markern und ist somit ein etabliertes Verfahren, die Knochenumsatzrate zu bestimmen (Keck und Pechestorfer 2003). Auch zur Kontrolle einer Therapieeffizienz, beispielsweise im Rahmen der HET, kann die Osteocalcin-Bestimmung im Serum des Patienten dienen.

Zudem steht Osteocalcin in Verbindung mit dem Fettstoffwechsel. In Versuchen an Mäusen zeigten Tiere mit hohen Osteocalcin-Leveln eine erhöhte Resistenz gegen Fettleibigkeit und Diabetes. Tiere mit fehlendem Osteocalcin erkrankten jedoch vermehrt (Ferron et al. 2008).

1.7 Knochenqualität und Osteoporose

Knochenqualität ist ein sehr vager Begriff. Sie ist abhängig von den Material- und Struktureigenschaften, sprich der Mikroarchitektur des Knochens. Sie wird vom Querschnitt, der Anzahl, der Aufteilung und räumlichen Anordnung der Trabekel mitbestimmt. Weitere strukturelle Determinanten wie die Knochengröße, der Kortikalis-Durchmesser und die Kortikalis-Porosität, der Mineralgehalt des Knochens, die Osteozytendichte, Kollagen-Eigenschaften und das Crosslinking werden ebenfalls dazu gezählt (Seeman 2003).

Der Alterungsprozess ist begleitet von Veränderungen in der Mikroarchitektur des Knochens. Es kommt sowohl zum Verlust von Kortikalis als auch Spongiosa. In der Spongiosa kommt es zum Übergang von einer trabekulären Honigwabenstruktur zu einem Netzwerk verbundener Streben. V. a. horizontale Trabekel sind vom Abbau betroffen. Auswirkung dieser Umbauvorgänge ist eine verminderte Druckfestigkeit des Knochens. Der Verlust einer horizontalen Strebe (die jeweils zwei vertikale miteinander verknüpft) steigert die effektive Länge eines vertikalen Trabekels um den Faktor zwei, reduziert aber die Druckfestigkeit um den Faktor vier, da die Festigkeit sich umgekehrt proportional zur durchschnittlichen effektiven Länge eines Trabekels verhält (Dempster 2003).

Eine erhöhte Knochenbrüchigkeit im Alter ist das Ergebnis von unnormalem Remodeling und Modeling, den beiden Prozessen, die den ursprünglichen Status von Material- und Struktureigenschaften des Knochens normalerweise aufrecht und

im Gleichgewicht halten (Seeman 2003). Während der Postmenopause kommt es durch den abfallenden Östrogenspiegel zu einer negativen Knochenbilanz. Physiologischerweise hemmen Östrogene die für die Knochenresorption verantwortlichen Osteoklasten und stimulieren die für die Knochenformation zuständigen Osteoblasten. Osteoblasten sezernieren mehrere Wachstumsfaktoren und Zytokine, welche den Östrogeneinfluss übertragen. Einige wirken somit indirekt auf Osteoklasten.

Durch die erhöhte Remodelingintensität nach dem Östrogenabfall verändern sich die den körperlichen Ansprüchen angepassten dreidimensionalen Material- und Struktureigenschaften des Knochens. Die Lebensspanne der Osteoklasten steigt, während die der Osteoblasten sinkt. Bei Männern kommt es vorrangig zu einer Ausdünnung trabekulären Knochens, bei Frauen ist insbesondere die Knochenverbundenheit gestört. Der Mineralgehalt des Knochens ist durch das vermehrte Remodeling ebenfalls reduziert und trägt zur erhöhten Knochenbrüchigkeit bei (Seeman 2003).

1.8 Die Ratte als Tiermodell für Osteoporose

Als anerkanntes Modell für die postmenopausale Osteoporose im Menschen gilt das Modell der ovariectomierten Ratte (Baron et al. 1984; Kimmel et al. 1993; Mosekilde et al. 1994) und ist das am häufigsten verwendete Tiermodell zur Erforschung der postmenopausalen Osteoporose (Thompson 1995). Besonders charakteristisch stellt sich der schnelle und starke Knochenverlust in der Tibia-Metaphyse der ovariectomierten Ratte dar (Seidlová-Wuttke et al. 2003), weswegen die folgenden histologischen Untersuchungen auch in eben dieser Region vorgenommen wurden. Für die Verwendung speziell der Ratte als Versuchsmodell für Osteoporose sprechen sowohl die gute Kontrollierbarkeit der Experimente als auch die bereits aus vielen Versuchen hervorgegangenen guten Kenntnisse über das Skelett der Tiere. Zudem sind durch das zügige Wachstum der Ratten schnell Resultate zu erwarten. Nicht zuletzt sind die kostengünstige Anschaffung und Haltung der Tiere als begünstigende Faktoren für die Ratte als Tiermodell zu nennen (Frost und Jee 1992). Die Ratte entwickelt eine Osteoporose nicht spontan. Als etabliertes Modell für tierexperimentelle Forschungen im Bereich der Osteoporose wird daher die ovariectomierte Ratte zu Hilfe genommen. Die Ovariectomie verursacht in Ratten eine Abnahme der Knochenmasse (Faugere et al. 1986), lässt aber keine

Beeinträchtigung des Bewegungsapparates erkennen. Mikroläsionen oder Spontanfrakturen konnten bisher nicht festgestellt werden.

Neben zahlreichen Gemeinsamkeiten in Aufbau und Wachstum der Knochenmasse (Frost und Jee 1992) sind bei der ovariectomierten (ovx) Ratte durch den induzierten Östrogenmangel im Vergleich mit der postmenopausalen Frau viele Ähnlichkeiten zu finden, die es erlauben, die Ratte als vergleichbares, relevantes Modell für den Knochenverlust zu betrachten (Kalu et al. 1991). So sind bei der ovx Ratte wie auch bei der postmenopausalen Frau eine steigende Rate des Bone-Turnover mit überwiegender Resorption des Knochens und daraus folgender negativer Knochenbilanz charakteristisch; eine initial schnelle Phase mit hohem Knochenverlust ist gefolgt von einer langsamen Phase. An der Tibia ist dieser durch eine schnelle dreimonatige Anfangsphase mit dem größten Knochenmasseverlust gekennzeichnet. Es schließt sich eine ca. 5-6 Monate anhaltende stabile Plateauphase an, in welcher die Knochenmasse annähernd konstant bleibt. Die letzte Phase zeichnet sich durch einen langsamen Knochensubstanzverlust aus und dauert ca. 9 Monate (Wronski et al. 1988). Frauen erfahren in der ersten Zeit nach der Menopause ebenfalls einen ersten schnelleren Knochensubstanzverlust, gefolgt von einer langsameren Phase (Riggs und Melton 1986).

Eine weitere Parallele ist der höhere spongiöse als kortikale Knochenverlust.

Wenige Wochen nach einer Ovariectomie ist das Spongiosavolumen der proximalen Tibiametaphyse im Vergleich zu Kontrolltieren halbiert. Es kommt, im Vergleich zum gesunden Knochengewebe, zur Hypertrophie und einer Vermehrung der Osteoklasten sowie Osteoblasten, also zu einem erhöhten Knochenstoffwechsel. Da das Spongiosavolumen trotzdem abnimmt, ist dies ein Hinweis darauf, dass der Knochenumsatz zugunsten des Abbaus verschoben ist (Thompson et al. 1995).

Während der Skelettreifung der intakten Ratte nimmt der Bone-Turnover ab (Baron et al. 1984).

Während in der Wachstumsphase begriffene Ratten rotes Knochenmark in der Tibia aufweisen, besitzen adulte Tiere an dieser Stelle überwiegend gelbes Fettmark. (Wronski et al. 1986).

Neben der (im Tiermodell) erwünschten Abnahme der Knochenmasse führt die Ovariectomie von Ratten zu einem übermäßigen Anstieg der Körpermasse (Saville 1969). Dieses Übergewicht mildert insbesondere in langen Röhrenknochen die

Ausprägung des Spongiosaverlustes, d.h. die Entwicklung einer Osteoporose (Wronski et al. 1988).

Studien über adipöse postmenopausale Frauen beschrieben ebenfalls eine Verminderung des Knochensubstanzverlustes und ein verringertes Frakturrisiko. Ebenfalls nennenswert sind ähnliche skelettale Reaktionen auf Therapieversuche mit Östrogenen, Tamoxifen, Bisphosphonate u. a. sowie eine verminderte intestinale Calcium-Aufnahme (Kalu et al. 1991).

Nachteile, die beim Vergleich der aus Tierversuchen an der Ratte gewonnenen Ergebnisse mit der postmenopausalen Frau berücksichtigt werden müssen, sind u. a. der Größenunterschied, die proportional geringere Knochensubstanz mit anteilig geringerer Spongiosa, sowie das für biochemische Untersuchungen relevante sehr niedrige Blutvolumen der Ratte (Turner et al. 2001).

1.9 Zielsetzung

Eine 50-jährige Frau trägt heute ein Risiko von 40%, eine osteoporotisch bedingte Fraktur zu erleiden. Bei vier bis sechs Millionen Osteoporose-Kranken allein in Deutschland und über 200 Millionen weltweit, von denen 80% Frauen sind, zeigt sich die Dringlichkeit, neue Therapieansätze zu finden bzw. bereits bestehende stetig zu verbessern. Eine mangelnde Östrogenproduktion in der Postmenopause wird für diese Zahlen mitverantwortlich gemacht. Da die Anwendung der klassischen Hormonersatztherapie im Zuge des klimakterisch-postmenopausalen Syndroms spätestens seit den Ergebnissen der WHI-Studie von 2002 umstritten ist, werden neue Alternativen gesucht, die im günstigsten Fall positive Eigenschaften der HET (z.B. Osteoporoseschutz und Mamma-Ca-Prävention) aufweisen, ohne dabei negative Wirkungen, wie eine Zunahme von Thrombosen oder eine Steigerung des Endometrium-Ca-Risikos auszulösen (Palacios 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Wirkungen des β -Ecdyson im Vergleich mit dem Steroidhormon 17- β -Östradiol über einen Verabreichungszeitraum von vier Wochen an ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratten untersucht.

Als Untersuchungsparameter dienen die Knochenhistologie, die Knochenlänge und die Körpergewichte der Ratten sowie die Serumparameter OPG, Osteocalcin, RANK und RANKL.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist die Beantwortung der Fragestellung, ob und in welchem Maße β -Ecdyson den histologischen Knochenaufbau und den

Knochenstoffwechsel der Ratte beeinflusst. Im Vergleich wird Östradiol untersucht, um die erhaltenen Ergebnisse bewerten zu können. Die Gabe der Substanzen β -Ecdyson und Östradiol erfolgte subkutan.

Kann β -Ecdyson einen Platz im Bereich der Osteoporose-Therapie einnehmen bzw. im Rahmen der Osteoporose-Prophylaxe zum Einsatz kommen?

Lösen die miteinander verglichenen Substanzen am Knochen und im Knochenstoffwechsel gleichsinnige Reaktionen aus?

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuch

2.1.1 Versuchstiere

In diesem Versuch wurden weibliche, selbstgezozene Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten, Züchter der Muttertiere: Winkelmann, Borchon) verwendet. Die Versuchsdurchführung erfolgte an 61 Tieren. Zu Versuchsbeginn wurden die weiblichen Ratten in fünf Gruppen zu je zwölf Tieren unterteilt.

Zu Beginn des Versuches hatten die Ratten ein Alter von drei Monaten und wogen $236,9 \text{ g} \pm 0,55 \text{ g}$.

Zur Kennzeichnung und Identifikation der einzelnen Ratte wurde den Tieren unter Inhalationsnarkose ein 12 mm langer ISO-Transponder aus dem Transponder-UNO-MICRO-ID-System (Uno-Roesvastaal BV, Zevenaar Holland) subkutan (s. c.) in die Nackenregion implantiert. Diese Transponder können durch einen Zahlencode identifiziert werden, der mit Hilfe eines tragbaren Transponder-Lesegeräts (Gesreader II Ge S008: ISO kompatibler Taschenleser) abgerufen werden kann.

Die tierexperimentelle Durchführung fand unter der Leitung von Frau Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke statt.

Eine Genehmigung für den Tierversuch von der Zentrale für Tierversuche in Braunschweig lag vor (AZ: 33.42502/A-025/06).

2.1.2 Haltungsbedingungen

Die Ratten wurden in Gruppen von vier Tieren in Käfigen (Makrolonkäfige Typ IV, Fa. Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg) in einem vollklimatisierten, fensterlosen Raum der ZTE des Universitätsklinikums Göttingen gehalten. Die tägliche Lichteinwirkung erfolgte im Zwölfstundensrhythmus von 6.00 bis 18.00 Uhr. Die Raumtemperatur betrug zwischen 22-24° C und die relative Luftfeuchtigkeit lag bei 55%. Frisches Trinkwasser und Futter (sojafreies Pellet-Futter der Fa. Sniff Spezialitäten GmbH, Soest) standen den Tieren jederzeit ad libitum zur Verfügung.

2.1.3 Zeitlicher Versuchsablauf

Eine erste qCT-Messung (XCT Research SA, Stratec Medizintechnik, Pforzheim, Germany) der Tibia und der Wirbelsäule aller Ratten in Isofluran-Narkose (Florene, Abbott Laboratories Ltd., Maidenhead, UK) stellte den Versuchsbeginn dar. Im

Anschluss an den qCT-Scan wurden die Ratten mit Transpondern ausgestattet und zum ersten Mal gewogen. Nach einer weiteren Woche wurde die Ovariectomie vorgenommen. Direkt nach der Ovariectomie wurde mit der subkutanen täglichen Injektion der jeweiligen Testsubstanzen über einen Zeitraum von vier Wochen begonnen.

Das Körpergewicht und der Futterverbrauch der Versuchstiere wurde einmal wöchentlich kontrolliert (Waage: basic lite BL3, Sartorius) und pro Käfig, Tier und Tag bestimmt.

Nach vier Wochen fand die zweite und letzte qCT-Messung statt, wobei wiederum das Körpergewicht ermittelt wurde.

Am Ende der vierten Woche wurden die Ratten unter Kohlendioxid-Narkose durch Dekapitation getötet. Die Tibiae wurden unmittelbar danach freipräpariert, entnommen und in flüssigem Stickstoff bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren. Des Weiteren wurden verschiedene Organe und Blut entnommen und für spätere Untersuchungen konserviert bzw. zur späteren Serumgewinnung zentrifugiert. Von ausgebildeten MTA's wurden die Serumparameter und histologischen Präparate angefertigt und zur weiteren Auswertung zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Testsubstanzen

Ab dem Tag der Ovariectomie wurden den Ratten in Gruppen von zwölf Tieren (Anzahl der Tiere $n = 12$) über vier Wochen folgende Testsubstanzen täglich subkutan appliziert:

- Kontrollgruppe ($n = 12$): NaCl bzw. Benzylbenzoat + Öl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland, B-9550), 0,2 ml s.c.
- E2-Gruppe ($n = 12$): Estradiol-17- β - Benzoat (E2) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland) 0,2 ml s.c.
- Ec 2mg-Gruppe ($n = 12$): 20-OH-Ecdyson 2mg (Changzhou Dahua Imp. and Export (Group) Corp. Ltd. Changzhou, Jiangsu, China, 97,2% Reinheit), 0,2 ml s.c.
- Ec 10mg-Gruppe ($n = 12$): 20-OH-Ecdyson 10mg, 0,2 ml s.c.
- Ec 25mg-Gruppe ($n = 12$): 20-OH-Ecdyson 25mg, 0,2 ml s.c.

Die Testsubstanzen wurden bei 5° C gelagert. Zum eigenen Schutz wurden während der Applikation der Substanzen Mund- und Nasenmasken, Latex-Einweghandschuhe und Schutzkittel getragen.

2.1.5 Ovariectomie

Die Ovariectomie wurde unter der Anleitung von Frau PD Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke durchgeführt und fiel nicht in meinen Aufgabenbereich. Das genaue Protokoll ist den Anlagen zu entnehmen.

2.2 Herstellung der Knochenpräparate

2.2.1 Acrylat-Einbettung

Die aufgetauten Tibiae aller Versuchstiere (n = 60 Tiere) wurden zunächst in Länge und Epiphysendurchmesser vermessen. Zur weiteren Behandlung wurden sie in kleinen Glasbehältern aufbewahrt. Die nachfolgende Acrylat-Einbettung wurde von Frau Heidi Brüggemann-Meyer (MTA der Abteilung) durchgeführt (Protokoll siehe bitte unter Anlagen).

2.2.2 Herstellung der Präparat-Schnitte

Im nächsten Aufbereitungsschritt wurden von den Acrylat-Blöcken von oben genannter MTA jeweils 10 Schnitte mit einer Dicke von 5 µm aus dem mittleren Teil des Knochens mit Hilfe des Mikrotoms (Leica Jung Polycut S) angefertigt und diese auf vorher mit einer Gelatine-Chromalaunlösung beschichtete Objektträger (SuperFrost®Plus, Menzel GmbH, Braunschweig), welche mit Versuchsname, Tier- und Schnittnummer versehen wurden, aufgebracht.

Geschnitten wurde im longitudinalen Verlauf des Knochens. Zuletzt wurde jeder Objektträger mit einer Schutzfolie bedeckt und in einer Presse im Thermoschrank bei 37° C für mindestens 24 Stunden getrocknet.

2.2.3 Färbung der Präparate

Alle Schnitte wurden nach Standardprotokoll mit Trichromfärbung nach Goldner gefärbt. Vorab wurden die Objektträger für eine Stunde in 2-Methoxyethylacetat entplastet, um überschüssiges Acrylat vom Objektträger zu entfernen und anschließend zweimal für jeweils zehn Minuten mit 100%igem Alkohol umspült.

