

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

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Der Einfluss des Steroidhormons β -Ecdyson auf die
Skelett- und Herzmuskulatur von weiblichen, ovariectomierten
Sprague-Dawley-Ratten**

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

vorgelegt von
Matthias Volkert
aus
Erfurt

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. M. P. Schön

- I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Wuttke
- II. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Tezval
- III. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp

Tag der mündlichen Prüfung: 04 März 2013

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|----------------------------|-------|
| Abkürzungsverzeichnis..... | 5 |

1. Einleitung

| | |
|--|----|
| 1.1 Sarkopenie..... | 7 |
| 1.1.1 Sarkopenie bei der alternden Frau..... | 8 |
| 1.1.2 Therapieansätze bei Sarkopenie..... | 9 |
| 1.1.3 Ecdyson als alternative Therapieoption..... | 11 |
| 1.2 Ecdysteroid Ecdyson..... | 11 |
| 1.2.1 Grundlagen zum Ecdysteroid Ecdyson..... | 12 |
| 1.2.2 Ecdysteroide und das Muskel- und Herzgewebe..... | 14 |
| 1.3 Die Muskulatur und ihre Pathologien..... | 15 |
| 1.3.1 Wirkung der Sexualsteroiden auf die Skelettmuskulatur..... | 17 |
| 1.4 Die Herzmuskulatur und ihre Pathologien..... | 18 |
| 1.4.1 Wirkung der Sexualsteroiden auf die Herzmuskulatur..... | 19 |
| 1.5 Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) und die Sarkopenie..... | 20 |
| 1.6 Die Ratte als Versuchstier | 21 |
| 1.7 Wahl der Substanzmengen | 22 |
| 1.8 Ziel der Studie | 23 |

2. Material und Methoden

| | |
|---|----|
| 2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen | 24 |
| 2.1.1 Gesetzliche Bestimmungen | 25 |
| 2.1.2 Ovariectomie und Identifikationssystem | 25 |
| 2.1.3 Zeitlicher Ablauf | 25 |
| 2.1.3.1 Zeitlicher Ablauf – Versuch I | 25 |
| 2.1.3.2 Zeitlicher Ablauf – Versuch II | 27 |
| 2.2 Die quantitative Computertomographie (qCT)..... | 28 |
| 2.3 Organhistologie | 30 |
| 2.4 Statistische Methoden | 32 |

3. Ergebnisse

| | |
|---|----|
| 3.1 Futtermittelaufnahme..... | 33 |
| 3.1.1 Versuch I – Futtermittelaufnahme..... | 33 |
| 3.1.2 Versuch II – Futtermittelaufnahme | 34 |
| 3.2 Rattenkörpergewichte..... | 36 |
| 3.2.1 Versuch I - Rattenkörpergewichte..... | 36 |
| 3.2.2 Versuch II - Rattenkörpergewichte..... | 38 |
| 3.3 Rattenherzgewichte..... | 40 |
| 3.4 CT- Auswertung..... | 41 |
| 3.4.1 Versuch I - Tibia | 41 |
| 3.4.2 Versuch II - Tibia | 43 |
| 3.4.3 Versuch II - Abdomen | 45 |
| 3.5 Muskelhistologie..... | 46 |
| 3.5.1 Versuch I - M. gastrocnemius..... | 46 |
| 3.5.2 Versuch II - M. gastrocnemius..... | 47 |
| 3.5.3 Versuch I - Rattenmyokard..... | 48 |
| 3.5.4 Versuch II - Rattenmyokard | 49 |
| 3.6 Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) - Versuch I und II | 51 |
| 3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse..... | 52 |
| 3.7.1 Versuch I - s.c. Kurzzeitversuch..... | 52 |
| 3.7.2 Versuch II - Futterzusatz im Langzeitversuch..... | 53 |

4. Diskussion

| | |
|--|----|
| 4.1 Futtermittelverbrauch und Gewichtszunahme..... | 54 |
| 4.2 CT-Auswertung Muskulatur. | 56 |
| 4.3 Histologische Auswertung der Muskulatur..... | 58 |
| 4.3.1 Skelettmuskulatur..... | 58 |
| 4.3.1.1 IGF-1..... | 59 |
| 4.3.2 Herzmuskulatur..... | 60 |

5. Zusammenfassung.....61

6. Literaturverzeichnis.....63

| | |
|-------------------------------|----|
| <u>7. Anhang</u> | 71 |
| 7.1 Abb. 28-32..... | 71 |
| 7.2 Tab. 4-6, 8-10..... | 72 |

Abkürzungsverzeichnis

1,25D = 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3

20E = 20 Hydroxyecdysone

Abb. = Abbildung

Appl. = Applikation

AR = Androgenrezeptor

BMI = Body Mass Index

Ca²⁺ = Calcium

CT = Computertomographie

CT1 = erste computertomographische Messung (vor Versuchsbeginn)

CT2 = zweite computertomographische Messung (nach Versuchsende)

DHT = Dihydrotestosteron

DNA = Deoxyribonucleic acid

Ecd = Ecdysone

EcR = Ecdysteroidmembranrezeptor

EcRE = Ecdysone Responds Elements

E² = Östradiol

ER = Östrogenrezeptor

ER α = Östrogenrezeptor α

ER β = Östrogenrezeptor β

GH = Growth Hormon (Wachstumshormon)

h = Stunde

HDL = High Density Lipoprotein

HE = Hämatoxylin-Eosin

HERS = Heart and Estrogen Progestin Replacement Study

HRT = Hormone Replacement Therapy

IGF-1 = Insulin-like Growth Factor-1

IGF-1BP = Insulin like Growth Factor Binding Protein

IL 1 = Interleukin 1

IL 6 = Interleukin 6

ILD = Intermediate Density Lipoprotein

KHK = koronare Herzkrankheit

LDL = Low Density Lipoprotein

LPL = Lipoproteinlipase

M. = Musculus

MGF = Mechano Growth Factor

MWS = Million Women Study

NO = Stickoxid

O₂ = Sauerstoff

ovx = ovariectomiert, Ovariectomie

PG = Prostaglandine

PI3K = Phosphatidylinositol-3-kinase

qCT = quantitativer Computertomograph

s.c. = subkutan

SD-Ratte = Sprague-Dawley-Ratte

SERM = Selective Estrogen Receptor Modulators

SHBG = Sex Hormon Binding Globulin

s.S. = siehe Seite

STH = somatotropes Hormon

T = Testosteron

Tab. = Tabelle

TNF α = Tumornekrosefaktor α

USP = Ultraspiracle Protein

VLDL = very low density lipoprotein

WHI = Women's Health Initiative

WHO = Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

1.1 Sarkopenie

Epidemiologische Studien belegen, dass etwa 5-13 % aller 60- bis 70-Jährigen und bis zu 50% der über 80-Jährigen von Sarkopenie betroffen sind und diese Erkrankung somit eine zunehmend soziologische und ökonomische Rolle spielt. Sarkopenie führt oft zu Gebrechlichkeit (Morley et al. 2005) sowie Funktionsstörungen und ist mit erhöhter Erwerbsunfähigkeit vergesellschaftet (Janssen et al. 2002; Janssen et al. 2004).

Als Sarkopenie wird der Verlust von Muskelmasse und Muskelkraft vor allem bei älteren Personen bezeichnet (Norman et al. 2009). Der Begriff Sarkopenie leitet sich vom griechischen Wort „sarx“ für Fleisch und „penia“ für Mangel ab (Bauer et al. 2008). Der altersassoziierte Muskelschwund kann schon im Alter von 50 Jahren beginnen, aber ab dem 70. Lebensjahr beschleunigt sich der Prozess. Der Verlust an Muskelkraft beträgt zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr etwa 1,5 % pro Jahr, danach sogar etwa 3 % pro Jahr (Evian und Campbell 1993; Bauer et al. 2008). Die Entstehung von Sarkopenie und Kachexie ist wesentlich durch körperliche Inaktivität, Degeneration des Nervensystems, vermehrten oxidativen Stress (Möllenhoff 2007) sowie den Proteinmetabolismus der Muskulatur determiniert. Der Bedarf an Proteinen scheint im Alter erhöht, sodass vermutet wird, dass die Unterversorgung mit Proteinen ein wesentlicher Faktor für die Entstehung und das Fortschreiten der Sarkopenie ist (Janssen et al. 2002; Norman et al. 2009). Hierbei ist eine Vielzahl pathophysiologischer Mechanismen mit einer Dysbalance zwischen anabolen und katabolen Faktoren involviert. So konnte in Tiermodellen nachgewiesen werden, dass die Proteinsyntheserate und die oxidative Enzymaktivität der Mitochondrien mit zunehmendem Alter abnehmen (Münzer 2010). Im Gegensatz zur Kachexie ist die Sarkopenie im Regelfall nicht mit einem Gewichtsverlust assoziiert, wohl aber mit funktioneller Einbuße und deren klinischen Konsequenzen (Haehling 2010) aufgrund des Muskelschwundes bei gleich bleibenden Körperfettdepots (siehe Abb. 1b S. 8) (Bauer et al. 2008). Bei Betroffenen führt dies zu einer Häufung von Stürzen und damit verbundenen Verletzungen (Morley et al. 2005). Männer und Frauen sind ungefähr gleich häufig betroffen.

Die im Alter häufige Mangelernährung (Janssen et al. 2002) sowie nicht ausreichende Bewegung und Immobilisation (z. B. bei krankheitsassoziiierter Bettruhe) gelten als weitere Ursachen und begünstigen die Sarkopenie. Daher sind ältere Menschen auch unterschiedlich stark von der Sarkopenie betroffen (Bauer et al. 2008).

Eine Vielzahl von weiteren Veränderungen im Skelettmuskel spielt eine zusätzliche Rolle bei der Entstehung der Sarkopenie. Je inaktiver der Lebensstil ist, desto frühzeitiger zeigen sich

altersbedingte Veränderungen. Die Reduktion der motorischen Kompetenz und eine Minderung visueller und vestibulärer Fähigkeiten stehen dabei im Vordergrund. Neben einer reduzierten Anzahl von Muskelfasern sind hierfür neuronale Einflüsse sowie eine Einschränkung der mechanischen Muskelfunktion verantwortlich (Mayer et al. 2011).

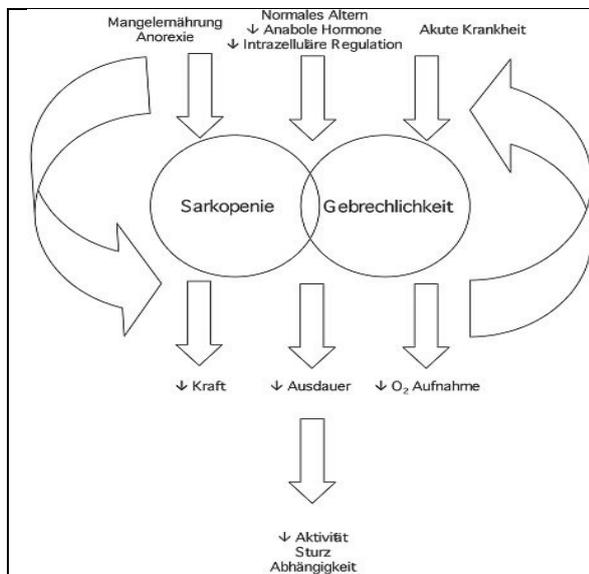


Abb. 1a Schematische Darstellung zu den wesentlichen Faktoren der Sarkopenie (Münzer 2010, S. 189)

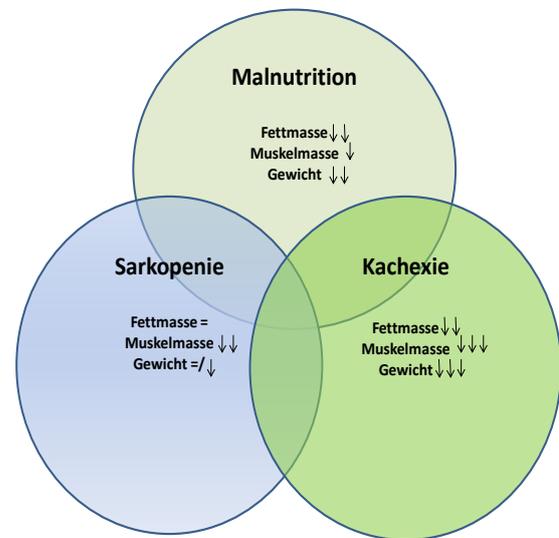


Abb. 1b Überlappung von Malnutrition, Kachexie und Sarkopenie und ihre Auswirkung auf Körpergewicht und Zusammensetzung (Bauer et al. 2008, S. 306)

1.1.1 Sarkopenie bei der alternden Frau

Jede Frau durchlebt durchschnittlich um das 51. Lebensjahr starke hormonelle Veränderungen, die Klimakterium genannt werden. Es kommt zu einem permanenten Ausbleiben der Menstruation infolge einer Erschöpfung der ovariellen folliculären Funktionen. Dieser Zustand bezeichnet die Menopause (Dietel et al. 2005), wodurch es zu einem Abfall von bestimmter Schlüsselhormone kommt (Sayer 2010). Dies könnte sich durch ein Östrogen- und/oder Testosteronmangelsyndrom zeigen und einen weiteren Ansatz der Entstehung und Behandlung von Sarkopenie darstellen.