Färbeprotokoll:

1. Weigert's Hämatoxylin (10 Minuten)
2. „Bläuen“ in Leitungswasser (10 Minuten)
3. 2 g Ponceau de Xylidine + 1 g Säurefuchsin + 0,4 ml 1%ige Essigsäure + 200 ml destilliertes Wasser (45 Minuten)
4. Spülen in 1%iger Essigsäure (1 Minute)
5. Kurzes Abspülen mit destilliertem Wasser
6. 2 g Wolframatophosphorsäure + 1 g Orange G + 200 ml destilliertes Wasser (7 Minuten)
7. Spülen mit 1%iger Essigsäure (1 Minute)
8. 0,4 g Lichtgrün + 0,4 ml Essigsäure + 200 ml destilliertes Wasser (15 Minuten)
9. Auswaschen mit 1%-iger Essigsäure
10. Entwässern in 96%igem und 100%igem Ethanol, dann in Xylol (jeweils 10 Minuten)

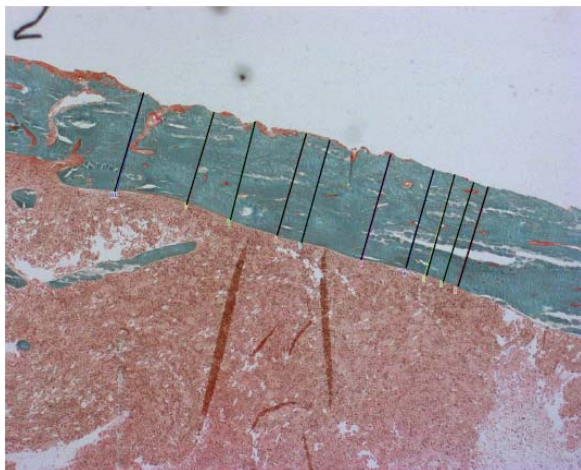
Abschließend wurden die Präparate mittels Eukitt eingedeckt.

2.3 Histologische Auswertung

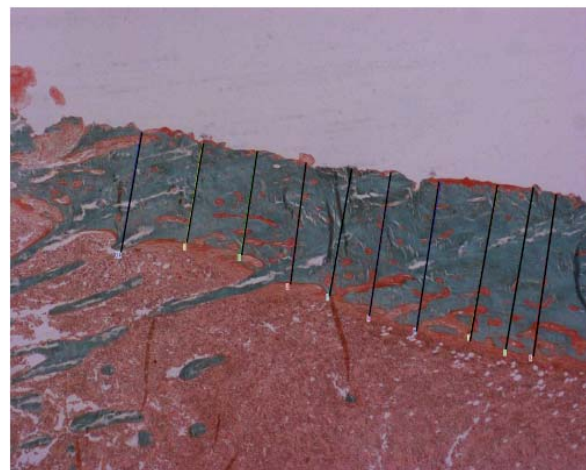
Die Schnitte (Längsschnitte) wurden mit dem Axiophot Mikroskop (Zeiss) mit integrierter digitaler Kamera, welches mit der Bildanalysesoftware analySIS 3.0® (Soft Imaging System GmbH, Münster) verbunden ist, begutachtet und fotografiert. Alle Aufnahmen erfolgten bei 3,125-facher Vergrößerung. Der zu analysierende Bildausschnitt hatte eine Abmessung von 2040 μm \times 1640 μm , was einer Fläche von 3.345.600 μm^2 entspricht. Es wurde für die Vermessungen jeweils ein ca. 3 mm distal der Epiphysefuge und zentral zwischen oberer und unterer Kortikalis gelegener Abschnitt ermittelt.

2.3.1 Bestimmung der metaphysären und diaphysären Kortikalisdicke

Sowohl die metaphysären als auch die diaphysären Kortikalisdicken wurden mit Hilfe einer variablen Abstandsmessfunktion der Computersoftware vermessen. Hierfür wurden die Aufnahmen jeweils so angefertigt, dass sich die Kortikalis über den gesamten Bildausschnitt von 2 mm beurteilen ließ und Übergangsbereiche von trabekulären Strukturen in die Kortikalis möglichst nicht in die Messungen miteinbezogen wurden. Es wurden manuell über den gesamten Bildausschnitt 10 Messungen sowohl der oben als auch der unten liegenden Kortikalis vorgenommen; die Messungen der Diaphyse erfolgten dabei in einem Abstand von ca. 1 cm distal der Epiphysenfuge (dies entsprach der fünfmaligen Verschiebung des Objektisches um die Breite des Bildschirmausschnittes (5 x 2 mm)), die der metaphysären Kortikalisdicke ca. 3 mm distal der Wachstumszone.



Diaphyse



Metaphyse

Abb. 5: Messung der Kortikalisdicken im Bereich der Diaphyse (ca. 1 cm distal der Epiphysenfuge) und der Metaphyse (ca. 3mm (unmittelbar) distal der Epiphysenfuge), 3,125-fache Vergrößerung.

2.3.2 Bestimmung der relativen Anteile von Trabekeln, rotem und gelbem Mark am Knochengewebe in der Metaphyse

Beurteilt wurde in jedem Präparat ein ca. 3 mm distal der Epiphysenfuge zentral zwischen oberer und unterer Kortikalis gelegener Bereich.

Mit Hilfe eines speziellen Phasenanalyseprogramms (OPAC) der Computersoftware konnten den gewünschten histologischen Strukturen (Trabekeln, rotes und gelbes Mark) entsprechende Phasen (Grauwertbereiche) zugeordnet werden. Die Schwellenwerte, welche den obersten und untersten Grauwert einer Phase

definierten, wurden anhand eines ursprünglichen Echtfarbbilds manuell für jede Auswertung neu festgelegt.

Als mögliche Störfaktoren wurde im Voraus sowohl eine Schattenkorrektur zur Beseitigung störender Schwankungen der Hintergrundaussteuerung vorgenommen als auch nur solche Bildausschnitte ausgewertet, die keine gestörte Knochenarchitektur auf Grund von Präparationsartefakten aufwiesen.

Die Phasenanalyse errechnete die Flächenanteile der drei verschiedenen Grauwertbereiche. Das trabekuläre Knochenvolumen (BV/TV) ließ sich aus der Trabekelfläche (T.Ar) und der gesamten Fläche des untersuchten Knochengewebes (B.Ar) nach folgender Formel errechnen: $BV/TV = 100 \times B.Ar / T.Ar$ (%) (Parfitt et al. 1987). Für rotes und gelbes Knochenmark wurde analog verfahren.

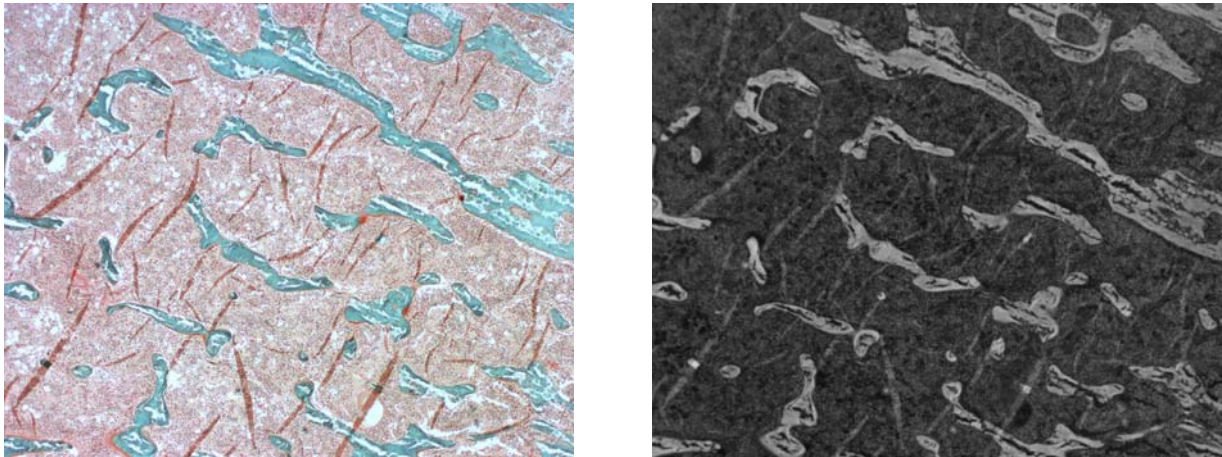


Abb. 6: Originalaufnahme (links) und schattenkorrigierter Grauauszug (invertiert mit Farbauszug, rechts).

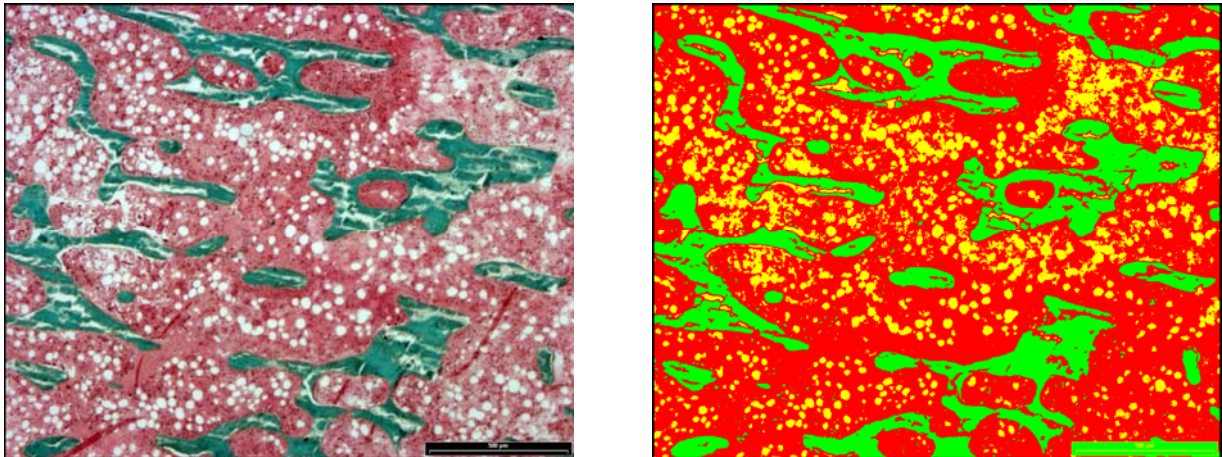


Abb. 7: (3,125-fache Vergrößerung, Ausschnitt 600 μm distal der Epiphysenfuge, longitudinale Schnittebene) Vergleich der Original-Aufnahme (links) mit den drei Phasen der verschiedenen histologischen Strukturen (rechts): Knochen (grün), Binde-/Stütz- und hämatologisches Gewebe (rot), Fettgewebe (gelb).

2.3.3 Methoden zur Beschreibung von Trabekleigenschaften und des trabekulären Netzwerkes

In den Bildabschnitten, in denen bereits das BV/TV bestimmt worden war, wurde, um die Organisation des trabekulären Netzwerkes beschreiben zu können, das Verfahren der Strut Analysis angewendet. Hierbei werden die Trabekel als Komponenten eines zwei-dimensionalen Gerüsts betrachtet, das die Anordnung der Trabekel im Raum repräsentiert. Es werden Knoten (Nd), die sich durch den Kreuzungspunkt von zwei oder mehr Trabekeln ergeben, von freien Enden (Termini) unterschieden, die Unterbrechungen im trabekulären Netzwerk repräsentieren. Der Quotient aus Knoten und freien Enden (Nd/Tm) ist ein Index der räumlichen Integrität des Trabekel-Netzwerkes.

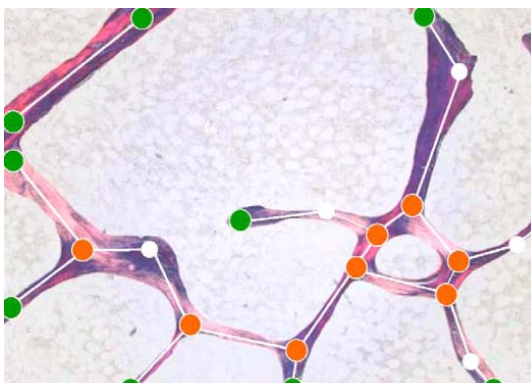


Abb. 8: Strut Analysis zur Beschreibung des trabekulären Netzwerkes. Knoten (Nodes (Nd): orangene Punkte) sind Verbindungen zwischen zwei oder mehr Trabekeln (Struts: weiße Punkte), freie Enden (Termini: grüne Punkte) sind Unterbrechungen im trabekulären Netzwerk (Carbonare et al. 2005, Seite 611).

2.4 Statistische Methoden

Die Werte für die Statistik wurden mit dem Computerprogramm Graph Pad PRISM 4® berechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt und in den Graphen mit * gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels multiplen t-Tests nach Dunnett.

Die ovariectomierten Kontrolltiere dienten als Vergleichsgruppe, d.h. ihre Messwerte wurden 100% gleichgesetzt und alle anderen Behandlungsgruppen dazu in Relation gesetzt und die prozentuale Abweichung bestimmt.

Konventionell werden die gemessenen und abgeleiteten Größen als Volumen anstatt als Fläche angegeben, obwohl sie in einer zwei-dimensionalen Vorlage gemessen werden. Die Messwerte für Trabekelflächenanteile werden demnach als Volumenprozent angegeben, für rotes und gelbes Mark wurde analog verfahren. So können prozentrelative Mittelwerte und deren Standardfehler der Mittelwerte (SEM) berechnet werden. Kortikalisdicken werden als Absolutwerte angegeben.

Diese Größen und Einheiten zur Beschreibung der Knochenparameter entsprechen den Empfehlungen des American Society of Bone and Mineral Research nomenclature committee.

3 Ergebnisse

3.1 Tiergewichte

Zu Beginn des Versuches war das Gewicht der einzelnen Tiere in den eingeteilten und zu diesem Zeitpunkt noch unbehandelten Gruppen nahezu identisch.

Kontrolle	Durchschnittliches Körpergewicht pro Tier/Woche (g)	E2	Durchschnittliches Körpergewicht pro Tier/Woche (g)
Woche 1	233,93	Woche 1	230,23
Woche 2	235,58	Woche 2	236,83
Woche 3	256,25	Woche 3	229,67
Woche 4	269,75	Woche 4	236,75
Woche 5	296,75	Woche 5	236,5
Woche 6	312,42	Woche 6	244,42
Mittel	267,45	Mittel	235,74
Ec 2mg	Durchschnittliches Körpergewicht pro Tier/Woche (g)	Ec 10mg	Durchschnittliches Körpergewicht pro Tier/Woche (g)
Woche 1	232,97	Woche 1	228,30
Woche 2	237,00	Woche 2	236,18
Woche 3	250,33	Woche 3	251
Woche 4	271,83	Woche 4	273,33
Woche 5	294,08	Woche 5	295
Woche 6	304,58	Woche 6	296
Mittel	265,13	Mittel	263,30
Ec 25mg	Durchschnittliches Körpergewicht pro Tier/Woche (g)		
Woche 1	221,20		
Woche 2	238,85		
Woche 3	252,77		
Woche 4	275,15		
Woche 5	297,62		
Woche 6	306,23		
Mittel	265,30		

Tab. 3: Durchschnittliches Körpergewicht pro Tier/Woche (g).

3.1.1 Tiergewicht Versuchsende

Vor Beendigung des Versuches wurden die Tiere erneut gewogen.

Der Effekt von E2 und Ec (4 Wochen s.c. in ovx. Ratten) auf:

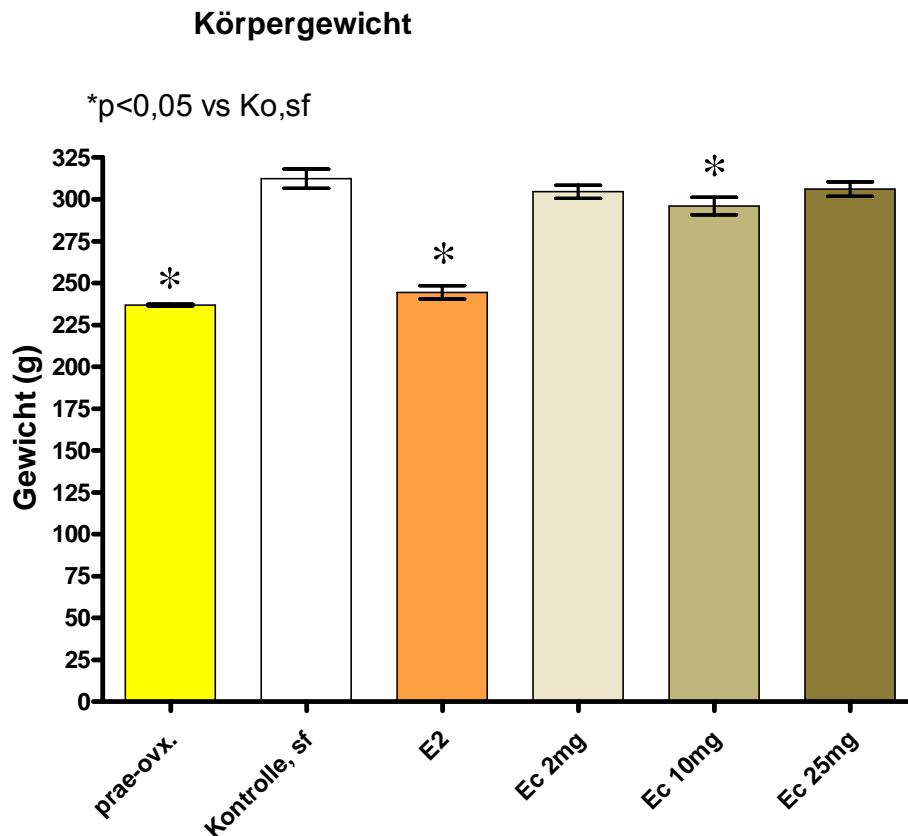


Abb. 9: Effekt von E2, Ec 2 mg, Ec 10 mg und Ec 25 mg (vier Wochen s. c. in ovx S. D. Ratte) auf das Tiergewicht zu Versuchsende; *: Signifikanz p. o ($p < 0,05$) im Vergleich zu Gewicht bei Versuchsbeginn.

Das Gewicht der Tiere der Kontrollgruppe s.c. hat innerhalb des Versuchszeitraumes deutlich zugenommen und lag im Mittel bei $312,4 \text{ g} \pm 5,72 \text{ g}$. Die Körpergewichte der mit Ec 2mg und Ec 25 mg substituierten Ratten zeigen als einzige Gruppen mit $304,6 \pm 3,87$ bzw. $306,2 \pm 4,32$ keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Alle anderen Gruppen weisen ein signifikant geringeres Körpergewicht zu Versuchsende auf. Es zeigen alle Gruppen eine physiologische Zunahme zum Ausgangsgewicht, welche aber im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer liegt. Am deutlichsten wird dieser Effekt bei den mit E2 als Futterzusatz behandelten Tieren; das durchschnittliche Körpergewicht lag am Versuchsende bei $244,4 \text{ g} \pm 3,94 \text{ g}$.

3.1.2 Gewichtszunahme

Zur Verdeutlichung wird noch einmal die Gewichtszunahme von Versuchsbeginn bis zum Ende nach vier Wochen Versuchsdauer graphisch aufgezeigt. Das oben angedeutete Ergebnis bezüglich der Gewichts­differenz ist hier zu sehen.