Bei der Ausbildung eines Testosterondefizitsyndroms zeigen sich unter anderem ein Abbau des Muskeltonus und eine Minderung der Knochendichte (Rako 2009). Durch diesen Androgenmangel mit dem dadurch verbundenen Abbau des Muskeltonus sowie dem zusätzlichen altersbedingten Muskelabbau durch Immobilisation (Greeves et al. 1999) wird das Bild der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen noch verstärkt und das Risiko von Stürzen steigt (Gower und Nyma 2000).

Das Östrogenmangelsyndrom zeigt langfristig einen Muskelabbau und eine BMI-Zunahme

(Dobs et al. 2002). Hier wird unter anderem die funktionelle Einheit des Muskels (α -Motoneuron, motorische Einheiten) von der Nervenversorgung abgekoppelt und der Muskel wird von Fett- und Bindegewebe infiltriert. Es kommt zu einer Abnahme der Zahl und Größe der Muskelfasern und der Muskelmasse sowie einer Zunahme des viszeralen Fettgewebes (Bauer et al. 2008) und zudem zu einer Ablagerung von Alterspigment (Lipofuzsin) im Muskel (Janssen et al. 2002).

Allerdings wird postmenopausal nicht nur ein Verlust von ovariellen Östrogenen beobachtet, sondern auch eine Abnahme von Wachstumshormonen und des IGF-1-Spiegels (ca. 1 % pro Jahr ab dem 50. Lebensjahr (Bauer et al. 2008), was vermutlich gerade auch bei der Entstehung von Sarkopenie eine wichtige Rolle spielt (Janssen et al. 2002; Bauer et al. 2008). Ein weiteres Problem postmenopausal ist die Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen und hypertensiven Herzerkrankungen. Bei Frauen liegen diese Erkrankungen bis zur Menopause weit unter denen der Männer, steigen jedoch nach dem Versiegen der ovariellen Funktion deutlich an (Grohé et al. 1999).

1.1.2 Therapieansätze bei Sarkopenie

Es werden verschiedene Ansätze, die der Sarkopenie entgegenwirken sollen, diskutiert.

Krafttraining gilt als geeignet, der Entstehung einer Sarkopenie vorzubeugen. Das „American College of Sports Medicine“ empfiehlt 3 Sets à 15 Wiederholungen (3x/Woche) für alle wichtigen Muskelgruppen (Janssen et al. 2002). Daneben ist Krafttraining geeignet, um die Ganggeschwindigkeit und die Muskelkraft insgesamt zu verbessern. Der Nachteil ist, dass das Training zwar zu einer Verbesserung dieser Parameter führt, aber schnell ein Plateau erreicht wird und weiteres Training zu keinen weiteren Erfolgen führt. Sollte man das Training nicht bis zum Ende seines Lebens praktizieren, sondern rapide aufhören, könnte dies zu einem Muskelverlust von bis zu 32% führen (Evian und Campbell 1993).

Verschiedene Untersuchungen haben verdeutlicht, dass eine Erhöhung der Proteinaufnahme (0.8 g Protein pro kg/Körpergewicht am Tag (Janssen et al. 2004)) einen günstigen Effekt auf die Muskelkraft, die Laufgeschwindigkeit und auch die Herzmuskelkraft zeigt (Norman et al. 2009; Haehling 2010).

Ein weiterer Therapieansatz ist die Substitution von bestimmten im Alter weniger werdenden Schlüsselhormonen (Bauer et al. 2008; Sower et al. 2001), welche gerade älteren Frauen nicht nur bei Sarkopenie, sondern auch bei anderen postmenstrualen Beschwerden helfen sollen. Bei der Gabe von Östrogen kommt es im Blutserum zu einer Zunahme von HDL und LDL (Rako 2009), was die Kontraktilität am Herzen steigert (Grohé et al. 1999). Allerdings konnte die WHI-Studie zeigen, dass es auch zu einer Zunahme des Cholesterins und des Blutdrucks

kommt. Das Risiko koronarer Herzkrankheiten stieg um 24%.

Bei der Gabe von Östrogen kommt es zu einer Erhöhung des Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) und durch Bindung somit zu einer Reduzierung von freiem, biologisch aktivem Testosteron im Blut, was wieder eine Sarkopenie beschleunigt (Rako 2009, Gower und Nyma 2000).

Bei dem Versuch, postmenopausalen Frauen Androgen zu substituieren, konnte man einen positiven Effekt auf die Muskulatur beobachten (Wu 1997; Römmler 2006). Androgene wirken der Muskelatrophie entgegen (Basaria et al. 2001), verringern den Body Mass Index (BMI) (Römmler 2006) und verbessern die Sexualität (Rako 2009; Dobs et al. 2002). Sobald Androgene allerdings außerhalb des physiologischen Bereiche (zwischen 0.25 mg – 8 mg pro Tag (Rako 2009)) substituiert werden, kann es zu rechtsventrikulärer Hypertrophie, Blutdruckanstieg, Aggression, psychischen Problemen (Tsunoda 2001; Urhausen et al. 2003), Erhöhung von Cholesterin und LDL sowie Reduzierung von HDL kommen. Somit erhöht sich das kardiovaskuläre Risiko (Rako 2009; Urhausen et al. 2003).

Bei dem Versuch einer kombinierten Therapie von Testosteron und Östrogen konnte eine Gewichtszunahme durch Muskelzunahme und Fettabnahme gezeigt werden. Es kam zu einer Reduzierung von Cholesterin, LDL, Triglyceriden und HDL (Dobs et al. 2002).

Eine weitere Möglichkeit ist die kombinierte Hormonersatztherapie (HRT), bestehend aus Östrogenen und Gestagenen bei nicht-hysterektomierten Frauen (Cosman und Lindsay 1999, Stauber 2005). Die HRT-Therapie schützt das Herz durch verminderte Sympathikusfunktion, sowie vor Fettzuwachs und Muskelabbau (Greeves et al. 1999, Alying 2005). Trotz der Vorteile ist die HRT nicht für jede Frau ausnahmslos zu empfehlen. In jüngster Zeit wurden im Hinblick auf das kardiovaskuläre Risiko der Nutzen und die Sicherheit der chronischen Hormonzufuhr bei postmenopausalen Frauen von drei großen Studien in Frage gestellt. So zeigen die Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS), die Million Women Study (MWS) und die Women's Health Initiative (WHI (Alying 2005)) keinen eindeutigen Nutzen bei nicht-hysterektomierten Frauen. Vielmehr wiesen ihre Ergebnisse auf potentielle Nachteile einer postmenopausalen Hormonersatztherapie, wie zum Beispiel ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von thrombotischen Ereignissen, Endometriumkarzinomen und Gallenblasenerkrankungen, hin (Alying 2005). Viele Frauen sind sich der möglichen Nebenwirkungen der synthetisch hergestellten Therapeutika bewusst geworden und entscheiden sich als Alternative für eine Hormontherapie auf pflanzlicher Basis. Eine große Anzahl pflanzlicher Gynäkologika ist derzeit beschrieben worden und steht dafür zur Verfügung.

1.1.3 Ecdyson als alternative Therapieoption

Bei der Suche nach geeigneten Therapiealternativen zeigte die Substanz 20 Hydroxyecdyson (20E) aus der Gruppe der Ecdysteroide eine anabole und zusätzlich im Rahmen dieses Versuchs eine knochenprotektive Wirkung (Wilborn et al. 2006). Diese Wirkung konnte in mehreren Versuchen am ovx-Rattenmodell bestätigt werden (Seidlová-Wuttke et al. 2010). Zwar wurde die Wirkung von Ecdyson (Ecd) auf verschiedene Organe in vielen Versuchen bereits untersucht, doch inwiefern sich Ecd auf Organe auswirkt, die postmenopausal unter einer Östrogendefizienz bzw. einem Androgendefizit leiden, ist weitgehend unerforscht. Kann bei der Einnahme das anabol wirkende Ecd die altersbedingte Sarkopenie bei postmenopausalen Frauen aufhalten, ohne dabei negative Effekte auf das Herz zu zeigen, welche typisch für klassische Anabolika wie Testosteron wären?

1.2 Ecdysteroid Ecdyson

Ecdyson gehört zu den Ecdysteroiden und kann als 20-Hydroxyecdyson (20E) sowohl einen tierischen als auch einen pflanzlichen Ursprung haben.

Im pflanzlichen Bereich ist es ubiquitär verbreitet und kommt in 6% der Pflanzenspezies als sekundärer Inhaltsstoff vor (Lafont und Dinan 2003), spielt dort eine protektive Rolle und dient vermutlich der Abwehr von Raupenfraß (Báthori et al. 2008).

Im Tierreich besitzen Ecdysteroide bei Arthropoden hormonelle Funktionen. Sie stimulieren bei Insekten die Verpuppung in verschiedenen Entwicklungsstadien und sind vielfach artspezifisch, sodass 90 % der Tierarten in ihrer Reifung vom Ecdysteroid abhängig sind. Bei vielen anderen Arthropoden sind sie bedeutsam im Hinblick auf die Reproduktion, Embryogenese und Diapause (Hegstrom 1998; Zeitouni et al. 2007; Báthori et al. 2008).

Die ersten pharmakologischen Tests an Säugetieren wurden Ende der 60er Jahre durchgeführt, um den Effekt des Ecdysteroid am Organismus der Säugetiere herauszufinden, wenn dieses Mittel als Insektizid seine Verwendung finden würde. Das war der Startschuss für viele weitere pharmakologische Versuche mit Ecd an Säugetieren, da man sehr schnell zahlreiche positive Effekte auf den Wirbeltierorganismus fand (Dinan und Lafont 2006).

Ecdysteroide sind kein endogenes Produkt des Säugetiermetabolismus, gleichzeitig ist die orale Aufnahme über die Nahrung möglich. Sehr schnell erkannte man den anabolen Effekt von Ecd in verschiedenen Tests mit Ratten (Báthori et al. 2008).

Da oral zugeführte Ecdysteroide wie Ecd aus pflanzlichen Quellen nur eine geringe Toxizität für Säuger (LD50 > 9g/kg für 20E orale Gabe und LD50 > 6,4g/kg bei intraperitonealer Applikation an der Maus (Lafont und Dinan 2003)) zeigte, führte dies zur Verwendung von

Ecdysteroiden in kommerziellen Präparaten der Fitnessindustrie. Auch die pharmakokinetischen Eigenschaften der Ecdysteroiden sind aufgrund ihrer starken Polarität und der damit einhergehenden hohen Wasserlöslichkeit von Vorteil (Báthori et al. 2008). Das erste kommerzielle Ecdyson-Präparat „Ecdisten®“ wurde in der damaligen Sowjetunion angepriesen (3x1 Tablette à 5 mg 20E für 15 bis 20 Tage), gefolgt von der Grünen Tee-Mischung „Maralan®“ in der Tschechischen Republik (Sláma und Lafont 1995). Derzeit sind ca. 300 ecdysteroidhaltige Produkte auf dem Markt, von denen einige hohe Konzentrationen an Ecd aufweisen, so dass mit dem Konsum dieser Produkte eine Tageszufuhr von bis zu 1g Ecd erreicht werden kann. Basierend auf ihrem Gehalt an Ecd sollen sie eine adaptogene, anabole Wirkung auf den menschlichen Körper haben und zu einem Aufbau an Muskelmasse sowie zu einer Abnahme des Körperfettanteils führen. Auch wird ihnen eine regenerative Eigenschaft nach intensivem Muskeltraining nachgesagt (Dinan und Lafont 2006).

Die Anzahl an veröffentlichten Artikeln im Hinblick auf die Wirkung von Ecdysteroiden ist hoch. Jede erdenkliche physiologische Funktion wird angesprochen und das Bild eines Ecdysteroideneinsatzes als Universalmedizin vermittelt (Báthori et al. 2008; Lafont und Dinan 2003). Die wissenschaftlich bestätigte Wirkung der vertriebenen Produkte bleibt unklar. Tierexperimentelle Studien sowie randomisierte und doppelblind Placebo-kontrollierte Studien zur Bestätigung einer Langzeiteffektivität von Ecdysteroiden beim Menschen fehlen (Báthori et al. 2008) oder konnten keinen signifikanten anabolen Effekt bei Sportlern nachweisen (Wilborn et al. 2006).

Trotz ihrer anabolen Wirkung wurden Östrogene oder Antiöstrogene sowie androgene Wirkungen verneint (Báthori et al. 2008; Dinan und Lafont 2006). Zudem wird den Ecdysteroiden eine hypocholesterinämische Wirkung auf den Lipidmetabolismus zugeschrieben (Sláma und Lafont 1995).

1.2.1 Grundlagen zum Ecdysteroid Ecdyson

Für den Kurz- und Langzeitversuch dieser Arbeit wurde das Ecdysteroid 20E pflanzlichen Ursprungs verwendet, das auch unter dem Namen β -Ecdyson oder Ecdysterone bekannt ist. Besonders hohe Konzentrationen kommen in der Eibe *Taxus baccata* oder im Farn *Polypodium* vor (Zhu et al. 2007).

Im Stoffwechsel der Säugetiere erfolgt durch eine Redoxreaktion die Umwandlung von oral aufgenommenem Ecd zum aktiveren Metaboliten 20-Hydroxyecdyson in der Leber oder durch intestinale Bakterien. Die Elimination aus dem Blut findet fäkal als biliäre Ausscheidung und über den Urin statt. Die Halbwertszeit von oral aufgenommenem Ecd

beträgt für den Menschen 4 Stunden (h), bei 20E 9h, bei Ratten 0,4h, 0,2h bei intravenöser Injektion und 2h bei intramuskulärer Applikation (Sláma und Lafont 1995).

Die Wirkung des Ecd in Arthropoden wird durch einen funktionellen Rezeptor für Ecd vermittelt. Dieser besteht aus zwei nukleären Rezeptoren, dem Ecdyson-Rezeptor (EcR), welcher wiederum Mitglied der Nuklear-Rezeptor-Superfamilie ist, und dem Ultraspiracle-Protein (USP), das wiederum die homologe Form des Retinoid-X-Rezeptors der Säugetiere darstellt (Tran et al. 2001; Dinan und Lafont 2006; Monier et al. 2005; Karim und Thummel 1992; No et al. 1996). Ecdysteroid und die androgen-anabolen Steroide besitzen ein gemeinsames Grundgerüst, jedoch kann Ecd nicht an AR, ER oder einen Glucocorticoidrezeptor binden und besitzt zudem keinen eigenen EcR in Säugetieren, wie bei Arthropoden (Sláma und Lafont 1995; Báthori und Pongrácz 2005; Báthori et al 2008). Mit dieser fehlenden Möglichkeit an diese Rezeptoren zu binden, können die Ecdysteroide die Eigenschaften, nämlich die für androgen-anabole Steroide bekannten hormonellen Nebenwirkungen, nicht hervorrufen. Es wird angenommen, dass die Ecdysteroide ihre molekulare Wirkung bei Säugetieren analog zu den Signalwegen über membrangebundene AR aktivieren (Báthori et al. 2008).

Andere Arbeiten beschäftigten sich mit dem Vergleich zwischen dem Ecd und Vit D₃. Bereits 1997 zeigte Kholodova, dass die Gabe von Ecd einer D₃-Hypovitaminose entgegenwirken kann und somit einen ähnlichen Signalweg vermuten ließ.

Aufgrund der ähnlichen chemischen Struktur zeigt Ecd bei Wirbeltieren vergleichbare Effekte wie das Hormon 1 α 25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25D), welches in den Nieren aus 25-Hydroxyvitamin D₃ entsteht, nachdem bereits Hydroxyvitamin D₃ in der Leber von Vitamin D₃ umgewandelt wurde (Toth et al. 2010).

Andere Forschungsdaten lassen vermuten, dass Ecd eine signifikante Veränderung der Genexpression durch die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) verursacht, die wiederum die Proteinkinase B beeinflusst, welche für den anti-apoptischen Effekt zuständig ist (Constantino et al 2001; Dinan und Lafont 2006).

Wichtige Faktoren für die anabole Wirkung der Ecdysteroide sind die Diolgruppen des Moleküls an C-20 und C-22. Bei der Untersuchung der Beziehung zwischen den Strukturen der Ecdysteroide und deren Aktivitätsgrad stellte sich heraus, dass bei gleicher Grundstruktur die Anzahl und die Position der Hydroxygruppe an C-1 eine verminderte Aktivität zeigten (Báthori et al. 2008). In beiden Versuchen wurde die potenteste Verbindung, das 20E, verwendet.

1.2.2 Ecdysteroide und das Muskel- und Herzgewebe

Bei Arthropoden kontrollieren und beeinflussen die Ecdysteroide die Reproduktion, Embryogenese und Diapause (Báthori et al. 2008). Speziell bei dem Tabakswärmer (*Manduca sexta*) fand man in Versuchen heraus, dass dort Ecdysteroide die Umwandlung des *Musculus dorsalis oblique* während der Metamorphose regulieren (Hegstrom 1998).

Während der Verpuppungsprozesse der *Drosophila* wird der Umbau des Skelettmuskels direkt von Ecd beeinflusst. Ecd induziert auf eine noch unbekannt Weise die temporale Expression des Mef2 in adulten Myoblasten, was wiederum eine Umwandlung dieser Zellen verursacht. Dabei immigrieren die aktivierten Myoblasten in ihren zukünftigen Stellen und differenzieren sich zu Fasern mit spezifischem adultem Charakter (Lovato et al. 2005).

Auch während der Herzumwandlung spielt Ecd als eine Art Einleitungshormon eine wichtige Rolle bei der *Drosophila melanogaster*. 30h nach der Verpuppung kommt es erst nach dem dritten Peak des Steroidhormons Ecd zur Herzumwandlung, wobei die Myozyten der Aorta an Größe und Anzahl der Myofibrillen zunehmen (Zeitouni et al. 2007).

Bei Säugetieren stellte man in vielen verschiedenen Versuchen einen signifikant anabolen Effekt von Ecd im Sinne einer muskelaufbauenden, die Proteinsynthese stimulierenden Wirkung fest, die der der anabolen Steroide ähnelt (Lafont und Dinan 2003). In Rattenschwimmversuchen bewirkte Ecd eine erhöhte Synthese von myofibrillären Proteinen der Extremitätenmuskulatur (Lafont und Dinan 2003; Sláma und Lafont 1995). Auch wenn die Struktur von Ecd der der anabolen Steroide stark ähnelt, vermutet man, dass speziell die Nummer und Positionen der Hydroxylgruppen für den anabolen Effekt wichtig sind. Eine zusätzliche Hydroxylgruppe an der C1-Position reduziert die Aktivität, während die Anwesenheit einer α -Hydroxylgruppe an Position C11 eine Erhöhung der Proteinsynthese wie bei Ecd bedeutet.

Somit nehmen Ecdysteroide Einfluss auf den Wachstumsvorgang der quergestreiften Muskulatur, speziell der Typ-II-Muskelfasern. Ihre Wirkung geht hier mit einer Vergrößerung der einzelnen Muskelfasern und einer entsprechend erhöhten Anzahl an myonukleären Zellen durch eventuelle Aktivierung von Satellitenzellen einher. Da aber Ecdysteroide nicht an AR binden können, ist der genaue Mechanismus, wie Ecd im Muskel seine Wirkung entfaltet, noch unbekannt. Einige Spekulationen beschäftigen sich damit, dass der anabole Effekt in Muskeln durch eine Erhöhung des Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) induziert wird oder die Erhöhung des sarkoplasmatischen Kalziumlevel, wie bei Gabe von Testosteron, eine Rolle spielt (Báthori et al. 2008).

Ob die anabol wirkende Substanz Ecd kardioprotektiv oder eher kardiodestruktiv ist, wurde bis jetzt nicht näher untersucht. Man weiß, dass Ecd die Proteinbiosynthese aktiviert, sich

positiv auf Stress auswirkt, den Cholesterinwert senkt, direkt am Herzen antiarrhythmogen wirkt (Báthori und Pohgrác 2005, Lafont und Dinan 2003) und vor einer myokardialen Ischämie schützt (Lafont und Dinan 2003). Tests bei Hasen zeigten einen Rückgang der Arteriosklerose und eine Zunahme der Na⁺/K⁺ ATPase im Myokard, nachdem sie 28 Tage 20E (10mg/kg/Tag per os) bekamen (Khushbaktova et al. 1987). Andere Experimente belegten einen positiven Effekt von E20 bei Rattenherztransplantationen, indem es einen Abfall von Lipidoxidationen am Herzen zeigte, frei werdende Herzenzyme reduzierte und pathologische Veränderungen der Mitochondrien im Myokard reduzierte (Zhao et al. 2002).

1.3 Die Muskulatur und ihre Pathologien

Verschiedene Muskelarten haben sich auf vielfältige Aufgaben spezialisiert. Man unterscheidet dabei zwischen Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur und glatter Muskulatur. Dabei sind viele Grundprozesse in allen Muskelarten gleich oder laufen in nur leicht modifizierter Weise ab.

Der Grundprozess der Kontraktion ist in jedem Muskel eine Wechselwirkung zwischen zwei fadenförmigen Eiweißkörpern, die als Myofilamente (Myosinfilament und Aktinfilament) bezeichnet werden. Calcium (Ca²⁺) in der Umgebung der Myofilamente steuert die Muskeltätigkeit. Eine Kontraktion findet statt, wenn in der Muskelzelle die Ca²⁺-Konzentration ansteigt. Sinkt diese ab, erschlafft der Muskel (Klinke und Silbernagl 2003).

Eine Muskelzelle wird auch als Muskelfaser bezeichnet. Ihre Länge kann mehrere Zentimeter betragen. Einzelne Muskelzellen sind von einer Basalmembran umgeben, die von einem

zarten retikulären Bindegewebe (Lamina externa) umhüllt ist. Zwischen dem umhüllten Muskelgewebe liegt das bindegewebige Endomysium, das Nervenfasern, kleine Gefäße und Lymphgefäße enthält. Mehrere Muskelfasern mitsamt ihres Endomysiums werden durch ein bindegewebiges Perimysium internum (Abb.2) zu einem Primärbündel vereinigt. Mehrere Primärbündel bilden ein Sekundärbündel (Fleischfaser), welches von einem

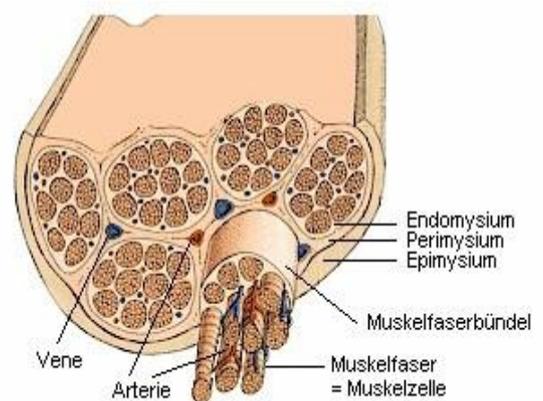


Abb.2 Gurrieri und Boes 2009 (online)

Perimysium externum umhüllt wird. Dieses Sekundär-Bündel bildet das eigentliche Muskelindividuum, das außen vom bindegewebigen Epimysium als Verschiebeschicht und der Muskelfaszie umgeben ist. Über die bindegewebigen Hüllen wird der Muskel mit

Gefäßen und Nerven versorgt (Baumhoer et al. 2003).

Die einzelnen Muskelfasern werden zusätzlich noch in drei Arten unterteilt. Typ I sind schmale, myoglobulinreiche Fasern mit zahlreichen Mitochondrien. Diese Fasern sind für die anaerobe Energiegewinnung geeignet und kontrahieren langsam, aber kräftig und ausdauernd (langsam rote Fasern). Man findet sie v.a. in Muskeln, die Haltearbeit leisten müssen. Typ II sind helle Fasern mit wenig Myoglobin und Mitochondrien, aber einem höheren Gehalt an Fibrillen. Sie sind zur anaeroben Energiegewinnung fähig und kontrahieren schnell und kräftig, aber nicht lang andauernd. Die dritte Gruppe sind die intermediären Fasern. Sie stehen zwischen den Typen I und II.

Die quergestreiften Skelettmuskelzellen entstehen wie alle Muskelzellen durch die Verschmelzung von Vorläuferzellen (Myoblasten). Bei Längsschnitten werden die Myofibrillen sichtbar, die eine deutliche Querstreifung aufweisen. Die ovoiden Zellkerne haben eine periphere Lage. Zwischen der Basalmembran und dem Sarkolemm können einkernige Satellitenzellen liegen. Sie entsprechen undifferenzierten Vorläuferzellen, aus denen im Rahmen von Degenerationsvorgängen neue Muskelfasern wachsen können (Baumhoer et al. 2003).