Der Effekt von E2 und Ec (4 Wochen s.c. in ovx. Ratten) auf:

Gewichtszunahme

$p < 0,05$ vs. Ko, sf

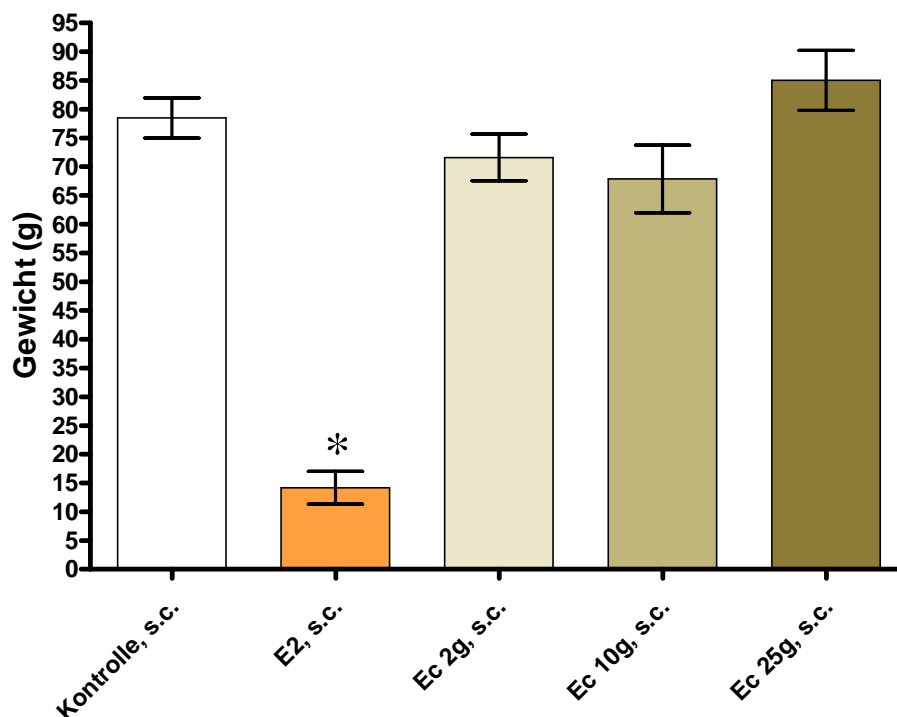
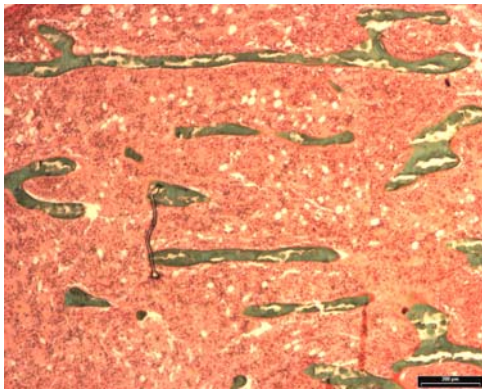


Abb. 10: Effekt von E2, Ec 2 mg, Ec 10 mg und Ec 25 mg (vier Wochen s. c. in ovx S. D. Ratte) auf die Gewichtszunahme; *: Signifikanz p. o ($p < 0,05$).

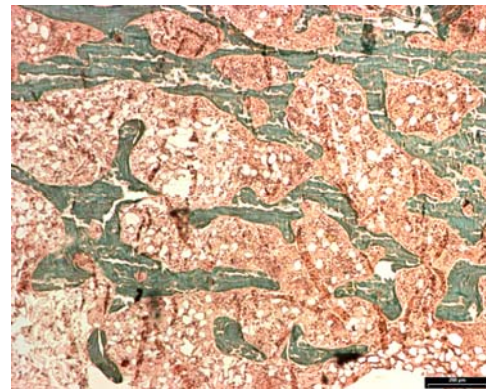
Die Kontrollgruppe erhöht ihr Gewicht um durchschnittlich $78,49 \text{ g} \pm 3,51 \text{ g}$. Vor allem bei den mit Östrogen behandelten Tieren ist das Gewicht im Mittel mit $14,18 \text{ g} \pm 2,86 \text{ g}$ wesentlich geringer. Die anderen Gruppen zeigen zwar keine signifikante Erniedrigung der Gewichtszunahme, weisen aber dennoch eine tendenzielle Abnahme im Vergleich zur Kontrolle auf. Lediglich die mit Ec 25 mg behandelten Tiere zeigen eine nicht signifikant höhere Gewichtszunahme als die Kontrollgruppe.

3.2 Knochenhistologie

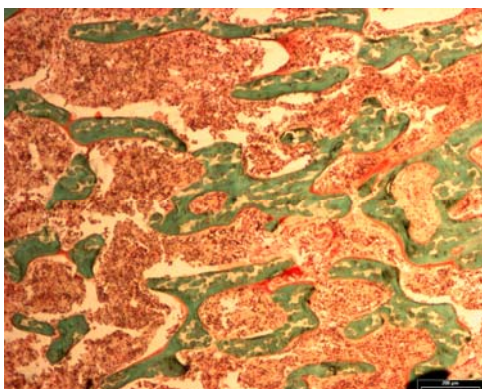
Im Folgenden werden Abbildungen der jeweils mit der Kontrolle verglichenen Substanzgruppen gezeigt. Weiterhin sind zu dem Bildvergleich die entsprechend ermittelten Knochenparameter dargestellt. Das Augenmerk soll insbesondere auf die (hier in grün angefärbten) trabekulären Strukturen gelenkt werden. Es sind deutliche Unterschiede in der prozentualen Fläche wie auch in der trabekulären (nodes, termini) Vernetzung zu erkennen; zu sehen an der vermehrten Ausbildung von Quer- und Längsstreben. Besonders deutlich wird dies im direkten Vergleich der Kontrollen zu der E2-Gruppe. Auch die mit Ec behandelten Gruppen zeigen eine ähnliche Zunahme der Knochen trabekel, wenn auch in unterschiedlichem und nicht mit der Menge der verabreichten Ec-Dosis korrelierendem Maße.



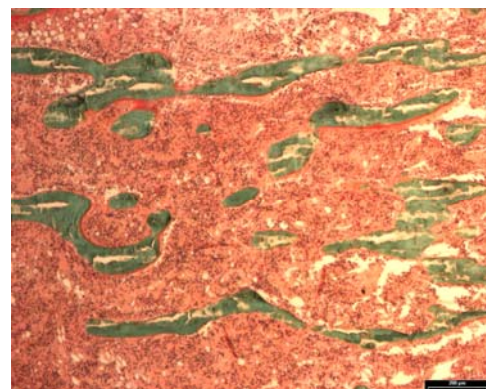
Kontrolle, s.c.



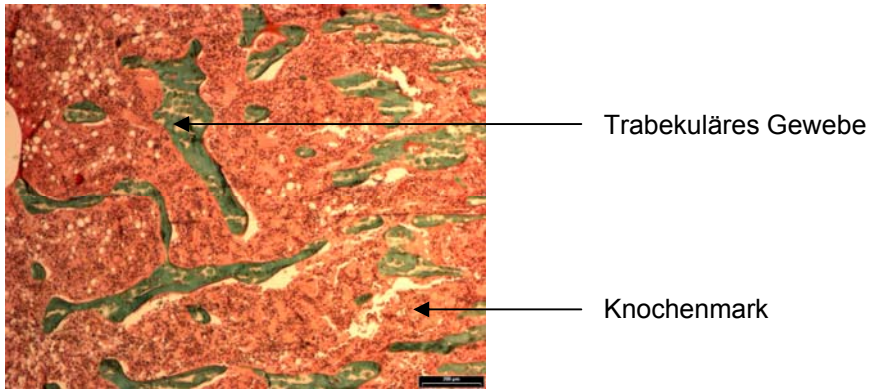
E2, s.c.



Ec 2 mg, s.c.



Ec 10 mg, s.c.



E: Ec 25 mg, s.c.

Abb. 11: Mikroskopische Aufnahme der Rattentibia (4-fach vergrößert) der verschiedenen Versuchsgruppen. A: Kontrollgruppe s.c., B: E2 s.c., C: Ec 2 mg s.c., D: Ec 10 mg s.c., E: Ec 25 mg s.c. Die Farbunterschiede kommen durch die teils notwendige unterschiedlich starke Beleuchtung zustande.

3.2.1 Tibiallänge

In Bezug auf die Tibiallänge, gemessen in mm, lassen sich keine signifikanten Unterschiede der substituierten Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrolle ausmachen. Die durchschnittliche Länge der Tibia bei der Kontrollgruppe beträgt $38,82 \pm 0,37$ mm. Die mit E2 und Ecdyson gespritzten Tiere liegen nur um wenige mm unterhalb dieses Wertes.

Der Effekt von E2 und Ec (4 Wochen s.c. in ovx. Ratten) auf:

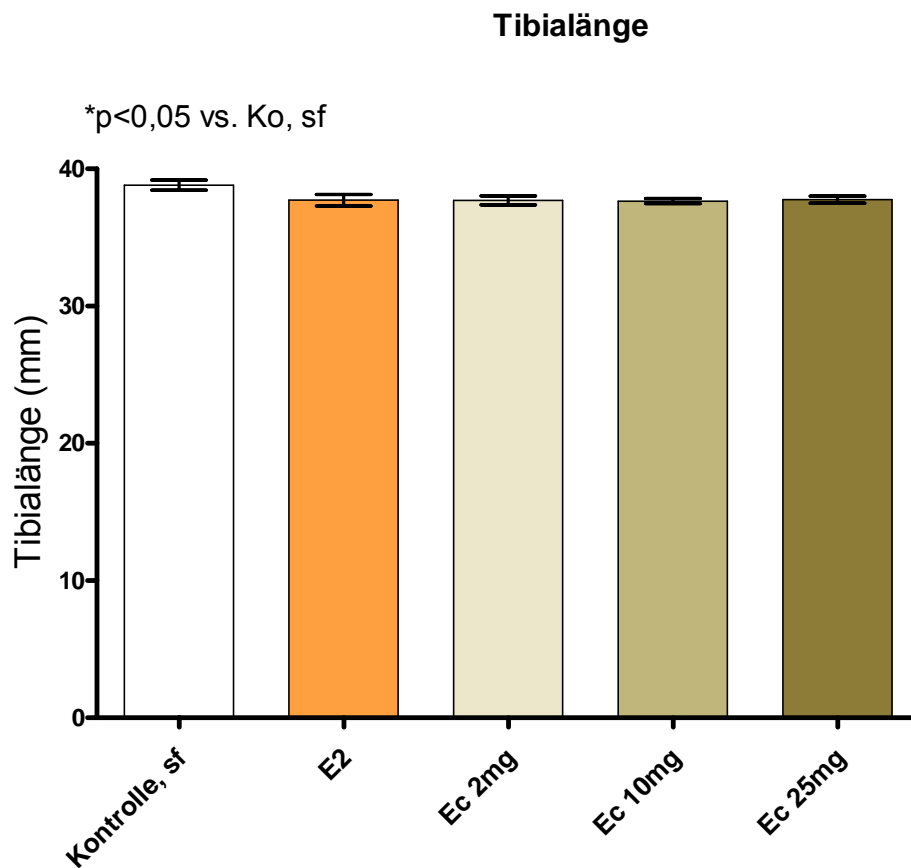


Abb. 12: Effekt von E2, Ec 2 mg, Ec 10 mg und Ec 25 mg (vier Wochen s.c. in ovx S.D. Ratte) auf die Tibiallänge; *: Signifikanz s.c. ($p < 0,05$).

3.2.2 Kortikalisdurchmesser der Diaphyse

Der Durchmesser der Kortikalis bei den Tieren der Kontrollgruppe beträgt $610,2 \pm 27,89 \mu\text{m}$. Die Messwerte der mit E2 und Ec 2 mg bzw. Ec 10 mg substituierten Gruppen liegen im nicht signifikanten Bereich knapp unter diesem Wert. Einzig die Ec 25 mg-Gruppe zeigt eine signifikante Verringerung des Kortikalis-Durchmessers im diaphysären Bereich im Vergleich zur Kontrollgruppe auf $524,6 \pm 19,43 \mu\text{m}$, was einen Unterschied von im Schnitt $85,57 \pm 33,99 \mu\text{m}$ ausmacht.

Der Effekt von E2 und Ec (4 Wochen s.c. in ovx. Ratten) auf:

Kortikalisdurchmesser Diaphyse

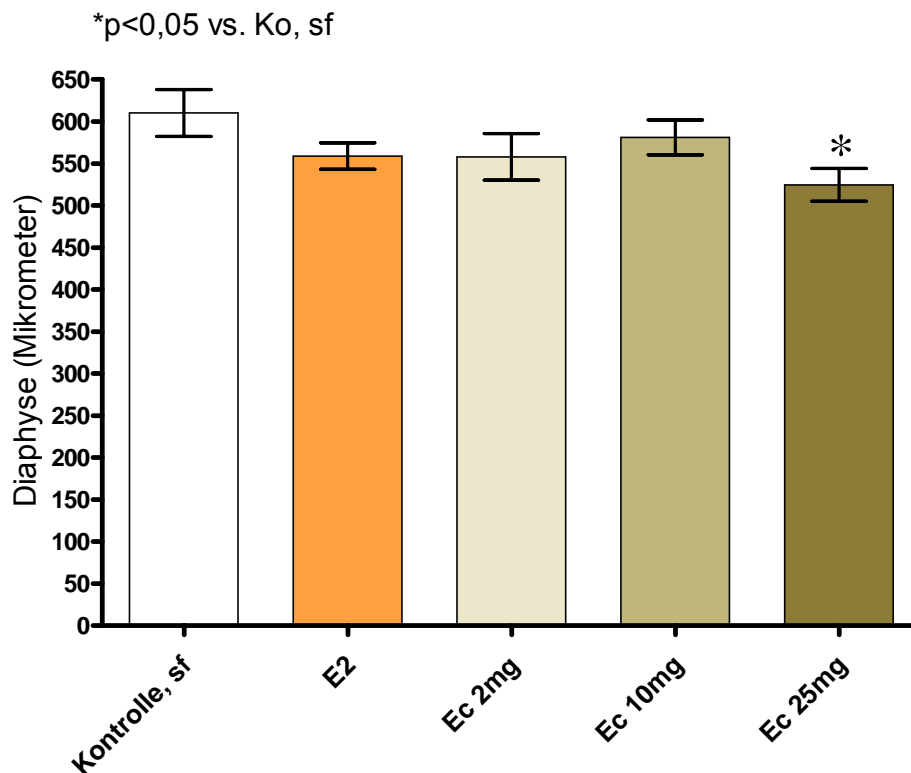


Abb. 13: Effekt von E2, Ec 2 mg, Ec 10 mg und Ec 25 mg (vier Wochen s.c. in ovx S.D. Ratte) auf den Kortikalisdurchmesser der Diaphyse; *: Signifikanz s.c. ($p < 0,05$).

3.2.3 Kortikalisdurchmesser der Metaphyse

Im Vergleich zur Kontrolle ergeben sich bei den übrigen Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Kortikalis-Durchmessers im Bereich der Metaphyse.

Der Effekt von E2 und Ec (4 Wochen s.c. in ovx. Ratten) auf: Kortikalisdurchmesser Metaphyse

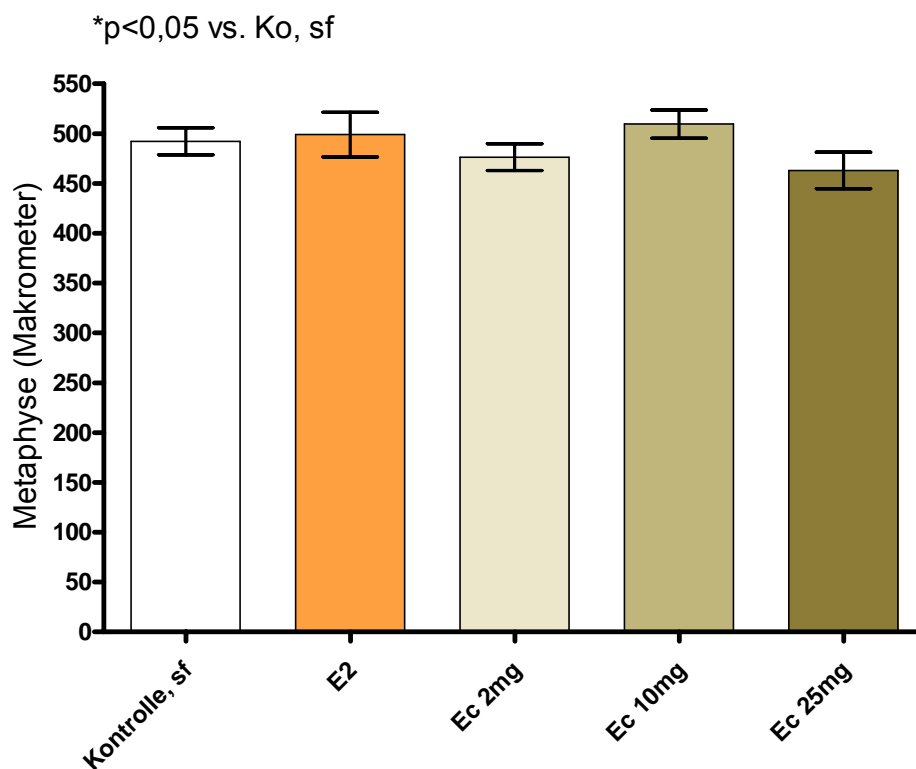


Abb. 14: Effekt von E2, Ec 2 mg, Ec 10 mg und Ec 25 mg (vier Wochen s.c. in ovx S.D. Ratte) auf den Kortikalisdurchmesser der Metaphyse; *: Signifikanz s.c. ($p < 0,05$).

Von den durchschnittlichen Werten um $492,3 \pm 13,63 \mu\text{m}$ bei den Kontrolltieren differieren die E2- und Ec 10 mg-Gruppen mit einer nicht signifikanten Messwert-Erhöhung. Die Unterschiede betragen $6,762 \pm 25,10 \mu\text{m}$ bzw. $17,24 \pm 19,59 \mu\text{m}$. Höhere Werte als die Kontrollgruppe erzielen hingegen die mit Ec 2 mg und Ec 25 mg substituierten Gruppen mit Unterschieden von $15,85 \pm 19,20 \mu\text{m}$ bzw. $29,29 \pm 22,54 \mu\text{m}$.