Die Hypertrophie der Muskelfasern ist gekennzeichnet durch eine Konstanz der Zellzahl, während bei der Hyperplasie die Zellzahl steigt. Die Myofibrillen werden in der Zelle dichter verlagert und ihre Anzahl wird vergrößert. Eine Muskelhypertrophie setzt voraus, dass genügend Eiweiße zugeführt werden und der Muskel über mehrere Wochen mehrmals am Tag etwa 50 % der Maximalkraft entwickelt. Die Ausbildung der Hypertrophie kann durch Kraftsport und hormonell durch Sexualsteroiden (z.B. Testosteron, Anabolika, siehe unten) gefördert werden. Nichtgebrauch der Muskulatur, wie bei Bettlägerigkeit oder bei Immobilität im hohen Alter, führt zu einer Hypotrophie des Skelettmuskelgewebes durch Abnahme der Zahl der Myofibrillen und Verkleinerung der Zellvolumina. Zwischen den Muskelfasern kommt es zur Wucherung von Fettgewebe. Nicht benutzte Anteile der Muskulatur können sich in Bindegewebe umwandeln (Baumhoer et al. 2003).

Bei einer Atrophie bleibt die Zellzahl bei vermindertem Proteingehalt der Zelle erhalten.

Die maximale Kraftentwicklung beträgt nach wie vor 6 kp/cm², die Verkleinerung des Muskelquerschnittes bedingt jedoch eine deutliche Leistungsminderung des Gesamtmuskels (Klinke und Silbernagl 2003). Somit verlieren Menschen um das 70. Lebensjahr durch weniger Aktivitäten, Bettlägerigkeit und verminderte Synthese von Sexualsteroiden im Alter bis zu 20 % der Muskelkraft, welche um das 30. Lebensjahr bestand (Thakur 2003).

1.3.1 Wirkung der Sexualsteroiden auf die Skelettmuskulatur

Im Alter vermindert sich der Muskelanteil und der Fettanteil des Körpers erhöht sich, was auf körperliche Inaktivität und bei postmenopausalen Frauen auf hormonale Faktoren zurückzuführen ist (Klinke und Silbernagl 2003). Dieser Verlust der Muskelmasse um bis zu 25 % (Ribom 2003) im Alter bei postmenopausalen Frauen, speziell der unteren Extremitäten, könnte einen weiteren Verlust der physiologischen Funktion des Muskels bedeuten und somit das Risiko von Stürzen und anderen Krankheiten erhöhen (Gower und Nyma 2000).

Der Muskelauf- und -abbau ist stark an den Androgen- und Östrogenmetabolismus gekoppelt. Dieser Metabolismus findet bei einer gesunden prämenopausalen Frau hauptsächlich in drei Regionen des Körpers statt: in den Ovarien, im Fettgewebe und in der Nebennierenrinde. Eine zusätzliche geringe Mitwirkung des Sexualsteroidmetabolismus befindet sich in den Muskeln. Die Leber spielt dabei eine signifikante Rolle bei mindestens zwei Aspekten; einerseits die Umwandlung vom endogenen Östrogen in dessen verschiedene Metaboliten und andererseits die Synthese des Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG). Dieses Globulin kontrolliert die Bioverfügbarkeit von Östradiol (E₂) und Testosteron (T) (Notelovitz 2002).

Postmenopausal verlieren Frauen nicht nur durch das Versiegen der ovariellen Funktion einen Großteil ihres Östrogens und Testosterons, sondern auch die Nebennierenproduktion von Hormonen fällt bei Frauen im Alter stärker ab als bei Männern (Rako 2009).

Somit entsteht nicht nur ein Östrogen-, sondern auch ein Androgendefizit, welches den oben genannten Muskelabbau und die Entstehung von Sarkopenie fördert.

Der Mechanismus, wie androgene Steroide ihre Funktion an den Zielzellen ausüben, ist durch die Vielfalt der Steroidmoleküle und deren Affinität zu androgenen Rezeptoren unterschiedlich. Ihre physiologischen Funktionen intrazellulär an den Zielzellen werden entweder durch eine Aktivierung direkt durch die Bindung am Androgenrezeptor (AR) oder indirekt durch Umwandlung zu E₂ durch Bindung an Östrogenrezeptoren (ER) hervorgerufen (Hartgens und Kuipers 2004; Notelovitz 2002 (siehe Abb.3)). Im Skelettmuskel können Androgene eine Hypertrophie und die Formation von neuen Myofibrillen, vor allem der Typ I-Muskelfasern, verursachen. Der Hauptfaktor dabei ist die Aktivierung der AR durch

Androgene, welche sich in den Myonuclei der Myofibrillen befinden und somit die Proteinsynthese der einkernigen Satellitenzellen aktivieren (Hartgens und Kuipers 2004).

Sie entsprechen undifferenzierten Vorläuferzellen, aus denen im Rahmen von Degenerationsvorgängen neue Muskelfasern wachsen können.

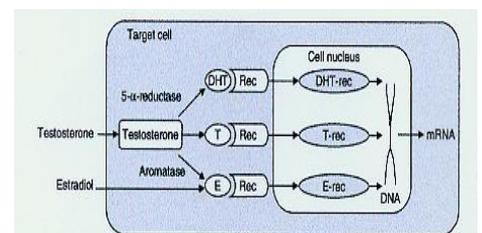


Abb.3 ; Mechanismus von Testosteron (T)/ Östradiol (E) in Zellen; DHT = Dihydrotestosteron; Rec = Rezeptor (Hartgens und Kuipers 2004, S. 544)

1.4 Die Herzmuskulatur und ihre Pathologien

Die Herzmuskulatur ist eine Sonderform der quergestreiften Muskulatur. Die Kardiomyozyten zeigen Unterschiede in Form sowie Größe und bilden einen vernetzten Verband aus Einzelzellen, d.h. sie sind kein Synzytium. In den Herzmuskelzellen finden sich viele Mitochondrien und Glykogenfelder. Der zentral gelegene Zellkern ist von einem fibrillenfreien Areal umgeben. Wichtiger für die Erregung ist der Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellularraum durch das Sarkolemm. Die Kardiomyozyten sind über End-zu-End-Verbindungen miteinander vernetzt (Baumhoer et al. 2003).

Die einzelnen Herzmuskelfasern werden von einer freien endomysialen Bindegewebsschicht umgeben, in der zahlreiche kapillare Gefäßäste verlaufen. Auf eine Zelle kommt etwa eine Kapillare und dem Herzmuskelgewebe fehlen Satellitenzellen, was eine Regeneration somit nicht möglich macht. Nach dem Untergang des Herzmuskelgewebes entsteht eine bindegewebige Narbe. Kommt es zu einer Hypertrophie einzelner Muskelzellen, verschlechtert sich die Sauerstoffversorgung, da sich die Zahl der Kapillaren nicht erhöht (Baumhoer et al. 2003).

Die Kontraktionskraft einer Muskelfaser ist nicht von ihrer Länge, sondern von der Menge der Myofibrillen abhängig. Die Muskulatur passt somit ihre Leistungsfähigkeit den Bedürfnissen des Organismus an. Dabei unterscheidet man Hypertrophie, Hyperplasie, Hypotrophie und Atrophie.

Das Herzgewicht steigt bis zum 25. Lebensjahr exponentiell (v.a. wegen des Körperwachstums) und vom 25. - 90. Lebensjahr linear (ca. 0,5-3 g/Jahr) an. Dabei wird zwischen einer Herzatrophie und einem Altersherz unterschieden. Bei einer Herzatrophie sinkt das Herzgewicht unter die Normwerte aufgrund von Kachexie oder Marasmus. Beim Altersherz stehen die chronisch-ischämischen Schädigungen im Vordergrund (Bühling et al. 2004).

Eine Muskelhypertrophie des Herzmuskels zeigt sich durch Einwirkung von Sexualsteroiden (siehe unten) und nach Druck- oder Volumenbelastung. Das Herzgewicht nimmt dann von 300 g bis 500 g zu und kann sich entweder bei Verminderung der Leistung wieder zurückbilden (Klinke und Silbernagl 2003) oder es kommt zum ventrikulären Remodeling, welches durch multiple Faktoren wie Myozytenwachstum, interstitielle Fibrose und Apoptose ausgelöst werden kann. Dies zeigt sich aufgrund einer Veränderung der Sarkomerproteine durch Einwanderung fetaler Sarkomerproteine mit verminderter Kontraktilität. Diese systolische Herzinsuffizienz wird durch eine Reduktion der Myosin-ATPase-Aktivität verursacht, welche eine Änderung der Expression von Troponin-T und/oder der Myosinleichtketten-Kinase-2 bewirkt. Dies bedeutet eine Verringerung des Grades der

Interaktion zwischen Myosin und Aktin und verringert die Muskelverkürzung (Dietel et al. 2005).

Bei manchen Formen der Herzinsuffizienz ohne Ischämie sind die myokardialen Energiespeicher in Form von Kreatinphosphat verringert. Auch die Aktivität der Kreatinkinase, die für den Transport von energiereichen Phosphaten zwischen Kreatinphosphat und ADP benötigt wird, ist vermindert und zeigt somit eine Reduzierung der myokardialen Energiereserven.

Die Mehrbelastung der übrigen gesunden Myozyten verstärkt die Grundlage eines Circulus vitiosus am Herzen (Dietel et al. 2005).

1.4.1 Wirkung der Sexualsteroiden auf die Herzmuskulatur

Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, dass ein Östrogenmangel in ovariectomierten Ratten die Herzhypertrophie fördert sowie die Kontraktilität des Myokards (verminderte NO-Synthasen) vermindert und eine Östrogensubstitution diesen Effekt moduliert. Darüber hinaus steigern die verschiedenen Östrogenmetaboliten das Wachstum kardialer Fibroblasten unterschiedlich und beeinflussen somit die kardiale Fibrose (Grohé et al. 1999).

In Experimenten konnten intrazelluläre Östrogenrezeptoren der Isoformen α und β auf mRNA- und Proteinebene in isolierten Kardiomyozyten des Menschen sowie in Kardiomyozyten neonataler und adulter Ratten nachgewiesen werden. Somit ist das Myokard ein Zielgewebe von Östrogen. Weiterhin demonstrierten Untersuchungen mit Androstendion und Testosteron, dass Kardiomyozyten diese Vorläuferzellen durch eine eigene Aromatasefunktion autokrin zu Östrogen umwandeln können (Grohé et al. 1999).

In weiteren Versuchen konnte eine Regulation der Genexpression von NO-Synthasen durch Aktivierung von Östrogenrezeptoren gezeigt werden. NO fungiert als Vasodilatator und nimmt dadurch Einfluss auf den Blutdruck. Eine durch Gefäßerweiterung bedingte Abnahme des Blutdrucks kann man somit als positiven Effekt bei der Entstehung von hypertensiven Herzkrankheiten deuten (Grohé et al. 1999).

Bei der Gabe von Androgenen, vor allem bei Bodybuildern, wurde deutlich, dass es zu einer Erhöhung des Blutdrucks kommt. Dieser wiederum verursacht auf Dauer indirekt eine linksventrikuläre Hypertrophie, eine Beeinträchtigung des diastolischen Füllungsvolumens und Arrhythmien (Kutscher et al. 2002).

Eine andere Studie zeigte, dass der Phänotyp des Herzmuskels direkt von Androgenen beeinflusst werden kann. Durch die Bindung von T und DHT an AR intrazellulär im Kardiomyozyt kam es zu einer hypertrophen Antwort der Zellen durch vermehrte

Aminosäureinkorporation in Proteinen. Zusätzlich wurde noch eine Vermehrung der ANP-Produktion im Herzen durch DHT beobachtet. ANP ist ein weiterer Marker für eine Volumenbelastung im Herzen und die daraus eventuell resultierende Hypertrophie (Marsh et al. 1998).

Die Gabe von Testosteron zeigt viele weitere Nebenwirkungen, sobald es oberhalb des physiologischen Bereichs von $< 2 \text{ mol/l}$ bei Frauen (Rako 2009) gegeben wird, wie eine Erhöhung des LDL und eine Reduzierung des HDL im Blutserum, welches die Gefahr einer Arteriosklerose erhöht und die damit verbundenen koronaren Herzkrankheiten (KHK) begünstigt (Bhashin et al. 1996; Römmler 2006; Rashid et al. 2007).

1.5 Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) und die Sarkopenie

IGF-1 und IGF-2 zählen zu den Wachstumsfaktoren (auch Somatomedine genannt) und sind Peptide mit einer partiellen Strukturhomologie wie Proinsulin. Der membranständige Rezeptor des IGF-1 ist dem des Insulins sehr ähnlich (Klinke und Silbernagl 2001). IGF-1 besteht aus 70 Aminosäuren in einer einzelnen Kette mit drei Disulfidbrücken und hat eine molare Masse von 7,6 kDa (Miura et al. 1992; Shepherd 2004). Die Bildung von IGF-1 geschieht in der Leber durch Bindung des Wachstumshormons (GH) an bestimmte Rezeptoren. Danach wird es im Blutkreislauf an verschiedene Bindungsproteine (IGF-BP 1-6) (Klinke und Silbernagl 2001) gebunden und transportiert, sodass im peripheren Gewebe lokale parakrine Effekte hervorgerufen werden, sowohl abhängig als auch unabhängig vom GH (Dietel et al. 2005). IGF-1 vermittelt fast alle wachstumsfördernden Prozesse des GH und ist offenbar der wichtigste Faktor für das Längenwachstum (Renz-Polster et al. 2006).