3.2.4 Rotes Knochenmark

Nach Beendigung des Versuches zeigen alle mit Ec substituierten Gruppen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine Zunahme des prozentualen roten Knochenmark-Anteils. Im Fall der mit Ecdyson 2 mg und 25 mg behandelten Ratten ist diese Erhöhung zusätzlich signifikant. Die deutlichste Zunahme zeigt sich in der Ec 25 mg-Gruppe mit Werten von $36,34 \% \pm 1,69 \%$, welche im Schnitt $4,45 \% \pm 1,93 \%$ höher liegen als die Werte der Kontrolltiere. Die Zunahme des roten Knochenmarks beträgt $3,46 \% \pm 1,12 \%$ bei der Ec 2 mg-Gruppe bzw. $1,07 \% \pm 0,87 \%$ bei den mit Ec 10 mg behandelten Ratten.

**Der Effekt von Ecd und E2 (4 Wochen s.c. in ovx. Ratten) auf:
rotes Knochenmark (pozentualer Anteil der Gesamtoberfläche)**

* $p < 0,05$ vs. Ko, sf

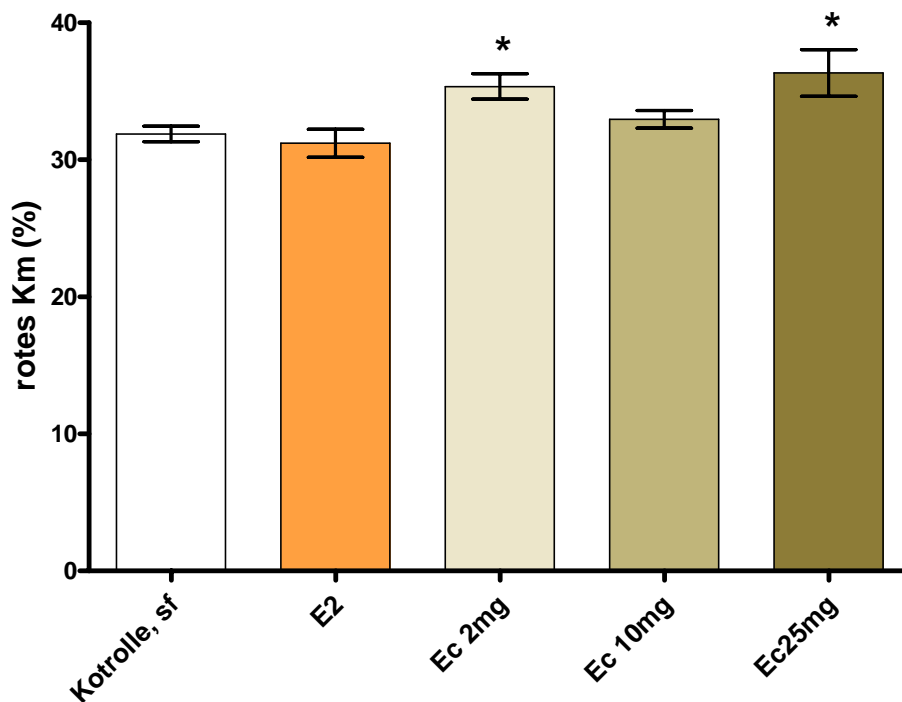


Abb. 15: Effekt von E2 und Ec 2mg, Ec 10 mg und Ec 25 mg (vier Wochen s.c. in ovx S.D. Ratte) auf den prozentualen Anteil des roten Knochenmarkes an der Gesamtoberfläche; *: Signifikanz s.c. ($p < 0,05$).

Die mit E2 gespritzten Tiere gehören zur einzigen Gruppe, die keinen prozentualen Anstieg des roten Knochenmarkes gegenüber der Kontrollgruppe aufweisen. Mit durchschnittlichen Werten von $31,21 \pm 1,03$ % im Vergleich zum Mittel der Kontrollgruppe von $31,89 \pm 0,57$ % zeigen die Tiere der E2-Gruppe mit einem Unterschied von nur $0,67 \pm 1,2$ % aber auch keinen signifikanten Abfall der Ergebnisse.

3.2.5 Gelbes Knochenmark

Der mittlere prozentuale Anteil gelben Knochenmarks liegt bei den Tieren der Kontrollgruppe bei $8,75 \% \pm 0,43 \%$. Die durchschnittlichen Werte der Vergleichsgruppen zeigen verminderte Ergebnisse. Während die Abnahme der E2-Gruppe mit $7,79 \% \pm 0,23 \%$ im nicht signifikanten Bereich liegt, weisen die mit Ec substituierten Ratten eine signifikante Erniedrigung des gelben Knochenmark-Anteils im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

Nach vier Wochen sind in diesen Gruppen die Werte um $1,58 \% \pm 0,51 \%$ (Ec 2 mg), $2,37 \% \pm 0,51 \%$ (Ec 10 mg) und $2,46 \% \pm 0,47 \%$ (Ec 25 mg) gesunken.

**Der Effekt von Ecd und E2 (4 Wochen s.c. in ovx. Ratten) auf:
gelbes Knochenmark (prozentualer Anteil der Gesamtoberfläche)**

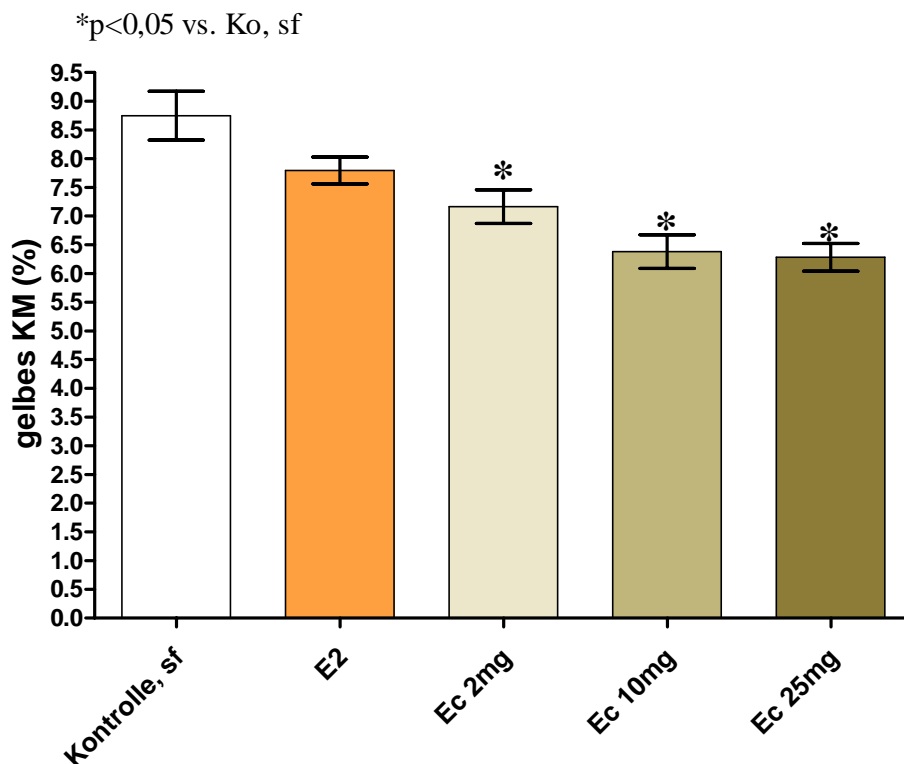


Abb. 16: Effekt von E2, Ec 2 mg, Ec 10 mg und Ec 25 mg (vier Wochen s.c. in ovx S.D. Ratte) auf den prozentualen Anteil des gelben Knochenmarkes an der Gesamtoberfläche; *: Signifikanz s.c. ($p < 0,05$).

3.2.6 Trabekel

Nach vierwöchiger Substitution der ovx. Ratten mit E2 und Ec in unterschiedlicher Dosierung zeigen alle Gruppen gegenüber den Kontrolltieren eine signifikante Erhöhung des trabekulären Anteils. Die Kontrollgruppe erreichte Werte von 12,71 % \pm 0,71%. Die deutlichste Zunahme wies hierzu die mit E2 behandelte Gruppe mit einem Unterschied von 6,01 % \pm 1,07 %, insgesamt also durchschnittlichen Ergebnissen von 18,72 % \pm 0,8%, auf.

Der Einfluss von E2 und Ec (4 Wochen s.c. in ovx. Ratten) auf: prozentualer Anteil der Trabekel

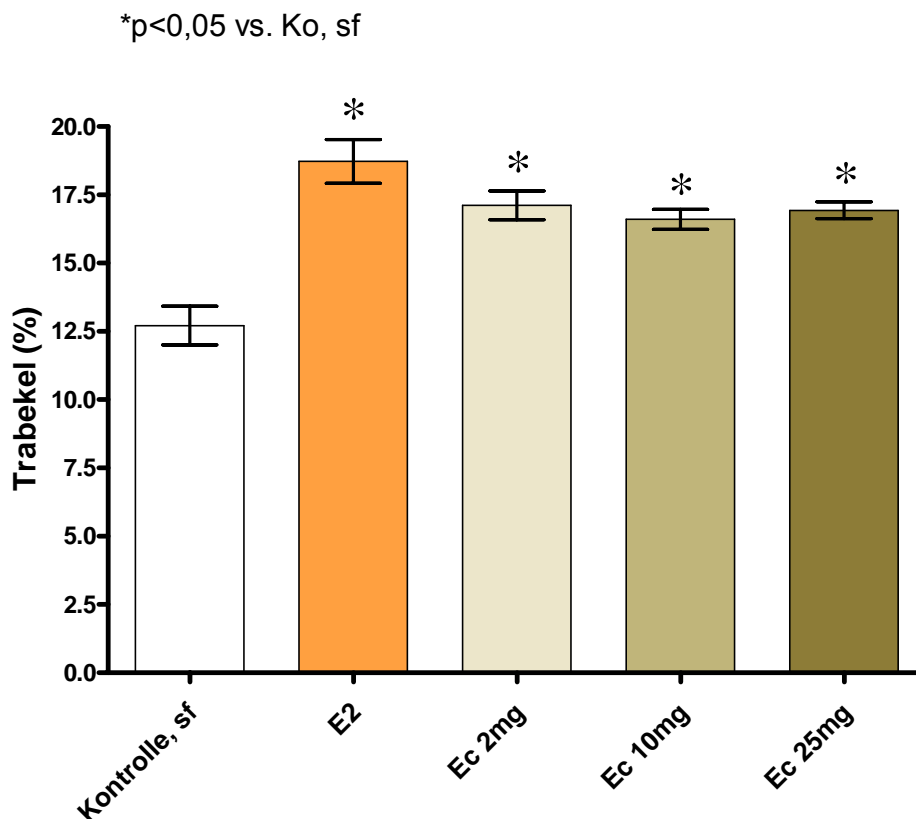


Abb. 17: Effekt von E2, Ec 2 mg, Ec 10 mg und Ec 25 mg (vier Wochen s.c. in ovx S.D. Ratte) auf den prozentualen Anteil der Trabekel an der Gesamtoberfläche; *: Signifikanz s.c. ($p < 0,05$).

Die mit Ec substituierten Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich der prozentualen Anteile roten Knochenmarks untereinander kaum. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (12,71 % \pm 0,71 %) sind die Werte mit 17,11 % \pm 0,53 % (Ec 2 mg),

16,60 % \pm 0,36 % (Ec 10 mg) bzw. 16,93 % \pm 0,31 % (Ec 25 mg) jedoch signifikant erhöht.

3.2.7 Nodes

Die Anzahl der Nodes der Tiere der Kontrollgruppe wurde im Mittel mit $9,78 \pm 0,66$ Nd pro Gesichtsfeld ($3.345.600 \mu\text{m}^2$) ausgezählt. Bei allen anderen Gruppen zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Erhöhung der Anzahl der Nodes.

Der Effekt von E2 und Ec (4 Wochen s.c. in ovx. Ratten) auf:

Anzahl der Nodes

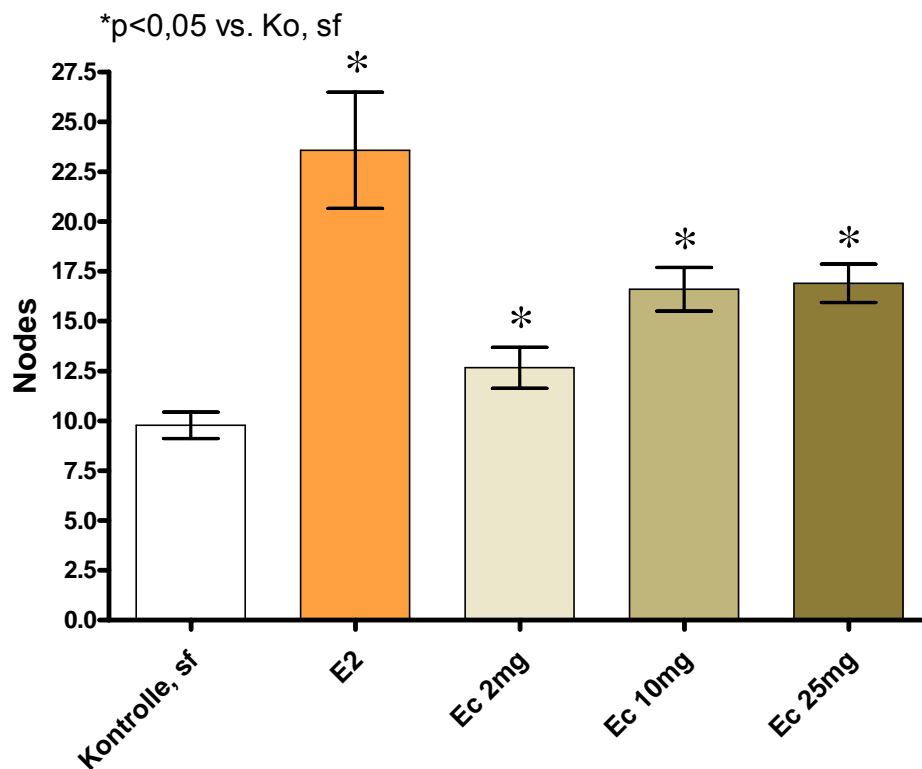


Abb. 18: Effekt von E2, Ec 2 mg, Ec 10mg und Ec 25 mg (vier Wochen s.c. in der ovx. S.D. Ratte) auf die Anzahl der Nodes (Kreuzungspunkt von zwei oder mehr Trabekeln) im trabekulären Netzwerk; *: Signifikanz s.c. ($p < 0,05$).

Am deutlichsten ist dies bei den mit Östradiol gespritzten Ratten zu sehen. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Nodes-Anzahl von im Mittel $13,79 \pm 2,66$ Nd. D.h. es kam in dieser Gruppe zu mehr als einer Verdoppelung der Kreuzungspunkte von zwei oder mehr Trabekeln. Eine signifikante Zunahme konnte ebenfalls unter den mit Ec 2 mg, Ec 10 mg und Ec 25 mg substituierten Gruppen eruiert werden, wenn es auch nicht zu einer so starken Erhöhung der Anzahl der Nodes wie unter E2 kam.

3.2.8 Termini

Die Anzahl der Termini verändert sich bei keiner der verabreichten Substanzen gegenüber der Kontrollgruppe ($14,67 \pm 1,23$) signifikant. Unter Verabreichung von E2 erhöht sich die Anzahl der Termini um $2,45 \pm 1,55$ pro Gesichtsfeld ($3.345.600 \mu\text{m}^2$). Die Messungen der mit Ecdyson stimulierten Gruppen zeigen hingegen nicht signifikante Abfälle der Termini. Die Differenz der Werte zur Kontrollgruppe schwankt hier um $-1,29 \pm 1,62$.

Der Effekt von E2 und Ec (4 Wochen s.c. in ovx. Ratten) auf:

Anzahl der Termini

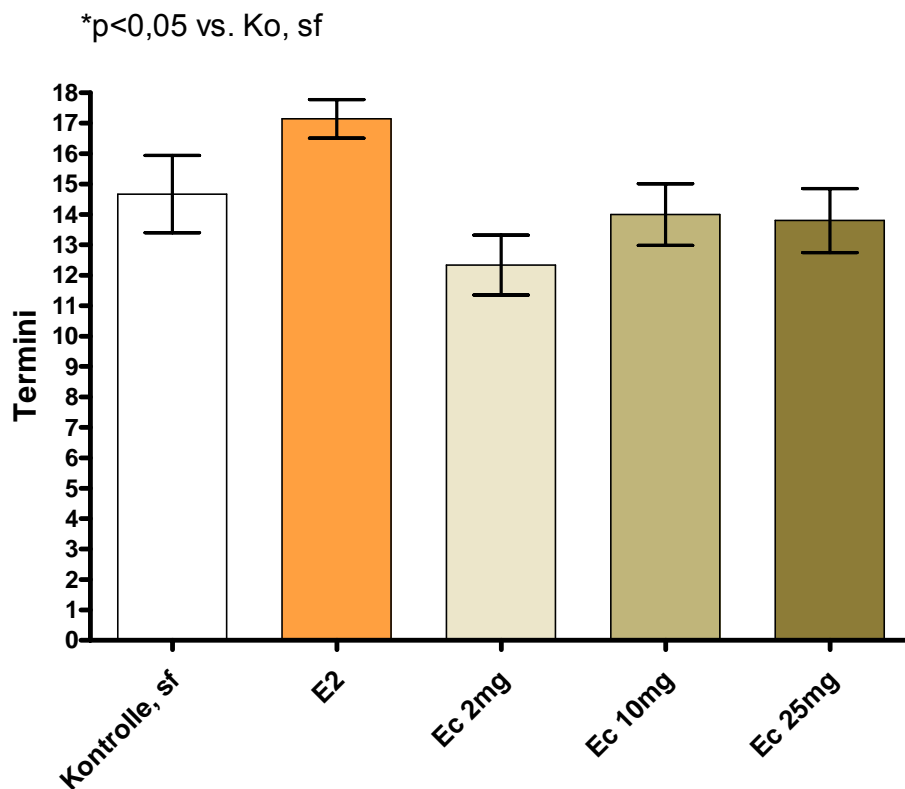


Abb. 19: Effekt von E2, Ec 2mg, Ec 10mg und Ec 25mg (vier Wochen s.c. in der ovx. S.D. Ratte) auf die Anzahl der Termini (frei endende Trabekel) im trabekulären Netzwerk; *: Signifikanz s.c. ($p < 0,05$).

3.2.9 Trabekuläres Netzwerk

Vergleicht man die Indices des trabekulären Netzwerkes (Nd/Termi) der Kontrollgruppe mit den übrigen Versuchsgruppen, so kann man eine signifikante Erhöhung dieses Index bei allen Gruppen feststellen.