Die Serum-IGF-1-Konzentration wird von verschiedenen physiologischen Faktoren beeinflusst. Die Spiegel des IGF-1 steigen in der Pubertät an, erreichen einen Gipfel im Alter von etwa 16 Jahren und fallen sukzessiv um mehr als 80 % während des Alterungsprozesses ab.

Die IGF-1-Konzentrationen sind bei Frauen peripubertär etwas höher als bei Männern. Da GH der Hauptstimulus für die hepatische IGF-1-Synthese ist, reduziert eine veränderte GH-Produktion oder Wirkung die IGF-1-Spiegel. Hypokalorische Zustände sind mit einer GH-Resistenz verbunden. Daher sind die IGF-1-Spiegel bei Kachexie, Unterernährung und Sepsis reduziert (Dietel et al. 2005). Der um ca. 1 % pro Lebensalter fallende IGF-1-Spiegel im Alter verstärkt dies und wird zusammen mit einem Testosterondefizit im zunehmenden Alter zur Begünstigung der Entstehung von Sarkopenie diskutiert (Bauer et al. 2008). Versuche, bei denen man IGF-1-Infusionen (12 µg/kg pro h) kachektischen Personen gab, zeigten eine Stickstoffretention und Senkung des Cholesterinspiegels. Über einen längeren Zeitraum

durchgeführte subkutane Injektionen ließen einen anabolen Effekt mit erhöhter Proteinsynthese erkennen (Dietel et al. 2005).

Andere Studien zeigten, dass IGF-1 muskuläre Anpassungsreaktionen wie Hypertrophie oder Regenerationen nach mechanischer oder metabolischer Schädigung der Muskulatur steuert (Steinacker et al. 2002). IGF-1 kann als Zytokin die im Skelettmuskel befindlichen Stammzellen, die sogenannten Satellitenzellen, aktivieren und die Proliferation sowie die Differenzierung von Myoblasten stimulieren (Steinacker et al. 2002; Liu Y et al. 2007). Der Signaltransduktionsweg für die IGF-1 bedingte Muskelhypertrophie läuft entweder über Calcineurin/NFAT (nuclear factor of activated T cells) oder über die PI(3)K ab. Neu entdeckt wurde die Fähigkeit, dass offenbar durch mechanische Reize auf Skelettmuskel diese die Fähigkeit besitzen, parakrin/autokrin eine splicing-Variante von IGF-1 zu bilden, den sogenannten „mechano-growth factor“ (MGF) (Steinacker et al. 2002; Liu et al. 2007).

Báthori vermutete den anabolen Effekt von Ecdyson auch in Abhängigkeit vom IGF-1 im Serum. (Báthori et al. 2008).

1.6 Die Ratte als Versuchstier

Die Laborratte ist eines der am meisten benutzten Tiere für experimentelle Versuche, da sie am besten die Funktionalität der Säugetiere charakterisiert. Die Ratte dient als ein Organismusmodell zur Darstellung einer breiten Palette an biomedizinischen Pfaden, wie kardiovaskuläre Krankheiten, neurogene und metabolische Fehlsteuerung sowie Verhaltensforschung, Organtransplantationen, Autoimmunkrankheiten etc. Sie bietet einen einzigartigen Nutzen, um menschliche Krankheiten zu testen, neue Therapieformen zu entdecken und Nebenwirkungen zu finden. Durch ihre Größe im Vergleich zu anderen Versuchstieren, wie die Labormaus, ist die Ratte ideal geeignet, um verschiedene physiologische Manipulationen vorzunehmen (Krinket 2000). Die chirurgische Entfernung der Ovarien erzeugt bei diesem Versuchstier eine klinische Erscheinung, die der von Frauen in bzw. nach der Menopause, dem physiologischen Erlöschen der Ovarialfunktion, entspricht. Diese Erscheinungen sind bedingt durch den Mangel an Sexualsteroiden, deren Synthese im Vergleich zum Menschen fast ausschließlich in den Gonaden stattfindet und nach dem Wegfall der Ovarfunktion nicht von der Nebenniere kompensiert werden kann (Weerden et al. 1992). Somit ist die Ratte ein gutes Versuchsmodell, um ein E2-Defizit darzustellen und zu untersuchen (Roudebush et al. 1993). Im Langzeitversuch mit einem intensiven Applikationszeitraum von drei Monaten entspricht dies ca. 12% der Lebenserwartung einer Sprague-Dawley-Ratte (SD-Ratte) und ist somit geeignet für den Vergleich mit einem ca. zehn Jahre umfassenden Lebensabschnitt einer postmenopausalen Frau.

Dies machten sich bereits mehrere Arbeiten zunutze, welche sich mit den Effekten der ovx bei der SD-Ratte bezogen auf die Skelett- und Herzmuskulatur beschäftigten und somit als guten Vergleich zu dieser Arbeit dienen (Beckett et al. 2002; Fisher et al. 1998 + 2000; Shinoda et al. 2002).

Um die Effektivität der ovx bei SD-Ratten zu testen, wurde wie bei vielen anderen beschriebenen Arbeiten nach Abschluss der jeweiligen Versuche der Uterus der Tiere entfernt und sowohl visuell als auch mittels Gewicht auf eine Atrophie untersucht (Fisher et al. 1998 + 2000).

Für die Beurteilung der Wirkung von E2 und Ecd auf das Körpergewicht und das Muskelgewebe ist das Verhalten dieser Organe bei ovx SD-Ratten von besonderer Bedeutung, da bei uneingeschränkter Futtergabe ovx SD-Ratten eine signifikante Gewichtszunahme zeigen (Toth M et al. 2001; Seidlová-Wuttke et al. 2010).

1.7 Wahl der Substanzmengen

Die Auswahl der richtigen Substanzkonzentration ist entscheidend für den Erfolg des Versuchs. Um eine Substanzgruppe genauer zu untersuchen gibt es zwei Möglichkeiten: entweder wenige Substanzen über einen weiten Dosisbereich testen oder viele Substanzen in geringen Dosisbereichen testen. Des Weiteren sollte die Konzentration zwischen dem minimalen und maximalen Wirkungsbereich gewählt werden. Die Untersuchung der Testsubstanz Ecd am Rattenmodell wurde bislang nur von wenigen Arbeitsgruppen durchgeführt. Dabei fand man eine geringe Toxizität des 20-OH-Ecdyson (20E) heraus, welche bei intraperitonealer Gabe bei Mäusen 6,4 g/kg und bei oraler Substitution bei > 9g/kg beträgt (Lafont und Dinan 2003). Da die Halbwertszeit der Substanz 20E relativ gering ist und somit auf einen schnellen Metabolismus hindeutet, braucht man vermutlich hohe Dosen des 20E, um einen signifikanten Effekt zu erzielen (Lafont und Dinan 2003). Daher fiel die Auswahl auf drei verschiedene Dosen vom 20E im ersten und zweiten Versuch am sinnvollsten aus: die erste Dosis mit dem vermuteten geringsten Effekt, eine zweite Dosis mit einem vermuteten hohen Wirkungsgrad und die dritte Dosis in der Mitte, die gesuchte optimale Dosis (Nebendahl 2000). Zu niedrige oder zu hohe Dosen könnten aufgrund des „Bell-shaped-phenomenon“ biologisch unwirksam sein.

1.8 Ziel der Studie

In dieser Studie soll herausgefunden werden, ob bei ovx-Ratten die Gabe von Ecd einen positiven Effekt auf die Muskulatur hat und somit eine Therapiealternative neben Testosteron und Estrogenapplikation für postmenopausale Frauen zur Verhinderung einer altersabhängigen Sarkopenie darstellt, welche durch das Versiegen von Sexualsteroiden im Alter verstärkt wird. Des Weiteren soll geklärt werden, ob das eventuell anabol auf die Skelettmuskulatur wirkende Ecd eine Herzmuskelfaserzunahme bewirkt und somit ähnlich negative Effekte auf das Herz haben könnte wie bei der Gabe von Sexualsteroiden.

Um diese Ziele zu evaluieren, wurden die Versuchstiere vor und nach jedem Versuch computertomographisch auf muskuläre Veränderungen untersucht. Es wurden nach den Versuchen histologische Schnitte des M. gastrocnemius und des Herzens angefertigt und ausgewertet. Im Rattenserum wurde nach dem Versuch die Konzentration von IGF-1 bestimmt, um den von Báthori vermuteten Zusammenhang zwischen anaboler Wirkung und IGF-1-Erhöhung zu zeigen (Báthori et al. 2008).

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

In dieser Dissertation zeige ich die Resultate und Ergebnisse von zwei voneinander zeitlich getrennten Versuchen. Im ersten Versuch ging es um eine subkutane (s.c.) Gabe der Testsubstanz (28.03.-11.05.2007) in verschiedenen Konzentrationen über einen Zeitraum von vier Wochen. Im zweiten Versuch (06.06.-30.09.2007) wurde die Testsubstanz oral in Pelletform in verschiedenen Konzentrationen für drei Monate lang verabreicht. In beiden Versuchen handelte es sich bei den Versuchstieren um insgesamt 142 weibliche Sprague-Dawley-Ratten (Fa. Winkelmann, Borcheln), 61 Ratten für den ersten und 81 Ratten für den zweiten Versuch. Jeweils sechs Ratten wurden zusammen in einem Makrolonkäfig vom Typ IV (s. S. 71 Abb. 28; Fa. Tenciplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg) gehalten. Diese Käfige befanden sich in den Tierställen der Universitätsmedizin Göttingen. Die Tiere hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu Leitungswasser und Futter.

Bei beiden Versuchen waren zu Versuchsbeginn die Ratten jeweils 3 Monate alt und hatten ein Ausgangsgewicht zwischen 230-270 g. In der Eingewöhnungszeit bekamen die Versuchstiere im Kurzzeitversuch sojafreies Pellet-Futter (V 1355 R-Z, Fa. ssniff, Soest, Deutschland) und im Langzeitversuch sojafreies Pellet-Futter, welches mit der Testsubstanz von der Firma ssniff (s. S. 74 Tab. 9) angereichert wurde. Hierfür wurden die Testsubstanzen in den entsprechenden Mengen zuvor an das Unternehmen gesendet. Lieferant der Substanz 20-OH-Ecdyson war die Firma „Changzhou Dahua Imp.& Exp. Corp. Ltd“, Jiangsu, China. Die SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, USA lieferte β -Estradiol-3-Benzooat zur Produktion von östrogenhaltigem Haltungsfutter.

Die Belichtung des Raumes erfolgte im 12-Stunden-Rhythmus von jeweils 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr durch künstliches Licht. Die Raumtemperatur lag bei 23°C +/- 1°C und die relative Luftfeuchtigkeit schwankte zwischen 50-85 %. Beides wurde mit Hilfe eines Thermo-Hygrometers bestimmt und kontrolliert. Es wurde darauf geachtet, dass die Ratten während des Versuchs unter konstanten Bedingungen und geringen Stressfaktoren, wie Lärm und Personenaufwurf, gehalten wurden.

Das Körpergewicht und der Futterverbrauch wurden in beiden Versuchen seit Ankunft der Tiere jede Woche mit einer Waage kontrolliert (basic lite BL 3, Fa. Sartorius). Um den immensen zeitlichen Aufwand zu bewältigen, betreuten während dieser Versuchszeit insgesamt 6 Studenten, nach einem festen Einteilungsplan, die Tiere. Dabei konzentrierte sich jedoch jeder, dem seinem Thema angestrebten Teilgebiet der Ecdysonversuche. Daher wurden die Daten von den Körpergewichten und den Futteraufnahmen der Ratten in einem

Pool gespeichert. Dieser Datenpool stand somit der kompletten Abteilung zur weiteren Auswertung zur Verfügung (Bein 2010).

2.1.1 Gesetzliche Bestimmungen

Die Genehmigung für beide Tierversuche durch die Bezirksregierung Braunschweig wurde im Vorfeld erteilt (AZ 33.42502-082/06) und unter der Anleitung und Aufsicht von Dr. D. Seidlová-Wuttke in ihrer Funktion als Tierbeauftragte und stellvertretende Leiterin der Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

2.1.2 Ovariectomie und Identifikationssystem

In beiden Versuchen wurden die Ratten nach einer kurzen Eingewöhnungszeit unter Isoflavonnarkose (Forene, Abbott) von Frau Dr. D. Seidlová-Wuttke ovariectomiert (ovx), um eine endogene Östrogenproduktion bei ihnen zu verhindern. Bei dem Narkosegas, welches auch zur quantitativen Computertomographen-Messung (qCT) benutzt wurde, handelt es sich um ein Luft-Isofluran-Gemisch (Forene, Abbott AG, Baar, Schweiz) von 0.4L/min. in Kombination mit 0.2L/min reinem Sauerstoff. Bei Narkoseeinleitung betrug der Isoflurangasanteil 5 Vol.-%. Dieser Anteil wurde zur Erhaltung der Narkose während der Untersuchung der Tiere auf 3,5 Vol.-% reduziert. Als postoperatives Analgetikum wurden den Versuchstieren direkt nach der Narkoseeinleitung jeweils 0,2 ml Rimadyl-Lösung (Rimadyl® gelöst in NaCl im Verhältnis 1:10, Wirkstoff Carprofen) s. c. injiziert.