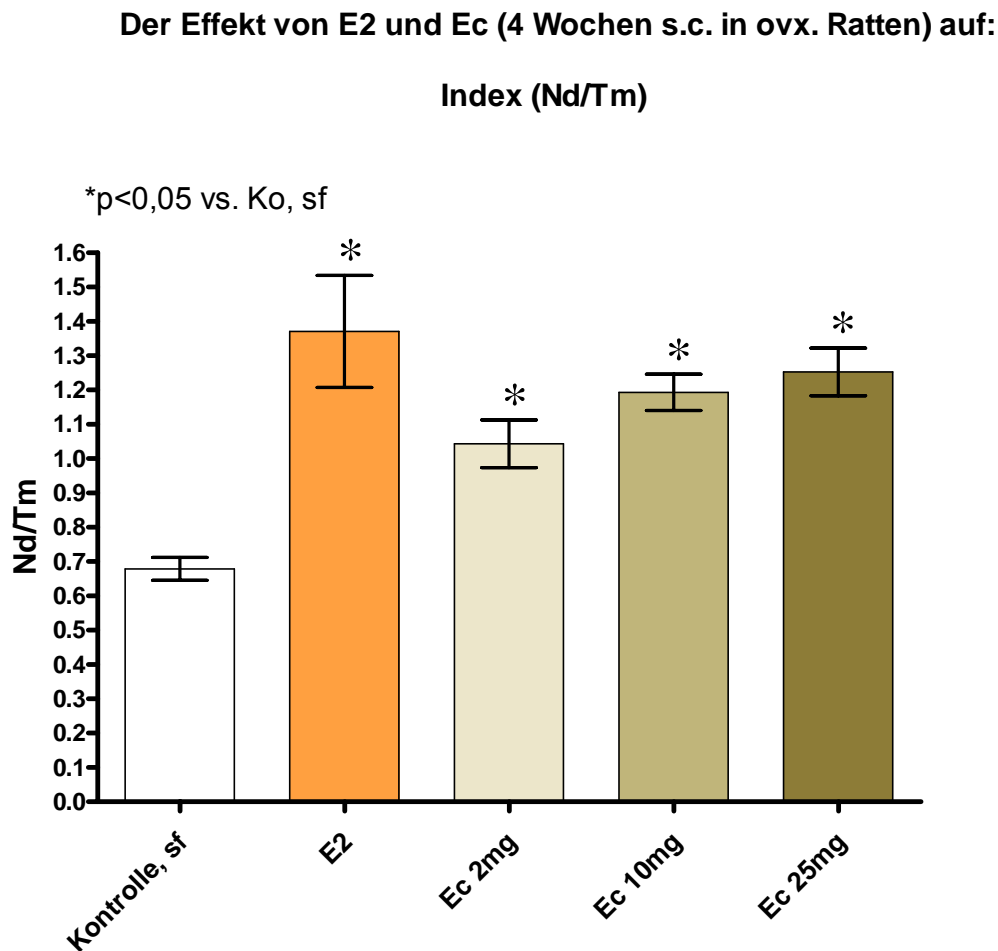


Abb. 20: Effekt von E2, Ec 2mg, Ec 10mg und Ec 25mg (vier Wochen s.c. in der ovx. S.D. Ratte) auf das trabekuläre Netzwerk (Quotient aus Knoten und freien Enden (Nd/Tm)); *: Signifikanz s.c. ($p < 0,05$).

In der Kontrollgruppe findet sich ein Durchschnittsindex von $0,68 \pm 0,03$ pro Gesichtsfeld ($3.345.600 \mu\text{m}^2$). Die deutlichste Zunahme zeigt sich unter E2, worunter sich mehr als eine Verdoppelung des Index herauskristallisiert. Die mit Ec stimulierten Gruppen zeigen in der Reihenfolge ihrer Verabreichungsdosis eine stete Zunahme der Indices: von $1,0 \pm 0,1$ Nd/Tm bei Ec 2 mg über $1,19 \pm 0,1$ Nd/Tm bei Ec 10 mg bis zur größten Index-Erhöhung mit $1,25 \pm 0,07$ Nd/Tm bei der mit Ec 25 mg stimulierten Versuchsgruppe.

3.3 Analyse der Knochenumbaumarker im Serum

3.3.1 Serum-Osteocalcin

Die Serum-Osteocalcin-Werte verändern sich einzig bei der mit E2 stimulierten Versuchsgruppe signifikant. Nach der vierwöchigen Versuchsdauer liegt ein deutlich erniedrigter Serum-OC-Spiegel bei der E2-Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe vor. Die Werte sinken auf über die Hälfte von $38,97 \pm 1,56$ ng/ml (Kontrolle) auf $16,61 \pm 0,88$ ng/ml (E2) ab. Die Messwerte der Ec-Gruppen bleiben im Nanogramm/ml-Bereich relativ konstant und liegen sehr eng an denen der Kontrollgruppe.

Der Effekt von E2 und Ec (4 Wochen s.c. in ovx. Ratten) auf:

Serum-OC

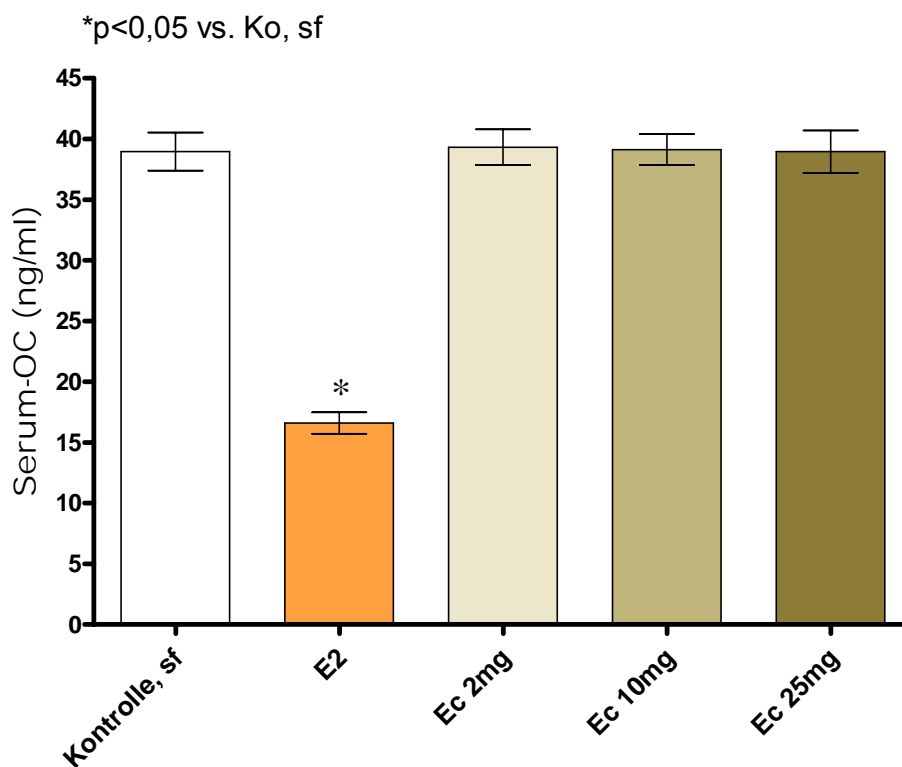


Abb. 21: Effekt von E2, Ec 2mg, Ec 10mg und Ec 25mg (vier Wochen s.c. in ovx S.D. Ratte) auf den Serumspiegel von Osteocalcin; *: Signifikanz s.c. (p<0,05).

3.3.2 Serum-Osteoprotegerin

Nach der vierwöchigen Versuchsdauer liegt ein deutlich erhöhter, signifikanter Osteoprotegerin-Spiegel in der mit Ec 25mg substituierten Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe vor. Die Werte der Kontrolle liegen mit $1,48 \pm 0,25$ pmol/l um die Hälfte unter denen der Ec 25 mg-Gruppe mit $3,145 \pm 0,62$ pmol/l. Für E2 lässt sich lediglich eine nicht signifikante Tendenz zur Erhöhung der OC-Serum-Werte erkennen. Die mit Ec 2 mg und 10 mg stimulierten Gruppen zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe kaum Veränderungen des Serumspiegels (Ec 10 mg) bzw. ein tendenziell herabsetzenden Effekt (Ec 2 mg), der aber nicht signifikant ist.

Der Effekt von E2 und Ec (4 Wochen s.c. in ovx. Ratten) auf:

Serum OPG

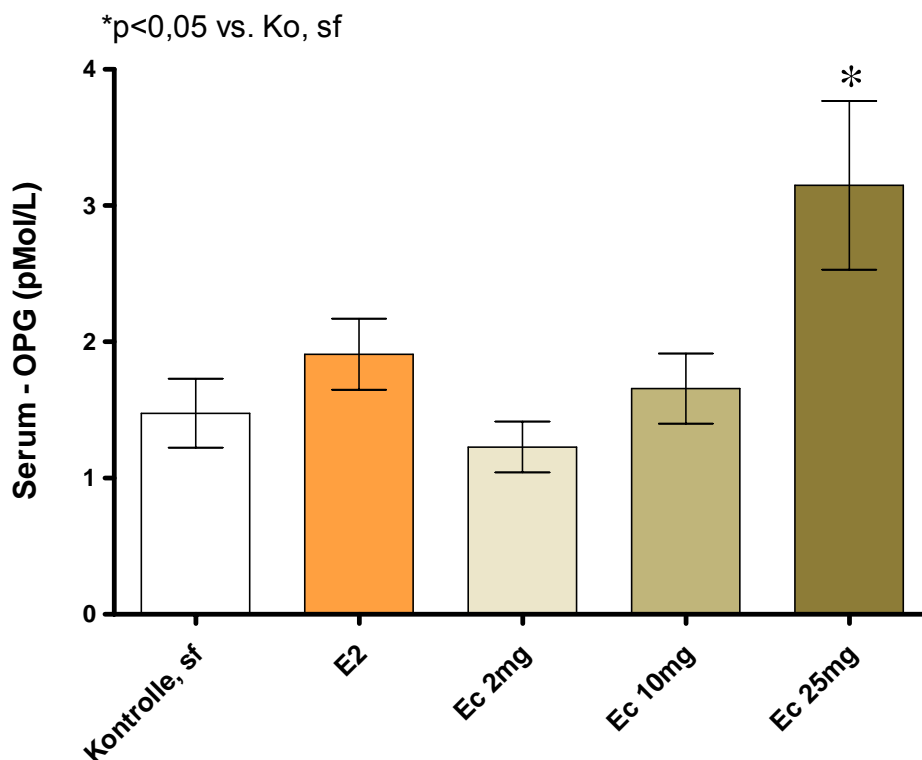


Abb. 22: Effekt von E2, Ec 2mg, Ec 10mg und Ec 25 mg (vier Wochen s.c. in ovx S.D. Ratte) auf den Serumspiegel von Osteoprotegerin; *: Signifikanz s.c. ($p < 0,05$).

3.3.3 Serum-RANKL

Der nur bei den Substanzgruppen E2 und Ec 25 mg im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessene Serum-RANKL-Spiegel zeigt nach Versuchsablauf unterschiedliche Veränderungen, die jedoch jeweils nicht signifikant sind. In der Kontrollgruppe zeigen sich Spiegel von $9,07 \pm 3,26$ pmol/l. Während die E2-stimulierte Gruppe mit einer Differenz von $- 2,76 \pm 4,66$ pmol/l im Vergleich zur Kontrollgruppe absinkende Serum-RANKL-Spiegel aufweist, zeigen diese bei der Ec 25 mg-Gruppe mit einem Unterschied von $2,02 \pm 4,74$ pmol/l eine Tendenz zur Erhöhung.

Der Effekt von E2 und Ec (4 Wochen s.c. in ovx. Ratten) auf:

Serum-sRANKL

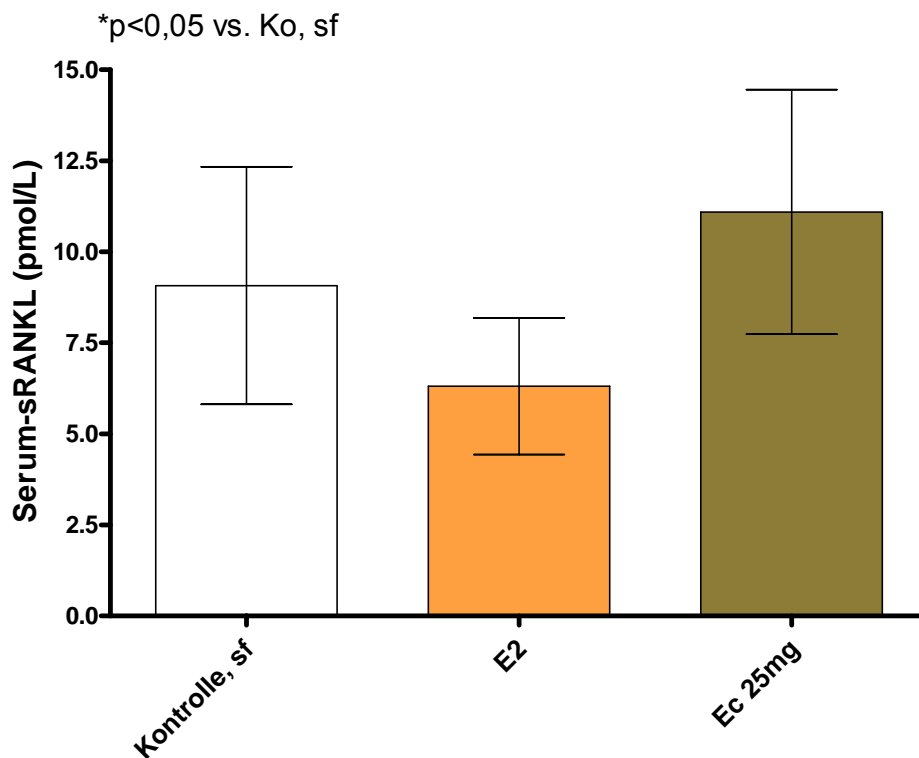


Abb. 23: Effekt von E2 und Ec 25 mg (vier Wochen s.c. in ovx S.D. Ratte) auf den Serumspiegel von RANKL; *: Signifikanz s.c. ($p < 0,05$).

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In den folgenden Tabellen werden die Ergebnisse der erfassten Parameter zusammengefasst dargestellt.

	Gewichtszunahme	Tiergewicht (g)	Tibiallänge (mm)
Kontrolle, s.c.	78,5 ± 3,5	312,4 ± 5,7	38,8 ± 0,4
E2, s.c.	*↓	*↓	↓
Ec 2 mg s.c.	↓	↓	↓
Ec 10 mg s.c.	↓	*↓	↓
Ec 25 mg s.c.	↑	↓	↓

Tab. 4: Zusammenfassung der Ergebnisse in Bezug auf die Gewichte (Gewichtszunahme, Tiergewicht bei Versuchsende) und Tibiallänge bei ovariectomierten S. D.- Ratten nach Gabe von E2 s.c., Ec 2 mg s.c., Ec 10 mg s.c. und Ec 25 mg s.c. über vier Wochen. ↑: Anstieg, ↓: Abfall, *: Signifikanz s. c ($p < 0,05$).

	Osteocalcin (pMol/L)	Osteoprotegerin (ng/ml)	RANKL (pMol/L)
Kontrolle, s.c.	38,9 ± 1,6	1,5 ± 0,3	9,1 ± 3,3
E2, s.c.	*↓	↑	↓
Ec 2 mg s.c.	-	↓	/
Ec 10 mg s.c.	-	↑	/
Ec 25 mg s.c.	-	*↑	↑

Tab. 5: Zusammenfassung der Ergebnisse in Bezug auf die Knochenumbaumarker im Serum (OPG, OC, RANKL) bei ovariectomierten S. D.- Ratten nach Gabe von E2 s.c., Ec 2 mg s.c., Ec 10 mg s.c. und Ec 25 mg s.c. über vier Wochen. ↑: Anstieg, ↓: Abfall, -: keine Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe erkennbar, *: Signifikanz s.c. ($p < 0,05$).

	Nodes (Nd)	Termini (Tm)	Nd/Tm	gelbes KM (%)	rotes KM (%)
Kontrolle, s.c.	9,8 ± 0,7	14,7 ± 1,3	0,7 ± 0	8,75 ± 0,43	31,89 ± 0,57
E2, s.c.	*↑	↓	*↑	*↓	*↑
Ec 2 mg, s.c.	*↑	↑	*↑	*↓	*↑
Ec 10 mg, s.c.	*↑	↓	*↑	*↓	*↑
Ec 25 mg, s.c.	*↑	↓	*↑	*↓	*↑

	Trabekel (%)	Kortikalisdicke Metaphyse (µm)	Kortikalisdicke Diaphyse (µm)
Kontrolle, s.c.	12,71 ± 0,71	492,3 ± 13,6	610,2 ± 27,9
E2, s.c.	*↑	↑	↓
Ec 2 mg, s.c.	*↑	↓	↓
Ec 10 mg, s.c.	*↑	↑	↓
Ec 25 mg, s.c.	*↑	↓	*↓

Tab. 6: Zusammenfassung der Ergebnisse in Bezug auf die Knochenhistologie (Nodes, Termini, trabekuläres Netzwerk, rotes und gelbes KM, Kortikalis- und Metaphysendicke) bei ovariectomierten S.D.-Ratten nach Gabe von E2 s.c., Ec 2 mg s.c., Ec 10 mg s.c. und Ec 25 mg s.c. über vier Wochen. ↑: Anstieg, ↓: Abfall, *: Signifikanz s.c. ($p < 0,05$).

4 Diskussion

4.1 Ziel der Studie

Die postmenopausale Osteoporose der Frau aufgrund des klimakterisch induzierten Östrogenmangels und den daraus entstehenden Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel zählt zu einer der häufigsten Erkrankungen des postmenopausalen Lebensabschnittes, der heute bis zu einem Drittel der Lebenszeit ausmacht (Greendale und Judd 1993).

Aufgrund der umstrittenen Ergebnisse der WHI-Studie wird die Anwendung der herkömmlichen HET zur Therapie wechseljahresbedingter Beschwerden heute differenzierter betrachtet. Neue Substanzen, die idealerweise positive Eigenschaften wie den Osteoporeschutz oder eine Brustkrebs-Prävention aufweisen, dabei aber keine unerwünschten Effekte, wie z.B. die Zunahme des Thrombose-Risikos, besitzen, stehen derzeit im Focus der Forschung.

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung des Ecdyson im Vergleich zu Östradiol zu untersuchen. Als Untersuchungsparameter wurden die Körpergewichte, die Tibialänge, die Beurteilung der Tibiahistologie sowie die Serumparameter Osteoprotegerin, RANKL und Osteocalcin von Ratten gewählt. Als Positiv-Kontrolle zur Beurteilung der Ergebnisse der Testsubstanzen wurde E2 eingesetzt.