Zur besseren Identifizierung wurde im Vorfeld bei den narkotisierten Versuchstieren bei der qCT-Untersuchung ein Transponder s. c. unter die Nackenhaut implantiert, bei denen der Transponder-UNO MICRO-ID-System mit ISO-Transponder (Uno-Roesvastaal BV, Zevenaar, Holland) in der Länge von 12mm verwendet wurde. Die Tiere konnten aufgrund des Zahlencodes im Transponder mit Hilfe eines tragbaren Transponderlesegerätes (Gesreader II Ge S008:ISO kompatibler Taschenleser, Fa. UNO ROEVASTAAL BV, Zevenaar, Holland) den einzelnen Gruppen zugeordnet und identifiziert werden.

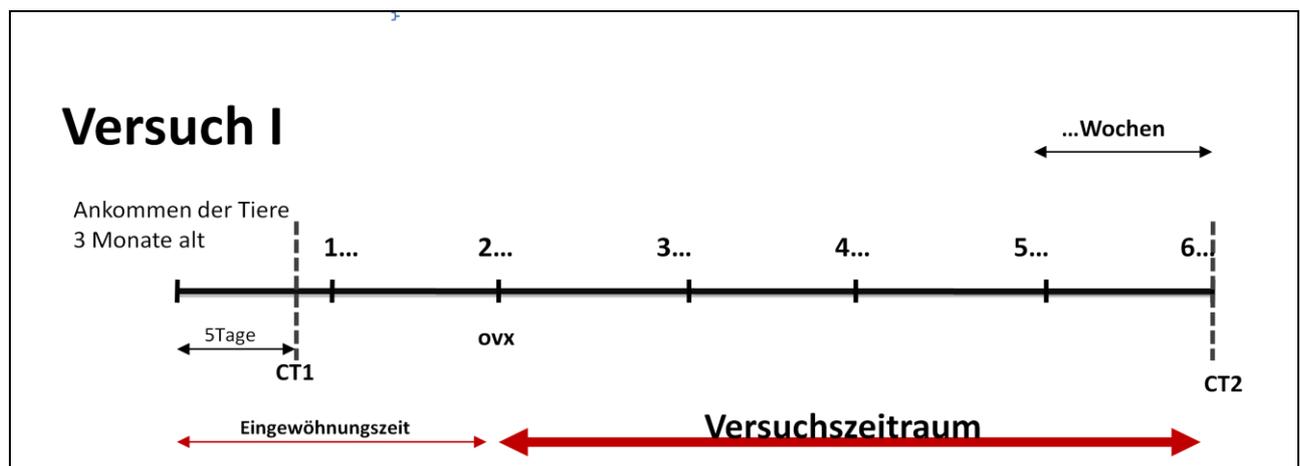
2.1.3 Zeitlicher Ablauf

2.1.3.1 Zeitlicher Ablauf - Versuch I

Bei dem ersten Versuch wurden 61 Ratten am 23.03.2007 geliefert und auf elf Käfige verteilt. Nach fünf Tagen Eingewöhnungszeit wurden die Tiere einer computertomographischen Messung (s. S. 71 Abb. 29; qCT, XCT Research SA, Fa Stratec, Pforzheim, Deutschland) der Tibiametaphyse zur Beurteilung der Knochendichte unterzogen. Hierbei wurde den Tieren

während der Narkose ein ISO-Transponder 12mm s. c. in die Nackenhaut appliziert, um später jedes Tier eindeutig zuordnen zu können. Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns waren die Versuchstiere drei Monate alt. Um eine endogene Östrogenproduktion zu verhindern, wurden die Tiere zwei Wochen nach Ankunft ovx und erneut gewogen, um eine Randomisierung der Tiere im Hinblick auf das Körpergewicht durchführen zu können und die Ratten daraufhin in verschiedene Gruppen gleicher Gewichtsverteilung in Käfigen (Makrolonkäfige vom Typ IV, Fa. Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg) zu verteilen und zu halten (siehe Tabelle 1). Einen Tag nach ovx begann der vierwöchige (30 Tage, Grafik 1) Injektionszeitraum.

Die Tiere wurden für 30 Tage täglich s.c. mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz und einer Kontrollsubstanz behandelt (Dosis siehe Tab. 1). Dabei wurde die Substanz s. c. cranial des M. gluteus maximus injiziert.



Grafik 1 zeitlicher Ablauf Versuch 1

| Gruppe/Käfig | Substanz | Konzentration der Substanz (mg/ml) | Amplifizierte Menge der Testsubstanz (ml) |
|---|------------------------------------|------------------------------------|---|
| Gr. 1/Käfig 1 (6 Tiere) | Benzylbenzoat + Rizinusöl (B+R) | 1:4 | 0,2ml s.c. |
| Gr. 1/Käfig 2 (6 Tiere) | NaCl | 0,9% | 0,2ml s.c. |
| Gr. 2/Käfig 3& 4 (jeweils 6 Tiere) | Östradiol in B+R | 1:4 | 0,2ml s.c. |
| Gr. 3/Käfig 5&6 (jeweils 6 Tiere) | β -Ecdyson in B+R | 2mg/ml | 0,2ml s.c. |
| Gr. 4/Käfig 7&8 (jeweils 6 Tiere) | β -Ecdyson in B+R | 10mg/ml | 0,5ml s.c. |
| Gr. 5/Käfig 9,10&11 (6,4& einmal 3 Ratten) | β -Ecdyson in B+R | 25mg/ml | 0,5ml s.c. |

Tabelle 1 Wirkstoffmengen der Gruppen des Versuchs I (B+R diente der Testsubstanz als Lösungsmittel)

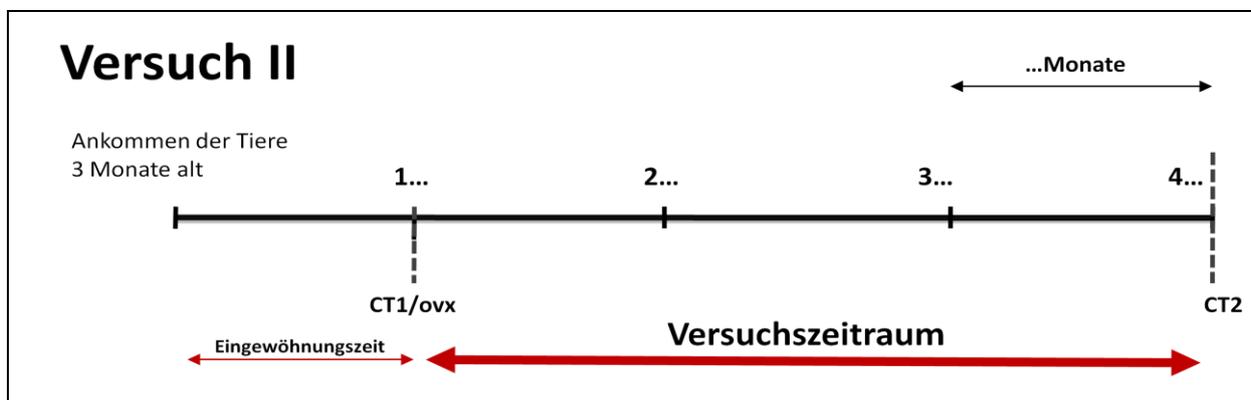
2.1.3.2 Zeitlicher Ablauf - Versuch II

Bei dem zweiten Versuch (Juni-Herbst 2007) wurden 82 Tiere am 05.06.2007 geliefert und auf 14 Käfige verteilt. In der Eingewöhnungszeit bis zum 02.07.2007 erhielten die Tiere sojafreies Pellet-Futter wie im ersten Versuch. Am Ende der Eingewöhnungszeit erfolgte eine qCT-Messung der Tibiametaphyse und der Lumbalregion.

Die Tiere wurden daraufhin nach ihrem Gewicht (in Gramm) erneut randomisiert und auf die einzelnen elf Käfige (Makrolonkäfige vom Typ IV Fa. Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg) verteilt. Unmittelbar nachdem ein Teil der Tiere ovx wurde, begann der Versuch mit einem Futterintervall der unterschiedlichen Test- und Kontrollsubstanzen von drei Monaten (s. Grafik 2). Tabelle zwei (s. S. 28) zeigt die Einteilung der Tiere in ihre Gruppen.

Die Tiere wurden jeweils nach dem ersten, zweiten und dritten Monat sowie am Ende gewogen, wobei die Tibia der Tiere jeweils bei dem ersten und vierten Monat unter Narkose zusätzlich computertomographisch gemessen wurde (CT I und CT II, s. Grafik 2).

Einen Tag nach dieser Messung wurden die Versuchstiere unter CO₂-Narkose dekapitiert und anschließend obduziert. Das Blut wurde gesammelt, gekühlt und das Serum (bei 3000 g für 20 Minuten) abzentrifugiert. Die Herzen, der M. gastrocnemicus sowie weitere Organe für andere Versuche wurden den Tieren entnommen, in Eppendorf-Cups (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) überführt und unmittelbar in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zur weiteren Verarbeitung lagerten die Organe bei -70°C.



Grafik 2 zeitlicher Ablauf Versuch 2

| Gruppe/ Käfig | Art der Gruppe | Substanz im Futter g Testsubstanz/ kg Futter | Futtermittelverbrauch (g/Tier/Tag) | Aufnahme der Testsubstanz (mg/100g KG)[mg/Tier/d] |
|-----------------------------|------------------------------------|--|--|---|
| Gr. 1/Käfig 1&2 (n=6) | Kontrollgruppe, ovx | Sojafrei | 17,32 g | |
| Gr. 2/Käfig 3& 4 (n=6) | Kontrollgruppe, intakte Ovarien | Sojafrei | 15,09 g | |
| Gr. 3/Käfig 5& 6 (n=6) | Ecd, ovx | 1 g | 18,02 g | (6,6 mg) [18,02 mg] |
| Gr. 4/Käfig 7&8 (n=6) | Ecd, ovx | 3 g | 18,86 g | (20 mg) [56,58 mg] |
| Gr. 5/Käfig 9&13 (n=6) | Ecd, ovx | 6 g | 19,30 g | (41,65 mg) [115,8 mg] |
| Gr. 6/Käfig 10&11 (n=6) | E2 | 10 mg | 15,92 g | (0,066 mg) [0,16 mg] |
| Gr. 7/Käfig 12& 14 (n=6) | Ecd, intakte Ovarien | 3 g | 16,16 g | (18,65 mg) [48,48 mg] |

Tabelle 2 **Wirkstoffmengen der Gruppen des Versuchs II**

2.2 Die quantitative Computertomographie (qCT)

Bei sämtlichen Tieren wurden jeweils einen Tag vor Versuchsbeginn und einen Tag vor ihrer Obduktion der Tiere unter Inhalationsnarkose mittels Isofluran in einem quantitativen Computertomographen (qCT, s. S. 71 Abb. 29) die Tibiametaphyse und im Langzeitversuch zusätzlich die Lumbalregion untersucht. Dieser qCT ist speziell zum Messen von Knochendichten und des umgebenden Gewebes bei experimentellen Kleintieren durch gleichzeitige Messung verschiedener Parameter entwickelt worden (XCT Research SA, Fa. Stratec, Pforzheim, Deutschland).

Zur Narkoseeinleitung inhalierten die Tiere das Narkosegas über eine Gesichtsmaske. Das Narkosegas setzte sich aus 0,2 % Luft und 0,2 % reinem Sauerstoff zusammen. Der Anteil an Isofluran in der Luft betrug bei Narkoseeinleitung 5 % und wurde nach Erreichen der Narkose auf 3,5 % während der gesamten Messung minimiert und dauerte im Durchschnitt ca. 12,5 Minuten. Die Narkose war nötig, um störende Bewegungen der Tiere während der CT-Untersuchung zu minimieren. Das jeweils zu scannende Tier wurde in Seitenlage auf einer in der horizontalen Ebene beweglichen Halterung fixiert, welche ct- und computergesteuert bewegt werden konnte.

Bei der Messung erfasst das Gerät die Abschwächung der Röntgenstrahlen beim Durchtritt durch die jeweiligen Körperschichten des Tieres, welches aus einem geometrischen Gitter an

einheitlichen Volumina (Voxel) bestand. Die dadurch gesammelten Informationen einer Schichtaufnahme wurden vom Computer nach dem Messprinzip der gefilterten Rückprojektion integriert. Hierbei erreichten die nicht absorbierten Strahlen einen Detektor, der die Strahleninformationen in elektrische Impulse konvertierte und diese an einen Personal Computer (PC) übermittelte. Dieser wiederum konnte nun die Röntgenabsorption eines jeden Voxels der aufgenommenen Schicht berechnen und erstellte aus diesen Werten das CT-Bild (Ferretti 1999; Roldán et al. 2001). Die so ermittelten Dichteunterschiede ergaben ein farblich codiertes Rasterbild, in dem verschiedene Gewebetypen anhand unterschiedlicher Graustufen differenziert werden konnten.