Eine agonistische Östrogenwirkung hinsichtlich der Körpergewichte und Serum-Parameter wäre wünschenswert, da es durch den Östrogenabfall häufig zu einer Gewichtszunahme und einer Veränderung im Knochenstoffwechsel im Sinne einer high-turnover-Osteoporose kommt. Auch bezüglich der Knochenhistologie wären Östrogen-agonistische Effekte erstrebenswert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen einen Ausblick auf mögliche therapeutische und präventive Alternativen zur klassischen HET in der Behandlung postmenopausaler Beschwerden geben.

4.2 Wirkung auf das Körpergewicht

Unter postmenopausalen Bedingungen kommt es gehäuft zu einer Umverteilung des Körperfettes vom gynoiden zum androiden Typ und einer Zunahme des metabolischen Syndroms (Simoncig-Netjasov et al. 2010).

Verschiedene tierexperimentelle Studien zeigten die Entwicklung von Adipositas nach Ovariectomie und den damit verbundenen sinkenden Hormonspiegeln sowie die Reduktion der Gewichtszunahme bei entsprechender Östrogensubstitution (Mc Elroy und Wade 1987). Als ursächlich für diesen Effekt wird die den Schlüsselhormonen des Energiehaushaltes (Leptin, Insulin) ähnliche Wirkweise des E2 postuliert (Zhang et al. 1994, Gao und Du 2008).

Im Versuchsverlauf ist eine Gewichtszunahme bei allen Tieren zu verzeichnen, was unter anderem auf das physiologische Wachstum zurückzuführen ist.

Nach der Ovariectomie wiesen aber sowohl die mit E2 behandelten als auch die mit Ec 10 mg substituierten Tiere am Ende der Studie ein signifikant geringeres Körpergewicht auf als die Kontrollgruppe (Abb. 13). Dieser Effekt zeigt sich ebenfalls bei Betrachtung der unterschiedlichen physiologischen Gewichtszunahme der Tiere (Abb. 14). Der größte Effekt wurde durch E2 erzielt. Unter E2-Substitution war dieser Effekt zu erwarten. Auch für Ec konnte die Arbeitsgruppe um Kitzelstein sowohl in vitro als auch in vivo tierexperimentell bereits gleichsinnige Resultate aufzeigen. Unter Gabe von Ec verringerten Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant den Anteil der Körperfettmasse, der fettfreie Körpermassenanteil wurde hingegen nur gering reduziert (Kitzelstein et al. 2008). Mironova et al. zeigten bereits 1982 die Cholesterin-senkende Wirkung von Ec.

Die stärkste Wirkung der Ecdyson-Applikationen wies die Dosierung von 10 mg auf. Die Verabreichung von 2 mg und 25 mg Ecdyson zeigte interessanterweise keinen nennenswerten Einfluss auf das Körpergewicht. Die Gewichte dieser Versuchsgruppen stellten sich zu Versuchsende nahezu identisch mit denen der Kontrollgruppe dar. Seidlová-Wuttke et al. zeigten im Rahmen einer fortführenden Studie, dass mit Ec behandelte Ratten weniger Fett entwickelten (Seidlová-Wuttke et al. 2010b).

4.3 Wirkung auf den Knochen

Im Anschluss an die Tötung der Tiere wurden die Tibiae exstirpiert und die verschiedenen Parameter erfasst, um eine Aussage über die Effekte der verwendeten Substanzen am Knochen treffen zu können.

Der Knochen diente in dieser Untersuchung als Referenzorgan, da die proliferationsfördernde Wirkung der Östrogene auf dieses Gewebe hinsichtlich der Entwicklung einer postmenopausalen Osteoporose als protektiv zu werten ist (Gruber et al. 2002, Christiansen et al. 1981). Eine dauerhafte E2-Substitution zur Behandlung von klimakterischen Beschwerden, wie sie in der klassischen HET angewandt wird, zieht aber im Gegenzug an anderen Geweben negative Auswirkungen, wie ein vermehrtes Endometriumwachstum am Uterus, nach sich und erhöht somit die Anzahl von malignen Entartungen (Feeley und Wells 2001). Von den in dieser Arbeit untersuchten Ecdysteroiden erwünscht man sich daher agonistische Östrogeneffekte auf den Knochen. Antagonistische Wirkungen wären hingegen z.B. am Uterus wünschenswert. Diese Fragestellung wurde, neben anderen, ebenfalls im Zuge der vorliegenden Studie untersucht, ist jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit. Die Resultate der Messung der Tibialänge und die Ergebnisse der Histologie der einzelnen Knochen-Parameter werden bezüglich dieser Annahme im Folgenden diskutiert.

Wie mehrfach in der Literatur beschrieben, reduziert die Substitution von E2 nach einer Ovariectomie sowohl die Knochenresorption als auch den Knochenwiederaufbau. Dabei wird die Osteoklastenaktivität mehr herunterreguliert als die der Osteoblasten, wodurch in der Summe der Osteoporoseentwicklung entgegengewirkt wird (Manolagas 2000, Seidlová-Wuttke et al. 2006, Seidlová-Wuttke et al. 2003). Der nach einer Ovariectomie erhöhte Knochenstoffwechsel nähert sich somit wieder dem Level vor der Ovariectomie an. Diese These stützt sich zusätzlich auf einen weiteren Effekt des E2 am Knochen, welcher in einer Senkung der Osteocalcin-Spiegel im Serum besteht, der ohne E2-Substitution nach einer Ovariectomie ansteigt (Seidlová-Wuttke et al. 2006).

Wie bereits erwähnt, wird dem Ec eine anabole Wirkung im menschlichen Organismus zugeschrieben (s.a. Kapitel 1, 1.4, Seite 8 ff.). Verschiedene Studienreihen haben aber gezeigt, dass dies nicht in Bezug auf die Uterusgewichte

von Ratten zutrifft. Östrogene hingegen steigern das Gewicht der Ratten-Uteri (Seidlová-Wuttke et al. 2010a). Zudem zeigen die beiden Substanzen gegensätzliche Auswirkungen auf den Osteocalcin-Serumspiegel sowie den LH- und LDH-Serum-Spiegel. Es liegt also die Vermutung nahe, dass beide Substanzen über unterschiedliche Mechanismen wirken, Ec also entgegen der östrogenen Wirkung auf die Knochenhistologie nicht am ER angreift. Kapur et al. zeigten, dass Ecdyson auch in hohen Konzentrationen nicht in der Lage ist, an zytoplasmatische Östrogen-Rezeptoren zu binden (Kapur et al. 2010). Es bleibt die Frage zu klären, auf welchem Weg Ec seinen Wirkmechanismus entfaltet.

Ecdysteroide wirken über eine Aktivierung des Retinoid-X-Rezeptors, der hieraufhin unter anderem mit dem Vitamin-D-Rezeptor dimerisiert (Thomas et al. 1993). Da Vitamin D die intestinale Calcium-Aufnahme fördert und die Osteoblasten zur Produktion von Osteocalcin anregt (Skjødt et al. 1985), welches essentiell für die Knochen-Mineralisierung ist, könnte dies ein Faktor für die positiven Auswirkungen des Ec auf den Knochen sein. Untermuert wird diese These durch die in der vorliegenden Studie erhöhten Osteocalcin-Werte - ein Effekt, der auch durch Vitamin D erzielt wird.

Zugleich vermitteln die Retinoid-X-Rezeptoren hingegen Kaskaden auf Kosten der Osteoblastogenese, wie zum Beispiel die Entwicklung von Lipozyten durch Dimerisierung mit PPARs (Bathori et al. 2008). Diese Tatsache widerspricht wiederum den antiresorptiven und damit antiosteoporotischen Effekten des Ec. Eine Erklärung der unterschiedlichen Auswirkungen am Knochen resultierend aus der RXR/PPAR-Aktivierung durch Ec-Bindung könnte die Hypothese einer selektiven Rezeptormodulation bieten. So haben einzelne Subtypen der PPAR z.B. sowohl lipolytische als auch lipogene Funktionen. Durch unterschiedlich starke Bindungsaffinität zu den einzelnen Subtypen könnten so modulierende Effekte hervorgerufen werden. Dies würde bedeuten, dass Ec gezielt mehr unterdrückende als stimulierende Faktoren im Knochengewebe aktiviert, vergleichbar mit der Funktion der SERMS (Seidlová-Wuttke et al. 2010a).

Die Arbeitsgruppe um Bathori zeigte, dass die Behandlung mit Ec in Kombination mit körperlichem Training beim Menschen zu einer vergrößerten Muskelmasse führen kann (Bathori et al. 2008). Erwiesenermaßen stimuliert körperliche Muskelaktivität das Knochenwachstum und verbessert die Knochendichte (Flieger et al. 1998). Die verbesserte Knochenhistologie der Ec-behandelten Tiere könnte also ebenfalls auf

einem vermehrten Muskelzuwachs und konsekutiver erhöhter mechanischer Stimulation des Knochengewebes basieren.

4.3.1 Wirkung auf die Tibialänge

Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Werte bilden die Tibiae der Ratten, da auf ihnen das größte Gewicht des Tieres lastet und die auf sie einwirkenden Kräfte in festem Verhältnis zu denen des Femurs stehen und somit als repräsentativ für diese Region anzusehen sind. Dies ist insofern von Bedeutung, als der größte Teil des Körpergewichtes beim Menschen auf dem proximalen Femur liegt und der Oberschenkelknochen zu den loco typico der osteoporosebedingten Frakturen gehört.

In der vorliegenden Studie konnte kein signifikanter Unterschied der einzelnen Gruppen bezüglich der Tibialänge festgestellt werden. Dies könnte u.a. an der Versuchsdauer liegen. Die Gabe von Ec scheint, über den hier festgelegten Zeitraum von wenigen Wochen betrachtet, weder einen das Längenwachstum der Tibia fördernden noch hemmenden Einfluss zu haben. Da das Längenwachstum im Bereich der metaphysären Wachstumsplatte stattfindet, reicht es jedoch nicht, nur die reine Knochenlänge zu betrachten. Es muss insbesondere der Einfluss der untersuchten Substanzen auf die zellulären Strukturen im Bereich der Metaphyse betrachtet werden. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass unter E2-Einfluss das Längenwachstum des Knochens gehemmt wird. Nach Ovariectomie, also E2-Entzug, kommt es hingegen zu einer Zunahme des Längenwachstums (Yao et al. 2006; Weise et al. 2001). Weiterführende Untersuchungen, welche eine vierwöchige orale Substitution von Ec in Ratten beinhalteten, konnten eine deutliche Zunahme der metaphysären Aktivität im Sinne eines Anstieges der Chondrozytenzahl ausmachen (Kapur et al. 2010). Dies würde sich wiederum positiv auf das trabekuläre Netzwerk auswirken, da Chondrozyten die vermehrte Rekrutierung von Osteoblasten, also Knochen-bildenden Zellen, nach sich ziehen (Nilsson et al. 2005).

Eine endgültige Beurteilung der Ec-Wirkung auf das Längenwachstum der Tibia kann an dieser Stelle auf Grund der vorliegenden Daten jedoch nicht gegeben werden und nur durch differenzierte Langzeitversuche erfolgen.

4.3.2 Wirkung auf die Histomorphologie des Knochens

Die histologische Auswertung der Tibiae dieser Versuchsreihe ergab unter E2-Gabe erwartungsgemäß eine deutliche Verbesserung der Knochenqualität, insbesondere hinsichtlich des trabekulären Netzwerkes.

Die verwendeten unterschiedlichen Dosen des Ecdyson zeigten bezüglich der Histomorphologie des Knochengewebes gleichsinnige, aber unterschiedlich eindeutige Ergebnisse. Der Einfluss der Substanzen auf die einzelnen Parameter wird im Folgenden diskutiert.

Hinsichtlich des Kortikalis-Durchmessers im Diaphysen- und Metaphysenbereich zeigen sich lediglich unter Östrogenapplikation signifikante Veränderungen im Vergleich zur ovariectomierten Kontrollgruppe bezüglich des kortikalen Diaphysendurchmessers. Alle Gruppen zeigen - wie für den Aufbau des Knochens üblich - einen deutlich größeren Kortikalis-Durchmesser an der Diaphyse als an der Metaphyse.

Nach einer Ovariectomie kommt es in der Regel zu einer vorübergehenden Zunahme der kortikalen Knochenmasse. So zeigten Bagi et al. an den Tibiae von Ratten, dass sechs Wochen nach der Ovariectomie ein größerer Kortikalisdurchmesser bestand als vor dem Eingriff, jedoch 12 Wochen post-ovx. der Durchmesser wieder zurückging.

Es werden verschiedene Faktoren als ursächlich vermutet. Zum einen kann die häufig beobachtete Gewichtszunahme bei Östrogenmangel mechanisch den Kortikalisdurchmesser steigern. Des Weiteren kommt es zu einer Ausdehnung der enchondralen Knochensubstanz, welche den kortikalen Knochen im Durchmesser größer erscheinen lassen kann (Bagi et al. 1993).

In der vorliegenden Studie wird diese These durch den signifikant verringerten Kortikalisdurchmesser im Bereich der Diaphyse nach E2-Substitution bestätigt. Die mit Ec behandelten Tiere zeigten keine signifikante Verminderung des kortikalen Diaphysendurchmessers, die Tendenz wies allerdings in diese Richtung und zeigte damit Östrogen-ähnliche Eigenschaften der Substanz. Für den Kortikalisdurchmesser der Metaphyse ließ sich dieser Effekt nicht verifizieren.

Die Substitution der ovariectomierten Ratten mit Ecdyson führte sowohl zu einer signifikanten Zunahme des roten Knochenmarkes als auch zu einer ebenfalls signifikanten Abnahme des gelben Knochenmarkes. Setzt man diese Ergebnisse in

Beziehung zu den die Mikroarchitektur des Knochens bestimmenden Parametern, kristallisiert sich eine positive Korrelation zwischen der Menge hämatopoetischen Gewebes und der Knochendichte sowie eine negative Korrelation zwischen der Knochendichte und dem gelben Knochenmark heraus.

Die Ergebnisse unserer Studie spiegeln sich auch in Literaturangaben wieder.

Verschiedene Studien an ovariectomierten Ratten zeigten einen Zusammenhang zwischen der Osteoporose und der Hämatopoese auf. Anhand des Knochenmarkes spiegelt sich diese Beziehung in einer Zunahme des gelben (Fett-) Markes und einer Abnahme des blutbildenden roten Knochenmarkes bei bestehender Osteoporose wieder (Lei et al. 2009). Auch in unserer Studie zeigen die nach der Ovariectomie nicht substituierten Tiere den geringsten Anteil an rotem Knochenmark und den höchsten Fettmark-Gehalt, entsprechend der niedrigen trabekulären Knochendichte. Als eine mögliche Ursache für diese Zusammenhänge wird die starke Zunahme von Mastzellen nach einer Ovariectomie vermutet (Chiappetta und Gruber 2006). Den Mastzellen konnte bereits eine Rolle beim Knochenumsatz im Sinne einer Steigerung desselben, verbunden mit Knochengewebsverlust bei hoher Mastzell-Zahl und einer verminderten Remodelling-Rate bei niedriger Zellzahl, nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Osteoblasten-Zahl und der begleitenden Erhöhung der Mastzell-Zahl bei Östrogen-Defizit hergestellt werden (Lesclous und Saffar 1999).

Die Ergebnisse meiner Arbeit stützen auch die These der lipotoxischen Wirkung auf knochenbildende Zellen. Das inverse Verhältnis von Fettmark zu festen Knochenstrukturen zeigt für die mit Ec behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren in der vorliegenden Arbeit signifikante Ergebnisse. Das Überwiegen von Adipozyten in osteoporotischem Knochengewebe und die im Gegenzug verminderte Anzahl von Osteoblasten ist mehrfach beschrieben worden (Rodriguez et al. 2009, Justesen et al. 2001, Robey und Bianco 1999). Als ursächlich konnten verschiedene Enzyme, z.B. die Fettsäure-Synthase, sowie Osteoblasten-Apoptose fördernde Faktoren eruiert werden (Elbaz et al. 2010, Lecka-Czernik und Suva 2006). Die Tatsache, dass beide Zellarten derselben Vorläuferzelle entstammen (Gimble et al. 1996), legt die Hypothese nah, dass sie nicht unabhängig voneinander betrachtet werden können. Über welchen Mechanismus Ec auch den Fettstoffwechsel positiv beeinflusst, gilt es weiter zu klären.

Das trabekuläre Netzwerk gibt Hinweise auf die Knochenfestigkeit und -stabilität (siehe auch Kapitel 1, Seite 19 und Kapitel 2, Seite 30). Frühere Studien haben gezeigt, dass die Knochenqualität in erster Linie von den spongiösen Eigenschaften des Knochens abhängen und weniger von den kortikalen Knochen-Parametern, da der Grad der Knochenfestigkeit mit der Mineralisation der trabekulären Strukturen korreliert (Seidlová-Wuttke et al. 2008).

Der durch die Ovariectomie induzierte Östrogenmangel resultiert in einer Störung der Knochen-Homöostase und einer Steigerung des Knochenstoffwechsels (zu sehen an den erhöhten Osteocalcin-Werten) mit einem Ungleichgewicht zugunsten der Osteoklasten (Wronski et al. 1986). Aus diesem Grund weisen die ovariectomierten Kontrolltiere, die keine Substitution erhielten, im Vergleich zu den anderen Gruppen das am geringsten ausgeprägte trabekuläre Netzwerk auf (Abb. 2.6 - 2.8). Alle das trabekuläre Netzwerk definierenden Parameter sind im Vergleich bei den Kontrolltieren entsprechend erniedrigt (Nodi, prozentualer Trabekel-Anteil) bzw. erhöht (Termini) und bestätigen so die aus dem Östrogenmangel resultierende erniedrigte Knochenfestigkeit (vgl. Kapitel 1, Seite 19). Generell ist bei allen Vergleichsgruppen eine signifikante Zunahme des trabekulären Netzwerkes an der Metaphyse der Tibia im Vergleich zur ovariectomierten Kontrolle zu verzeichnen, was auf die osteoprotektiven Eigenschaften der in diesen Gruppen verwendeten Substanzen zurückzuführen ist. Für Östrogene (und das hier verwendete Östradiol) sind diese protektiven Mechanismen (wie in Kapitel 1, 1.7 und Kapitel 2, 2.3.1 beschrieben) bereits bekannt und bestätigen sich auch in dieser Studie durch eine Abnahme der Termini sowie einer Zunahme des prozentualen Trabekel-Anteils und der Anzahl der Nodi. Die mit Östradiol behandelten Tiere zeigen die stärkste signifikante Zunahme des trabekulären Netzwerkes. Die mit beta-Ecdyson substituierten SD-Ratten weisen ebenfalls signifikante osteogene Werte auf, die aber unterhalb der mit E2 behandelten Tiere bleiben.

4.4 Wirkung auf die Serum-Parameter des Knochenstoffwechsels

Unter Östrogenmangel sezernieren die Monozyten des Knochenmarkes - neben anderen Zytokinen wie z.B. den Interleukinen 1 und 6 - vermehrt RANKL, welches parakrin die Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten stimuliert (Horowitz 1993).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten, zur Familie der Tumornekrosefaktoren gehörigen Liganden fungieren, wie in Kapitel 1 unter 1.6 beschrieben, als Osteoklastenmodulatoren und sind verantwortlich für die empfindliche Homöostase des Knochenstoffwechsels, indem unter Östrogen-Einfluss ein Anstieg von OPG (Hofbauer et al. 2000) und ein Abfall von RANK (Shevde et al. 2000) induziert wird. Die Untersuchung ihrer Spiegel im Blutserum erlaubt Rückschlüsse auf die Wirkung der Substanzen auf die Osteoblasten- und Osteoklasten-Aktivität. Unter E2-Abwesenheit, z.B. nach einer Ovariectomie, steigt die Aktivität beider Zelltypen, messbar an ihren erhöhten Produkten im Serum (z.B. Osteocalcin als Aktivitätsparameter für die Osteoblasten). Dies macht sie zu verbreitet untersuchten Parametern für die antiosteoporotische Potenz der untersuchten Substanzen. Die verschiedenen gemessenen Parameter werden im Folgenden einzeln diskutiert.

4.4.1 Osteoprotegerin-Werte

Der über eine Inhibition des RANK/RANKL-Systems wirkende Gegenspieler der Knochenresorption, das Osteoprotegerin, zeigte einzig in der mit Ec 25 mg substituierten Gruppe einen signifikanten Anstieg der Serum-Werte. Die Osteoprotegerin-Werte der mit E2 substituierten Tiere zeigten sich im Vergleich zu der einem Östrogenentzug ausgesetzten Kontrollgruppe ebenfalls erhöht, wenn auch nicht signifikant.

Östrogene wirken u. a. über die Beeinflussung von Osteoprotegerin.

Die Abwesenheit von Östrogenen bzw. ein Östrogen-Defizit steigert das Verhältnis von RANKL zu OPG und fördert so die Osteoclastogenese und folglich den Knochenverlust. Dementsprechend sinken die Osteoprotegerin-Werte mit dem Ausmaß des Östrogen-Defizites (West et al. 2009). In-vitro-Studien zeigten im Gegenzug, dass Östradiol die OPG-Produktion steigert (Rogers et al. 2002, Bord et al. 2003), was auch in der vorliegenden Studie der Fall ist. Untersuchungen der Osteoprotegerin-Werte bei an Osteoporose erkrankten Frauen zeigten aber unterschiedliche Ergebnisse: In der Arbeitsgruppe um Yano et al. (1999) entwickelten die unter Osteoporose leidenden Frauen höhere OPG-Level als die gesunde Kontrollgruppe. Andere Studien konnten keine Unterschiede der OPG-Konzentrationen zwischen gesunden und an Osteoporose erkrankter Frauen aufzeigen (Fraher et al. 2000).

Über die Beeinflussung des Osteoprotegerin durch Ecdysterioide ist in der Literatur bislang nicht diskutiert worden. Die positive osteoprotektive Wirkung, die sich in unserer Studie bei der Gabe durch Ecdyson in der mit steigender Dosierung zunehmenden Erhöhung der Osteoprotegerin-Werte zeigt, sollte in Folgeversuchen an größeren Tiergruppen über einen längeren Zeitraum verifiziert werden.

4.4.2 RANKL-Werte

RANKL ist der direkte Antagonist des Osteoprotegerin und übt seine stimulierende Funktion der Osteoklasten-Differenzierung über seinen membranständigen Rezeptor RANK aus (Fuller et al. 1998).

Die im Experiment gemessenen Serumspiegel weisen keine signifikanten Ergebnisse auf. Es kristallisieren sich jedoch gegenläufige Tendenzen heraus: Unter E2-Gabe sinken die gemessenen RANKL-Werte im Vergleich zur Kontrolle, unter Ecdyson-Substitution steigen sie.

Wie schon erwähnt, wird durch das fehlende Östrogen das Verhältnis von RANKL zu OPG gesteigert, d.h. die erwarteten RANKL-Werte unter E2-Substitution sollten im Vergleich zur Kontrolle sinken. Unsere Studie bestätigt diese Annahme. Die dem E2 konträre Wirkung von Ecdyson auf den RANKL-Spiegel zeigt sich auch in der Betrachtung der Osteocalcin-Werte und stützt die These, dass E2 und Ecdyson über unterschiedliche Mechanismen wirken.

Die Arbeitsgruppe um Bord et al. zeigte *in vitro*, dass unter E2-Substitution unterschiedlicher Dosierung neben einem Anstieg von OPG vorerst auch die RANKL-Synthese 24 Stunden nach Beimpfung von Zellen anstieg. Die Level normalisierten sich allerdings im Verlauf wieder auf den Ausgangswert (Bord et al. 2003).

Nachfolgende Langzeitstudien, in denen auch während des Versuchsablaufes die Serum-Parameter bestimmt werden, könnten klären, inwieweit evtl. auch unter Ec die RANKL-Level nach einiger Zeit sinken.

4.4.3 Osteocalcin-Werte

Das von Osteoblasten produzierte, die Knochen-Mineralisierung fördernde, Vitamin-K-abhängige Osteocalcin wird unter Bindung von Hydroxylapatid direkt in die Knochenmatrix eingebaut. Wie bereits in Kapitel 1 unter 1. 6.3 erwähnt, gilt es als hochspezifischer Parameter der Mineralisation der Knochenmatrix und korreliert mit der Aktivität der Osteoblasten (Stracke et al. 1987). Bei einer Aktivitätserhöhung

dieser Zellen, in der vorliegenden Studie induziert durch den Östrogenmangel nach Ovariectomie der Versuchstiere, erwartet man dementsprechend erhöhte Serum-Werte des Osteocalcin.

Der bei den mit Östradiol substituierten Tieren im Vergleich zur Kontrolle signifikant erniedrigte Osteocalcin-Serum-Spiegel lässt sich durch die Osteoblasten- und Osteoklasten-Aktivität senkende Wirkung des Östradiols erklären. Hierdurch wird ein Gleichgewicht, ähnlich dem vor der Ovariectomie herrschenden, wiederhergestellt. Diese osteoprotektive Reduktion des Knochenumsatzes mit relativem Überwiegen der Osteoblasten-Aktivität der Östrogene wurde bereits vielfach beschrieben (Sipos et al. 2009, Bord et al. 2003).

Die mit beta-Ecdyson behandelten Tiere weisen hingegen keine Östrogen-agonistische Senkung des Osteocalcin-Spiegels auf. Die gemessenen Werte liegen unabhängig von der Dosierung des beta-Ecdyson konstant im Bereich der Kontrolle und weisen damit eine dem E2 entgegengesetzte Wirkung auf.

4.5 Limitierung der Studie

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche neue Wege in der Behandlung bzw. Prävention von typischen Wechseljahresbeschwerden, speziell der postmenopausalen Osteoporose, aufzuzeigen. Im Rahmen einer präklinischen Studie wurden u. a. histologische Endpunkte an Ratten untersucht. Ergebnisse aus Tierversuchen können generell nur unter Beachtung der unterschiedlichen physiologischen Voraussetzungen auf den Menschen übertragen werden. Obwohl die ovx. Ratte als gängigstes Modell für postmenopausale Veränderungen verwendet wird, da durch die Ovariectomie ein der Postmenopause der Frau ähnlicher Zustand herbeigeführt werden kann, sind alle untersuchten Endpunkte kritisch zu betrachten und zu prüfen. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse von Östrogenen auf ovx Ratten sind stark von der Versuchsdauer (Kurz- oder Langzeitverabreichung) abhängig. Ratten haben eine durchschnittliche Lebenserwartung von ein bis zwei Jahren. Die gewählte Versuchsdauer von vier Wochen ist somit als eine Kurzzeitwirkung der Testsubstanzen zu bewerten. Dieser Versuch kann als vorbereitender Kurzversuch für weitere, auf einen längeren Versuchszeitraum angelegte Arbeiten in der Abteilung gewertet werden, die auch schon im Rahmen der gleichen Fragestellung erfolgten. Generell stellt die Höhe der Dosierung der Testsubstanzen einen wichtigen Parameter bezüglich der Beurteilung der Ergebnisse dar. Im Rahmen dieser Studie

wurde das verwendete Präparat in mehreren Dosen verabreicht. Die Verabreichung erfolgte s.c. In nachfolgenden Versuchen sollte die Substitution möglichst p.o. über einen Futterzusatz erfolgen, um die Ergebnisse besser auf normale Lebensumstände übertragen zu können. Dies entspräche dem Modell der Frau mit klimakterischen Beschwerden, die Präparate ebenfalls p.o. einnimmt, eher. Zusätzlich können auf dem Weg der oralen Einnahme enterohepatische first-pass-Mechanismen untersucht und so Einblicke in die Verstoffwechslung einer Substanz gewonnen werden. In der vorliegenden Studie wurde bei allen Versuchstieren zum gleichen Zeitpunkt, direkt nach der Ovariectomie, mit der Verabreichung der untersuchten Substanzen in der Annahme begonnen, dass eine möglichst frühe Einnahme größere Effekte erzielt, wie es z.B. auch bei der Gabe von Phytoöstrogenen der Fall ist (Viereck et al. 2005). Als weiterer kritischer Punkt ist die Anzahl der Versuchstiere in diesem Experiment zu nennen. Generell erlangen tierexperimentelle Studien eine höhere Aussagekraft, je größer die Versuchszahlen sind. In dieser Arbeit wurde mit einer relativ kleinen Dosisgruppe von Tieren gearbeitet. Weiterhin erfolgte die histomorphologische Begutachtung an einer relativ kleinen Schnittmenge.

5 Zusammenfassung

Der Östrogenmangel im Rahmen des Klimakteriums fördert die Entstehung der postmenopausalen Osteoporose. Analog zur Menopause und dem hierin vorherrschenden Östrogenverlust der Frau, führt eine Ovariectomie bei weiblichen Ratten zum Verlust der Knochensubstanz. Bis zu 50 % der BMD können so verloren gehen.

Die umstrittene HET wirkt einem Verlust der Knochensubstanz positiv entgegen, birgt jedoch im Gegenzug das potentielle Risiko der Entwicklung eines Endometrium- und Mamma-CA's und fördert die Entstehung kardioembolischer Ereignisse. Auf der Suche nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten zeigte das Ecdysteroid 20-OH-Ecdyson (beta-Ecdyson), ein Extrakt der Pflanze *Tinospora cordifolia*, osteoprotektive Eigenschaften.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Auswirkungen unterschiedlicher Ecd-Dosierungen auf die Knochenhistologie der Tibia sowie den Knochenstoffwechsel weiblicher, ovariectomierter SD-Ratten untersucht. Dazu wurden die Tiere nach der Ovariectomie jeweils in verschiedene, den unterschiedlichen Dosierungen zugehörige Gruppen unterteilt und über vier Wochen s.c. mit der entsprechenden Testsubstanz substituiert. Als Positiv-Kontrolle wurde das biologisch vorhandene Östradiol (E2) hinzugezogen.

Zusammenfassend zeigte Ec am Knochen anti-osteoporotische und damit osteoprotektive Effekte. Insbesondere das trabekuläre Netzwerk, als Indikator für die Knochenqualität, zeigte unter Ec-Gabe einen deutlichen Zuwachs. Die Abnahme des Fettmarkes unter der Gabe von Ec bestätigt den positiven Einfluss des Hormons auf die Knochenstruktur, da die lipotoxische Wirkung auf das Knochengewebe so ebenfalls gesenkt und dessen Abbau vorgebeugt wird.

Auf Grund der gegensätzlichen Auswirkungen auf den Osteocalcin-Serumspiegel im Vergleich zu E2 ist eine Wirkung des Ec via ER-vermittelte Mechanismen und damit eine rein Östrogen-agonistische Wirkweise unwahrscheinlich. Diese Annahme wird durch im selben Versuch erhobene, aber nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelte, Werte der ER-Bindungs-Aktivität (unter Ec vermindert) und der Uterusgewichte und -histologie (keine Zunahme unter Ec), gestützt.

Ecdyson scheint also sowohl die gewünschten osteoprotektiven Wirkungen zu erfüllen, als auch unerwünschte Effekte, z.B. auf den Uterus, zu vermeiden.

Die vorliegende Arbeit zeigt demnach einen Weg auf, Östrogen-unabhängig eine osteoprotektive Wirkung zu entfalten.

Weitere Versuche werden nötig sein, um den genauen Wirkmechanismus des Ec zu entschlüsseln und endgültig zu klären, ob Ec präventiv oder therapeutisch im Rahmen des klimakterischen Syndroms zum Einsatz kommen kann. Die Untersuchungen müssen an weiteren Geweben erfolgen, um das Wirkprofil exakter erfassen und auch unerwünschte Effekte aufdecken zu können. Auch sollten die Dosiswirkungsbeziehungen genauer erarbeitet werden, um letztlich eine sichere Risikoabschätzung für den Menschen treffen zu können.

6 Anlagen

Protokoll Ovariectomie:

Nach drei Wochen wurden die Ratten unter Isofluran-Inhalation anästhesiert. Die Narkosedauer betrug ca. sieben bis acht Minuten. Der Bereich kaudal des Rippenbogens wurde zunächst rasiert und desinfiziert. Mit einer Schnittlänge von ca. 1,5 cm durch die Haut und die Bauchmuskelschichten wurde beidseitig die Bauchhöhle eröffnet und dann die Ovarien vorgelagert. Mit einem sterilen, resorbierbaren Faden wurde zwischen Ovar und Uterushorn eine Ligatur gelegt und das Ovar mittels Skalpell entfernt. Die beiden Muskelschichten wurden mit zwei Knopfheften durch eine Nadel-Faden-Kombination vernäht, die Haut wurde geklammert.

Die Tiere standen während der Aufwachphase unter ständiger Beobachtung.

Protokoll Acrylat-Einbettung:

Nach Fixierung der Präparate folgte zunächst ihre stufenweise Dehydrierung in einer Alkoholreihe (70%iges Ethanol für drei Tage, jeweils 24 Stunden in 80%iges, 90%iges und 100%iges Ethanol). Im nächsten Schritt wurden die Tibiae für weitere 24 Stunden in einem Gemisch aus 100%igem Ethanol und Aceton (Verhältnis 1:1) entfettet. Die Einbettung der Knochen in ein Methylmethacrylat-Gemisch (MMA-Gemisch; Zusammensetzung: 1000 ml Methylmethacrylat (Merck-Nr. 800590), 200 ml Di-Butylphthalat (Merck-Nr. 12487), 29 g Benzoylperoxid (Merck-Nr. 801641) fand für drei Tage bei 4° C statt, nach Erhöhung der Temperatur auf 32°C wurde dann die Polymerisierung des MMA-Gemisches im Wasserbad eingeleitet. Nach der Aushärtung konnte der Acrylat-Block aus dem Glasgefäß befreit werden.

7 Literaturverzeichnis

- Bagi CM, Mecham M, Weiss J, Miller SC (1993): Comparative Morphometric Changes in Rat Kortikal Bone following Ovariectomy and/or Immobilization. *Bone* 14:877-883.
- Baron R, Tross R, Vigner YA (1984): Evidence of sequential remodeling in rat trabecular bone: morphology, dynamic histomorphometry, and changes during skeletal maturation. *Anat Rec* 208:137-145.
- 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.
- Beckmann MW, Braendle W, Brucker C, Dören M, Emons G, Geisthövel F, Kiesel L, König K, Naß-Griegoleit I, Ortmann O, Rabe T, Windler E (2003): Konsensus-Empfehlungen zur Hormontherapie (HAT) im Klimakterium und in der Postmenopause. *Frauenarzt* 44 (2):138-141.
- Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, Arrighi M, Leese PT, Dunstan CR (2001): The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 16:348-360.
- Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE (2003): The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone* 32:136-141.
- Boroditsky RS (2000): Balancing safety and efficacy focus on endometrial protection. *J Reprod Med* 45: 273-284.
- Bramlett KS, Burris TP (2003): Target specificity of selective estrogen receptor modulators within human endometrial cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86:27-34.
- Bucher O, Wartenberg H: Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 11. Auflage; Hans Huber Verlag, Bern 1992.
- Carbonare LD, Valenti MT, Bertoldo F, Zanatta M, Zenari S, Realdi G, Cascio VL, Giannini S (2005): Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. *Micron* 36 (7-8):609-616.
- Chiappetta N, Gruber B (2006): The role of mast cells in osteoporosis. *Semin Arthritis Rheum* 36:32-36.
- Christiansen C, Christensen MS, Transbol I (1981): Bone mass in postmenopausal women after withdrawal of oestrogen/gestagen replacement therapy. *Lancet* 1981, 1:459-461.

- Coetzee M, Kruger M (2004): Osteoprotegerin-Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B: Mechanism of Action between Osteoblasts and Osteoclasts. *South Med J* 97(5):506-511.
- Cooper C (1999): Epidemiology of Osteoporosis. *Osteoporosis int* 9(8):2-8.
- Dai JD, Gilbert LI (1991): Metamorphosis of the corpus allatum and degeneration of the prothoracic glands during the larval-pupal-adult transforming of *Drosophila melanogaster*: a cytophysiological analysis of the ring gland. *Dev Biol* 144(2):309-326.
- Dempster DW (2003): Bone microarchitecture and strength. *Osteoporosis Int* 14(5):54-56.
- Diascro DD, Vogel RL, Johnson TE, Witherup KM, Pitzenberger SM, Rutledge SM, Prescott DJ, Rodan GA, Schmidt A (1998): High fatty acid content in rabbit serum is responsible for the differentiation of osteoblasts into adipocyte-like cells. *J Bone Miner Res* 13:96-106.
- Drenckhahn D, Kugler P: Knochengewebe. In: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Benninghoff A; Band 1. 17. Auflage; Elsevier, München 2008:133-149.
- Duque G (2008): Bone and fat connection in aging bone. *Curr Opin Rheumatol* 20(4): 429-234.
- DVO-Leitlinie (Dachverband Osteologie): Osteoporose nach der Menopause und im Alter. DVO, Bad Kreuznach 2006:27-28.
- Eghbali FG, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL (2003): Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 111:1221-1230.
- Elbaz A, Wu X, Rivas D, Gimble JM, Duque G (2010): Inhibition of fatty acid biosynthesis prevents adipocyte lipotoxicity on human osteoblasts in vitro. *J Cell Mol Med* 14(4): 982-992.
- Ettinger B, Grady D, Tosteson ANA, Pressman A, Macer JL (2003): Effect of the Women's Health Initiative on Women's Decision to Discontinue Postmenopausal Hormone Therapy. *Obstet Gynecol* 102: 1225-1232.
- Faugere MC, Okamoto S, Deluca HF, Malluche HH (1986): Calcitriol corrects bone loss induced by oophorectomy in rats. *Am J Physiol* 250(E):35-38.
- Feeley KM, Wells M (2001): Hormone replacement therapy and the endometrium. *J Clin Pathol* 54:435-40.
- Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P (2008): Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(13):5266-70.