Bei beiden Versuchen erfolgte die qCT-Messung der Tibiametaphyse und zusätzlich im Langzeitversuch die qCT-Messung der Lumbalregion.

Vor jeder Messung wurde ein Linearscan durchgeführt, um die Referenzlinie auf die Epiphysenfuge zu setzen und die korrekte Lage des Tieres zu bestimmen. Dieses befand sich in einer speziellen, bereits oben erwähnten Haltevorrichtung in Seitenlage. Die linke Extremität wurde in einen Trichter eingespannt und extern am Trichterende mit einer Klemme fixiert. Ausgehend von der beschriebenen Referenzlinie erfasste das CT-Gerät bei jeder Messung drei weitere Schichten im Abstand von jeweils 3,75 mm, 4,75 mm und 15 mm distal des Referenzwertes (Slice 1, 2 und 3, s. Abb. 4-6 S. 30). So konnte die Fläche der Tibiametaphyse und des paratibialen Fettdepots stets in gleicher Höhe bestimmt werden. Jede Messung dauerte im Schnitt 7-8 Minuten. Während der qCT-Messung der Lumbalregion im zweiten Versuch befanden sich die Versuchstiere in einer speziell für diese abdominale Messung zugeschnittenen Sterilplastikflasche in Rückenlage. Beim ersten Linearscan einer Messung wurde die Referenzlinie anhand eines Laserstreifens außerhalb des Beckens auf Höhe des vierten und fünften Lendenwirbelkörpers gesetzt. Zu beachten ist hier der Unterschied zu der menschlichen Wirbelsäule. So besitzt die Ratte fünf Lendenwirbelkörper, von denen der Fünfte (L5) noch innerhalb des Beckens liegt. Ausgehend von dieser Position erfasste das Gerät zwei weitere Schichten im Abstand von 1 mm cranial und caudal der Referenzlinie. Diese abdominale Messung dauerte ca. 14 Minuten. Ein von dem Hersteller des qCT mitgeliefertes Programm (XCT 5.40, Fa. Stratec/Norland Medizintechnik GmbH, Pforzheim) ermöglichte die quantitative Auswertung der trabekulären und kortikalen Knochendichte sowie die Bestimmung des Körper- und des dreieckig geformten Fettdepots aufgrund von verschiedenen, fest definierten Graustufen der Messungen. Für das untersuchte Fettgewebe wurde eine Schwelle mit einem Dichtewert von 0-40 mg/cm³ festgelegt, um es anhand dieser charakteristischen Absorptionswerte gegen andere Weichgewebearten abgrenzen zu können (s. Abb. 5 S. 30).

Mit dem Befehl „region of interest (ROI)“ wurde das zu untersuchende Gewebe eines Schnittes von den anderen Strukturen abgegrenzt. Die daraus ermittelten Einheiten des Fettanteils wurden in mm² angegeben. Der Befehl Loop überführte die Daten aus XCT 5.40 in das Programm Excel (Microsoft Windows XP). Aus diesen Werten konnte man durch die Bildung der Differenz zwischen Gesamtquerschnitt, dem Fettdepot und dem Knochenumfang die Muskelmasse des untersuchten Slice bestimmen.

Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden mit „one-way-ANOVA“ und einem Ausschlusstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft, p-Werte < 0,05 wurden als signifikant bewertet (Prism™ GraphPad, San Diego, USA).

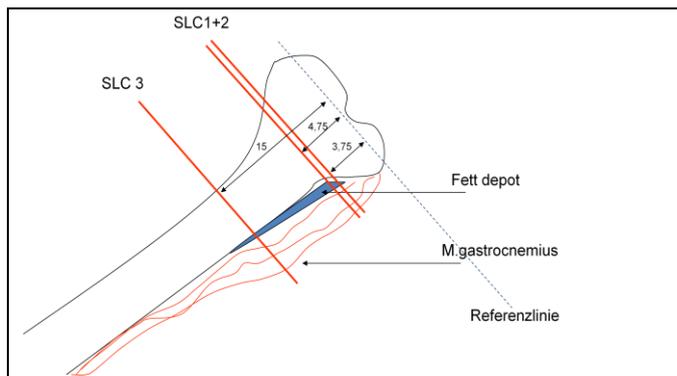


Abb.4 Schematische Darstellung der verschiedenen geschnittenen Slices

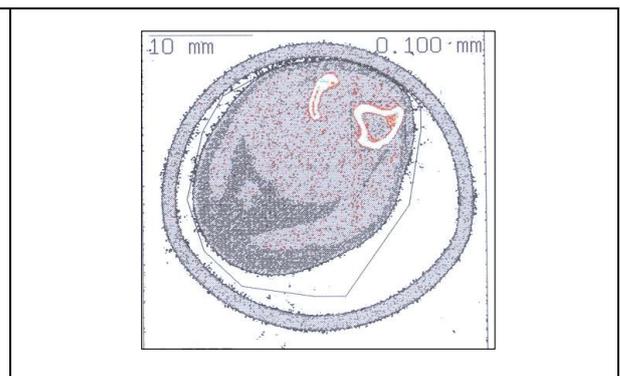


Abb.5 Typischer CT-Scan durch die mittlere der drei Ebenen

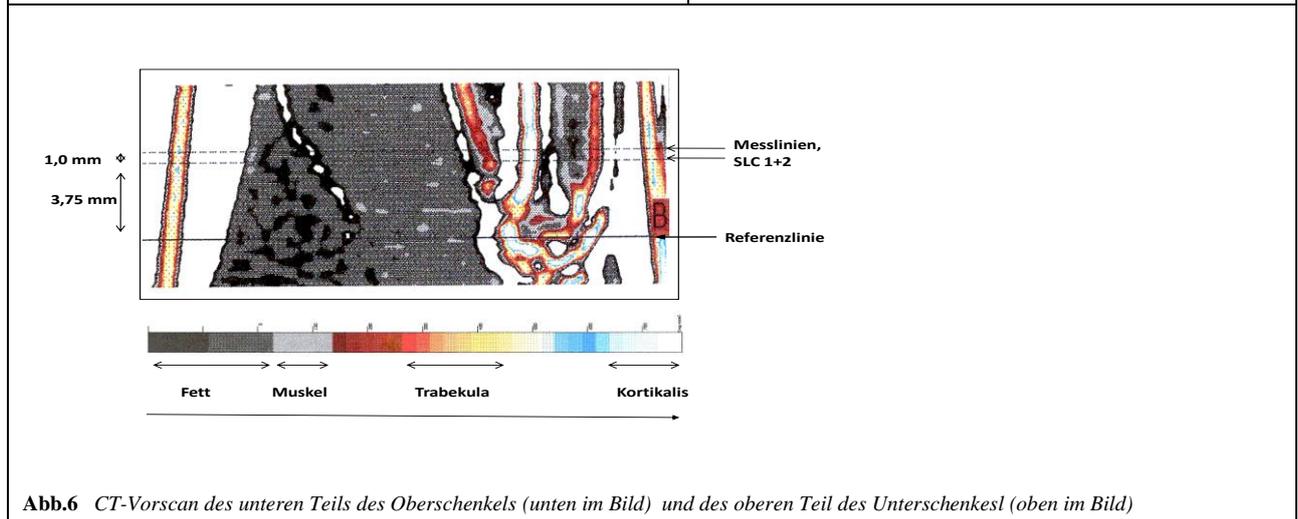


Abb.6 CT-Vorscan des unteren Teils des Oberschenkels (unten im Bild) und des oberen Teil des Unterschenkels (oben im Bild)

2.3 Organhistologie

Die Organe/Muskel der Tiere wurden sofort nach der Obduktion (s. S. 71 Abb. 30/31) zu einem Teil in flüssigen Stickstoff für die DNA-Gewinnung eingefroren und zu einem anderen Teil in 10%igem Formalin zum Herstellen von histologischen Präparaten konserviert.

Zur Herstellung der histologischen Präparate wurden die Organe/Muskel der Abteilung entwässert und fixiert. Dazu wurden die in Einbettkästen aufbewahrten Schnitte mit Hilfe

einer Zitadelle (Leica TP 1020, V 2,0, Ordernr. 070430101, Herstellung 03/98) nacheinander in verschiedene Alkohol-, Xylol- und Paraffinlösungen getaucht. Die aufsteigende Alkoholreihe diente zur Entwässerung, das Paraffin zur Stabilisierung des Herzens und des Muskels (vorgenommen durch eine Mitarbeiterin der Abteilung, s. S. 72 Tabelle 4).

Die Einbettkästen wurden, nachdem sie aus der Zitadelle kamen, bis zur endgültigen Fixierung in einem Wärmeschrank (Fa. Schütt Labortechnik, GFL 7601) aufbewahrt. Nacheinander wurden die vorbehandelten Organteile in einen Paraffinblock gegossen und erneut eingefroren.

Die mindestens 24 Stunden tiefgefrorenen Organ- und Muskelblöcke wurden zum Erstellen der histologischen Schnitte mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica m®Model RM 2135 Fabriknr. 2794/10.2000, Kat.-Nr.: 050029802) in Schichten von drei µm Dicke geschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht. Im Anschluss daran wurden sie einer Hämatoxin/Eosin-Färbung (HE, s. S. 73 Tab. 5) unterzogen. Diese bestand aus einer absteigenden Alkoholreihe, der eigentlichen Färbung und einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die gefärbten Präparate bzw. Schnitte konnten nun mit Hilfe eines Zeiss-Axiophot-Mikroskops (Fa. Zeiss, Leica Microsystem, Nussloch GmbH, Deutschland) morphologisch ausgewertet werden.

Dabei wurden die Schnitte mit einer am Mikroskop befindlichen Kamera je nach Muskelart (ob Skelett- oder Herzmuskulatur) bei einer bestimmten Vergrößerung auf einen 64 ASA/19°-Film aufgenommen (s. Abb. 7-8 und s. S. 73 Tabelle 6). Je gewonnenem Bild und dazu gehörenden Vergrößerung war es möglich, mit dem Programm *analySIS*® 3.0 die Muskelquerfläche von den jeweiligen Muskelarten mit Hilfe von farbigen Umrandungen der Faszikelquerfläche zu bestimmen, zu berechnen und auszuwerten (s. S. 73 Tabelle 6). Die somit gewonnenen Werte aus der H&E-Messung wurden in eine Excel-Tabelle (Microsoft Office 2003) übertragen und zur genaueren statistischen Auswertung in das Programm Prism4 überführt.

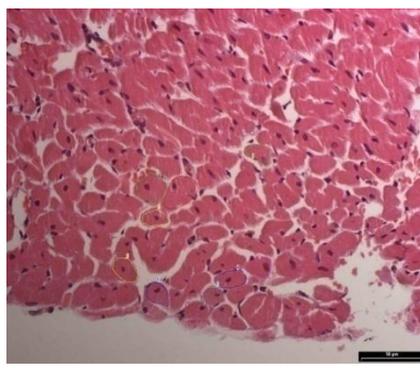


Abb.7- 8

Foto histologischer Muskelschnitte in H&E-Färbung

Links: Skelettmuskelfasern der Gruppe Ecd 3 mg, ovx

Rechts: Herzmuskelfasern der Gruppe Ecd 3 mg ovx

2.4 Statistische Methoden

Die Werte für die Statistik wurden mit dem bereits erwähnten Computerprogramm Graph Pad Prism4 (Prism™ GraphPad, San Diego, USA) erhoben und berechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Anwendung einer Varianzanalyse für wiederholte Messungen eines Faktors (ANOVA) und anschließendem Dunnett-Test. Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen wurden mit „one-way-ANOVA“ und einem Ausschlusstest nach Dunnett auf Signifikanz getestet. Die Daten wurden als Means \pm Standardfehler (SEM) grafisch dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Futteraufnahme

Während der Versuche wurde der Futterkonsum pro Käfig zu Beginn jeder Behandlungswoche im Kurzzeitversuch und zweimal wöchentlich im Langzeitversuch für jeden Käfig mit einer Waage gemessen und dokumentiert. Anhand des gemessenen Futtermittels der Tiere in einem Käfig pro Woche konnte für jede Behandlungsgruppe der durchschnittliche Futtermittels eines Tieres pro Tag berechnet werden.