- Fleisch H: Bisphosphonates in bone disease – from the laboratory to the patient. 4. Auflage. Academic Press, London 2000:123-152.
- 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* 63:510-514.
- Fraher LJ, Watson PH, Kisiel M, Natale BV, Hodsmann AB (2000): Measurement of circulating osteoprotegerin (OPG) in human sera: inhibition of circulating OPG in osteoporotic patients treated with hPTH (1–34). *J Bone Miner Res* 15(1):441.
- Frost HM, Jee WSS (1992): On the rat model of human osteoporosis. *Bone Miner* 18(3):227-236.
- Fuller K, Wong B, Choi Y, Chambers TJ. (1998): TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption. *J Exp Med* 188:997–1001.
- Galbraith MN, Horn DHS, Hocks P, Schulz G, Hoffmeister H (1967): The identity of the 20-hydroxy-ecdysones from various sources. *Naturwissenschaften* 54(17):471-472.
- Gallagher JC, Riggs BL, Eisman J, Hamstra A, Arnaud SB, DeLuca HF (1979): Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normals subjects and osteoporotic patients: effect of age and dietary calcium. *J Clin Invest* 64:729-736.
- Gao F, Du N (2008): Study on change of metabolism of articular cartilage in ovariectomized rats in the intervention of different drugs. *Zhongguo gu shang* 21:196-199.
- Gennari C, Agnusdei D, Nardi P, Civitelli R (1990): Estrogen preserves a normal intestinal responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D3 in oophorectomized women. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1288-1293.
- Gerok W, Huber C, Meinertz Th, Zeidler H: *Die Innere Medizin*. 11. Auflage; Schattauer Verlag, Stuttgart 2007:831-844.
- Gilbert LI, Rybczynski R, Warren JT (2002): Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Ann Rev Entomol* 47:883-916.
- Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA (1996): The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone* 19(5):421-428.
- Göretzlehner G, Lauritzen P: *Praktische Hormontherapie in der Gynäkologie*. De Gruyter, Berlin 2000.
- Gogakos AI, Cheung MS, Bassett JHD, Williams GR (2009): Bone signaling pathways and treatment of osteoporosis: signaling pathways regulating

- osteoclast differentiation and bone resorption. *Expert Rev Endocrinol Metab* 4(6):639-650.
- Greendale GA, Judd HL (1993): The menopause: health implications and clinical management. *J Am Geriatr Soc* 41:426-36.
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC (2002): Production and action of estrogens. *N Engl J Med* 346 (5):340-352.
- Gundberg J (1983) : Urinary - Carboxyglutamic Acid and Serum Osteocalcin as Bone Markers: Studies in Osteoporosis and Paget's Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 57(6):1221-1225.
- Guney E, Kusakol G, Ozgen G, Yilmaz C, Yilmaz R, Kabalak T (2003): Effect of weight loss on bone metabolism: comparison of vertical banded gastroplasty and medical intervention. *Obes Surg* 13:383–388.
- Hall JM, McDonnell DP (1999): The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140(12):566-5578.
- Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM (1975): Direct identification of the calcium-binding amino acid, γ -carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc Nat Acad Sci USA* 72(10):3925-3929.
- Hertrampf T, Gruca MJ, Seibel J, Laudénbach U; Fritzemeier KH, Diel P (2007): The bone-protective effect of the phytoestrogen genistein is mediated via ER alpha-dependent mechanisms and strongly enhanced by physical activity. *Bone* 40:1529-1535.
- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL (1999): Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 140:4367-70.
- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL (2000): The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15:2-12.
- Hoffmeister H (2004): Insektenhormone. *Chemie in unserer Zeit* 3 (5):140-145.
- Horowitz MC (1993): Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science* 260:626-627.
- Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF (1996): Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med* 2(10):1132-1136.
- Jilka RL (1998): Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone* 23 (2):75-81.

- Junqueira L.C, Carneiro J, Kelley R.O: Histologie. 6. Auflage; Springer-Verlag, Berlin 2004:91-103.
- Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M (2001): Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2:165-171.
- Kalu DN, Liu CC, Salerno E, Hollis B, Echon R, Ray M (1991): Skeletal response of ovariectomized rats to low and high doses of 17-beta estradiol. *Bone Miner* 14 (3):175-187.
- Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, Nakamaru Y, Hiroi E, Hiura K, Kameda A, Yang NN, Hakeda Y, Kumegawa M (1997): Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med* 186:489-495.
- Kanis JA (1994): Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: Synopsis of a WHO report. *Osteoporosis Int* 4(6):368-381.
- Kapur P, Jarry H, Wuttke W, Pereira BM, Seidlová-Wuttke D (2008): Evaluation of the antiosteoporotic potential of *Tinospora cordifolia* in female rats. *Maturitas* 59:329-338.
- Kapur P, Wuttke W, Jarry H, Seidlová-Wuttke D (2010): Beneficial effects of beta-Ecdysone on the joint, epiphyseal cartilage tissue and trabecular bone in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17(5):350-355.
- Kasper DL, Braunwald E, Fauci A, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL: *Harrisons Innere Medizin*. Band 2. 16. Auflage; ABW Wissenschaftsverlag, Berlin 2005:2439-2451.
- Keck AV, Pechestorfer M (2003): Knochenstoffwechsel bei malignen Erkrankungen. *J Miner Stoffwechsel* 10(2):6-11.
- Khare S: *TNF Superfamily*. Landes Bioscience, Austin 2007.
- Kimmel DB, Bozzato RP, Kronis KA, Coble T, Sindrey D, Kwong P, Recker RR (1993): The effect of recombinant human or synthetic human parathyroid hormone on the skeleton of adult osteopenic ovariectomized rats. *Endocrinology* 132:1577-1584.
- Kitzelstein P, Govorko D, Komarnytsky S, Evans A, Wang Z, Cefalu WT, Raskin I (2008): 20-Hydroxyecdysone decreases weight and hyperglycemia in a diet-induced obesity mice model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E433-E439.
- Kostenuik PJ, Capparelli C, Morony S, Adamu S, Shimamoto G, Shen V, Lacey DL, Dunstan CR (2001): OPG and PTH-(1-34) have additive effects on bone density and mechanical strength in osteopenic ovariectomized rats. *Endocrinology* 142:4295-4304.

- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996): Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5925-5930.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliot R, Colombero A, Elliot G, Scully S et al. (1998): Osteoprotegerin Ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93(2):165-176.
- Lafont R (1997): Ecdysteroids and Related Molecules in Animals and Plants. *Arch Insect Biochem Physiol* 35:3-20.
- Lafont R, Dinan L (2003): Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: and update. *J Insect Sci* 3(7):1-30.
- Lecka-Czernik B, Suva LJ (2006): Resolvin the two “bony” faces of PPAR-gamma. *PPAR Res* 27489:1-9.
- Lei Z, Xiaoying Z, Xingguo L (2009): Ovariectomy-associated changes in bone mineral density and bone marrow haematopoiesis in rats. *Int J Exp Pathol* 90:512–519.
- Lesclous P, Saffar JL (1999): Mast cells accumulate in rat bone marrow after ovariectomy. *Cells Tissues Organs* 164:23–29.
- Li J: Signal transduction in osteoclast biology: the OPG-RANKL-RANK pathway. In: *TNF Superfamily*. Khare S. Landes Bioscience, Austin 2007.
- Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Ohlsson C (2003): Estrogen receptor (ER)-beta reduces Eralpha-regulated gene transcription, supporting a “ying yang” relationship between Eralpha and Erbeta in mice. *Mol Endocrinol* 17:203-208.
- Manolagas SC (2000): Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanism and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21:135-137.
- Martin TJ, Rodan GA: Coupling of bone resorption and formation during bone remodelling. In: *Osteoporosis*. Marcus R, Feldmann D, Kelsey J. Second Edition, Volume 1. Academic Press, London 2001:361-371.
- Maurin AC, Chavassieux PM, Frappart L, Delmas PD, Serre CM, Neunier PJ (2000): Influence of mature adipocytes on osteoblast proliferation in human primary cocultures. *Bone* 26: 485-489.
- Maurin AC, Chavassieux PM, Vericel E, Meunier PJ (2002): Role of polyunsaturated fatty acids in the inhibitory effect of human adipocytes on osteoblastic proliferation. *Bone* 31: 260-266.

- Mc Elroy JF, Wade GN (1987): Short- and long-term effects of ovariectomy on food intake, body weight, carcass composition, and brown adipose tissue in rats. *Physiol Behav* 39(3):361-365.
- Mironova VN, Kholodova, YuD, Skatchkova TF, Bonda OP, Datsenko ZM, Govseeva NN (1982): Hypocholesterolemic effects of phytoecdysones in rat experimental hypercholesterolemia. *Voprosy Meditsinskoi Khimii* 28(3): 101-105.
- Mosekilde L, Danielsen CC, Gasser J (1994): The effect on vertebral bone mass and strength of long term treatment with antiresorptive agents (estrogen and calcitonin), human parathyroid hormone-(1-38), and combination therapy, assessed in aged ovariectomized rats. *J Endocrinol* 134:2126-2134.
- Nakagawa Y, Sakai A, Magata F, Ogura T, Miyashita M, Miyagawa H (2007): Molecular cloning of the ecdysone receptor and the retinoid X receptor from the scorpion *Liocheles australasiae*. *FEBS J* 274:6191–6203.
- Nelson LR, Bulun SE (2001): Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol* 45(3):116-124.
- NIH (National Institute of Health): Consensus Development Conference Statement. Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy. NIH, Bethesda 2000.
- Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J (2005): Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res* 64:157–165.
- Numayama S., Satsuki K, Kashima I (2002): Application of node-strut analysis to skeletal patterns on digital radiographic images. *Oral Radiol* 18(2):31-39.
- Palacios S (2007): The future of the new selective estrogen receptor modulators. *Menopause Int* 13:27-34.
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987): Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2(6):595-610.
- Pie JE, Park YH, Ryu YM, Kim KN, SUh SW, Becker KG, Cho-Chung YS, Kim MK (2006): Effect of genistein on the effect of bone metabolism genes in ovariectomized mice using a cDNA microarray. *J Nutr Biochem* 17:157-164.
- Price PA, Prathemore JG, Deftos LJ, Nishimoto SK (1980): New Biochemical Marker for Bone Metabolism. *J Clin Invest* 66:878 -883.
- Rees HH (2004): Hormonal control of tick development and reproduction. *Parasitology* 129(7):127-143.
- Riggs BL, Melton LJ (1986): Involutional osteoporosis. *N Engl J Med* 314:1676-1686.
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd. (2002): Sex steroids and the construction and conversation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 23(3):279-303.

- Robey PG, Bianco P: Cellular mechanisms of age-related bone loss. In: The Aging Skeleton. Rosen CGJ, Bilezikian JP. Academic Press, San Diego 1999:145-157.
- Rodriguez JP, Astudillo P, Rios S, Seitz G, Pino AM (2009): Adipogenesis and Osteoporosis. Rev Med Chil 137(6):827-836.
- Rogers A, Saleh G, Hannon RA, Greenfield D, Eastell R (2002): Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab 87:4470-4475.
- Rosen CJ (2000): Pathogenesis of osteoporosis. Clin Lab Med 20(3):455-486.
- Rosen ED, Spiegelman BM (2001): PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. J Biol Chem 276:37731-37734.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Hutchinson F, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SAA, 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 288:321-333
- Samelson EJ, Hannan MT (2006): Epidemiology of Osteoporosis. Curr Rheumatol Rep 8:76-83.
- Saville PD (1969): Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rat: A model of osteoporosis. J Am Geriatr Soc 17:155-166.
- Schiebler TH, Schmidt W: Anatomie. 8. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2002:133-137.
- Schmelz EA, Grebenok RJ, Ohnmeiss TE, Browers WS (2002): Interactions between Spinacia oleracea and Bradysia impatiens: a role for ecdysteroids. Arch Insect Biochem Physiol 51:204-221.
- Schmidt-Matthiesen H, Wallwiener D: Gynäkologie und Geburtshilfe. 10. Auflage; Schattauer Verlag, Stuttgart 2004:79-84.
- Schroepfer GJ Jr (2000): Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. Physiol Rev 80:361-554.
- Seeman E (2003): Bone quality. Osteoporos Int 14 (5):3-7.
- Seidlová-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Sprengler B, Becker T, Wuttke W (2003): Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in black cohosh (Cimicifuga racemosa) extract: comparison with estradiol-17 β . Eur J Endocrinol 149:351-362.
- Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Christoffel J, Rimoldi G, Wuttke W (2006): Comparison of effects of estradiol (E2) with those of octylmethoxycinnamate (OMC) and 4-

- methylbenzylidene camphor (4MBC) — 2 filters of UV light – on several uterine, vaginal and bone parameters. *Toxicol Appl Pharmacol* 210(3):246-254.
- Seidlová-Wuttke D, Prella K, Fritzemeier KH, Wuttke W (2008): 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: 849–855.
- Seidlová-Wuttke D, Christel D, Kapur P, Nguyen BT, Jarry H, Wuttke W (2010a): beta-Ecdysone has bone protective but no estrogenic effects in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17(5):350-355.
- Seidlová-Wuttke D, Ehrhardt C, Wuttke W (2010b): Metabolic effects of 20-OH-ecdysone in ovariectomized rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 119(3-5):121-126.
- Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW (2000): Estrogen suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Sci USA* 97:7829-7834.
- Simoncig-Netjasov A, Vujović S, Ivović M, Tancić-Gajić M, Drezgić M (2010): Influence of duration of menopause, anthropometric and hormonal parameters on metabolic syndrome. *Med Pregl* 63(1-2):33-9.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T et al. (1997): Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89(2):309-319.
- Sipos W, Pietschmann P, Rauner M, Kersch-Schindl K, Patsch J (2009): Pathophysiology of osteoporosis. *Wien Med Wochenschr* 159(9-10):230-234.
- Skjødt H, Gallagher JA, Beresford JN, Couch M, Poser JW, Russell RGG (1985):: Vitamin D metabolites regulate osteocalcin synthesis and proliferation of human bone cells in vitro. *J Endocrinol* 105:391-396.
- Sobotta J, Welsch U: *Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie*. 2. Auflage; Urban & Fischer bei Elsevier, München/Jena 2005:131-147.
- Stauder M, Weyerstahl T: *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2005.
- Stracke H, Schulz A, Weber U, Ullmann J, Schatz H (1987): Osteocalcin und Knochenhistologie bei Osteoporose. *Klin Wochenschr* 65:1095-1100.
- Stygar D, Muravitskaya N, Eriksson B, Eriksson H, Sahlin L (2003): Effects of SERM (selective estrogen receptor modulator) treatment on growth and proliferation in the rat uterus. *Reprod Biol Endocrinol* 1:40.
- Syrov VN (1984): Mechanism of the anabolic action of phytoecdysteroids in mammals. *Biologicheskii Nauki* 11:16-20.

- Thomas HE, Stunnenberg HG, Stewart AF (1993): Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle. *Nature* 362:471-475.
- Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ (1995): FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 17(4):125-133.
- Tortora GJ, Derrickson BH: Anatomie und Physiologie. Teil II, Kapitel 6. 1. Auflage; Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2005:207-225.
- Toth N, Hunyadi A, Bathori M, Zador E (2010): Phytoecdysteroids and Vitamin D analogues - similarities in structure and mode of action. *Curr Med Chem* 17(18):1974-1994.
- Turner RT, Kidder LS, Zhang M, Harris S.A., Westerlind KC, Maran A, Wronski TJ (1999): Estrogen has rapid tissue-specific effects on rat bone. *J Appl Physiol* 86:1950-1958.
- Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, Sibonga JD (2001): Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord* 2(1):117-127.
- Uchiyama M, Yoshida T: Effect of ecdysterone on carbohydrate and lipid metabolism. In: *Invertebrate Endocrinology and Hormonal Heterophyly*. Springer-Verlag, Berlin 1974:401-416.
- Unger RH (2002): Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med* 53: 319-323.
- Viereck V, Emons G, Wuttke W (2005): Black cohosh: just another phytoestrogen? *Trends Endocrinol Metab* 16:214-221.
- Weise M, De-Levi S, Barnes KM, Gafni RI, Abad V, Baron J (2001): Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6871-6876.
- West SL, Scheid JL, De Souza MJ (2009): The effect of exercise and estrogen on osteoprotegerin in premenopausal women. *Bone* 44:137-144.
- Wikipedia: <http://de.wikipedia.org/wiki/Röhrenknochen>
- Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA (1986): Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 7(2):119-123.
- Wronski TJ, Cintron M, Dann LM (1988): Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 43:179-183.
- Wüster C, Ziegler R: Metabolische Knochenerkrankungen. In: *Thiemes Innere Medizin*. Alexander K, Daniel WG, Diener HC, Freund M, Köhler H, Matern S, Maurer HH, Michel BA, Nowak D, Risler T, Schaffner A, Scherbaum WA, Sybrecht GW, Wolfram G, Zeitz M. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1999:350-373.

- Yang C, Zhang G, Liu X, Wang C (2001): Oral antidiabetic compositions containing b-ecdysone from *Cyanothus arachnoides*. Chem Abstr 135:127188.
- Yano K, Tsuda E, Washida N, Kobayashi F, Goto M, Harada A, Ikeda K, Higashio K, Yamada Y (1999): Immunological characterization of circulating osteoprotegerin / osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. J Bone Miner Res 14:518–527.
- Yao X, Chen H, Ohtake N, Shoumura S (2006): Morphological alterations in the growth plate cartilage of ovariectomized mice. Med Mol Morphol 39:193–197.
- Yoshida T, Otaka T, Uchiyama M, Ogawa S (1971): Effect of ecdysterone on hyperglycemia in experimental animals. Biochem Pharmacol 20:3263–3268.
- Zaho LJ, Liu YJ, Liu PJ, Hamilton J, Recker RR, Deng HW (2007): Relationship of obesity with osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab 92(5):1640–1646.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994): Positional Cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. Nature 372:425-432.