3.1.1 Versuch I – Futteraufnahme

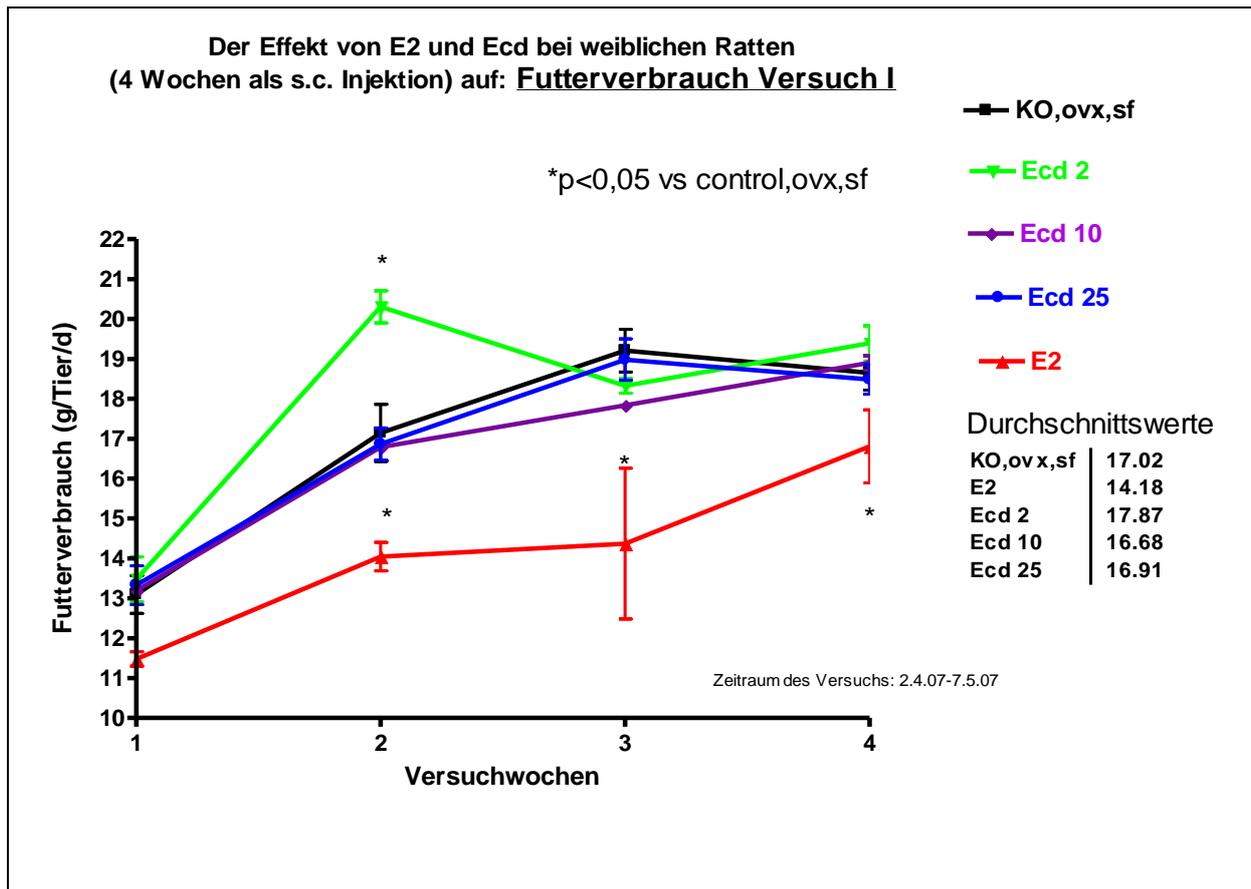


Abb. 9: Durchschnittlicher Futtermittels der jeweiligen Behandlungsgruppen (g/Tier/d).

Die Gruppe *E2* nahm während des ersten Versuchs durchschnittlich 14 g/Tier/d zu sich. Schon nach einer Behandlungswoche wurde deutlich, dass der Futtermittels der Gruppe *E2* geringer als bei den anderen Behandlungsgruppen war. Die Gruppen *KO* und die *Ecd*-Gruppen zeigten bezüglich ihres Futtermittels mit einer durchschnittlichen Futteraufnahme von 17,5 g/Tier/d einheitliche Tendenzen. Somit lag bei den *Ecd*-Gruppen und der Gruppe *KO* der Futtermittels durchschnittlich um 3,5 g höher als bei der Gruppe *E2*. Alle

Versuchsgruppen konnten ihren Futterkonsum innerhalb der vier Wochen erhöhen. Die Gruppe *E2* steigerte ihren durchschnittlichen Futterkonsum um 5 g/Tier/d auf durchschnittlich 17 g/Tier/d, die *Ecd*-Gruppen und die *KO*-Gruppe auf bis zu 19,6 g/Tier (s.Abb. 9).

3.1.2 Versuch II – Futteraufnahme

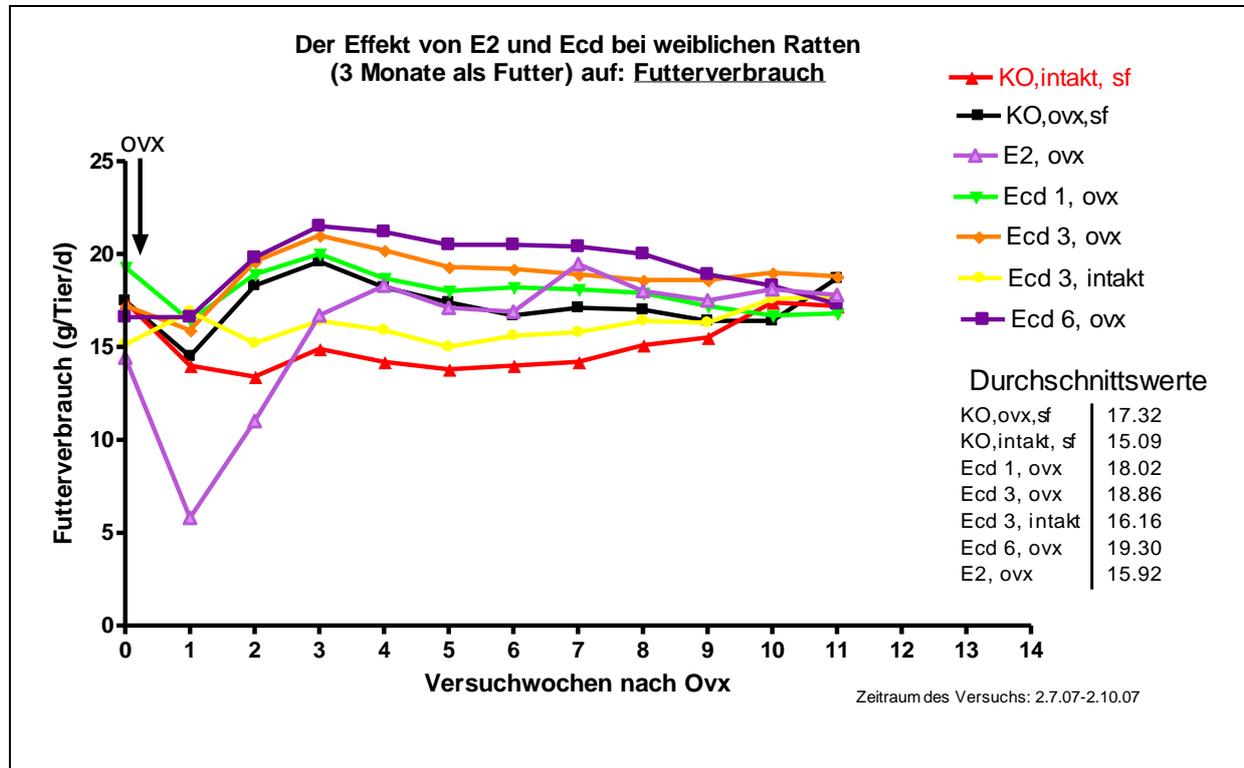


Abb. 10: Durchschnittlicher Futterkonsum der jeweiligen Behandlungsgruppen (g/Tier/d).

Der Futterverbrauch der verschiedenen Behandlungsgruppen wurde im zweiten Versuch mit einer ovariectomierten (*ovx*) und einer Kontrollgruppe (*KO*) verglichen.

Nachdem die *E2*-Gruppe nach *ovx* einen deutlich geringeren Verbrauch von Futter aufwies als die anderen Behandlungsgruppen, konnten sie ihren Futterkonsum während des Langzeitversuches, auf mit den anderen Versuchsgruppen vergleichbare Werte steigern. So näherten sich alle Gruppen am Ende der dreimonatigen Versuchsdauer einem durchschnittlichen Futterkonsum von 16 – 17,3 g/Tier/d an. Die Gruppe *Ecd 6* mit einer über den gesamten Versuchszeitraum gemittelten Futteraufnahme von 20 g/Tiere/d war die Gruppe mit der höchsten Futteraufnahme, gefolgt von den Gruppen *Ecd 3 ovx*, *Ecd 1* und *KO*. Die *KO intakt*-Gruppe hatte mit durchschnittlich 15 g/Tier/d am wenigsten Futter zu sich genommen (s. Abb.10 (Bein 2010) + Abb.11).

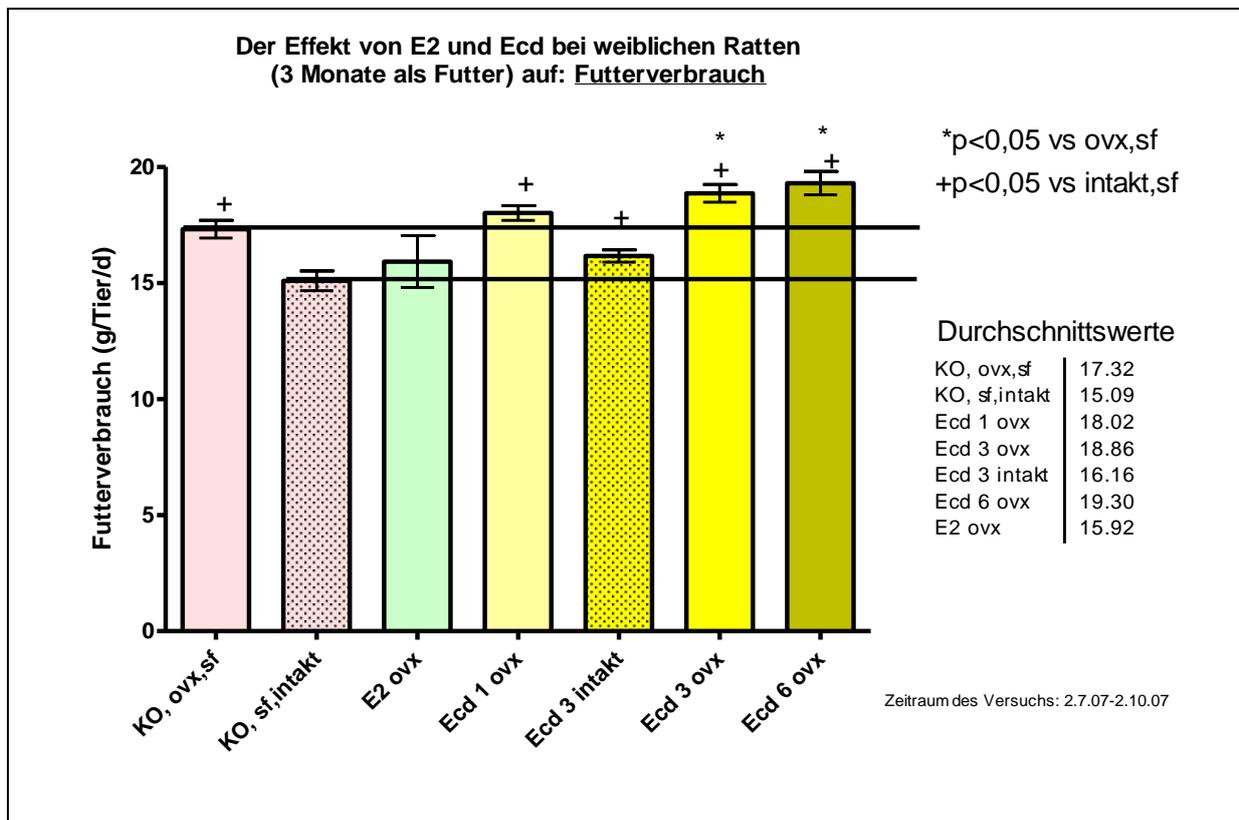


Abb. 11: Durchschnittlicher Futterkonsum der jeweiligen Behandlungsgruppen (g/kg Futter).

Bei Betrachtung der Abb. 10 und 11 wird ersichtlich, dass die physiologisch normalen Tiere, also die Gruppe *KO intakt*, signifikant weniger und die Gruppen *Ecd 3* und *Ecd 6* signifikant mehr Futter zu sich genommen haben als die Gruppe *KO*. Alle Tiere, die mit *Ecd* behandelt wurden, haben signifikant mehr Futter konsumiert im Vergleich zur Gruppe *KO intakt*.

3.2 Rattenkörpergewichte

3.2.1 Versuch I - Rattenkörpergewichte

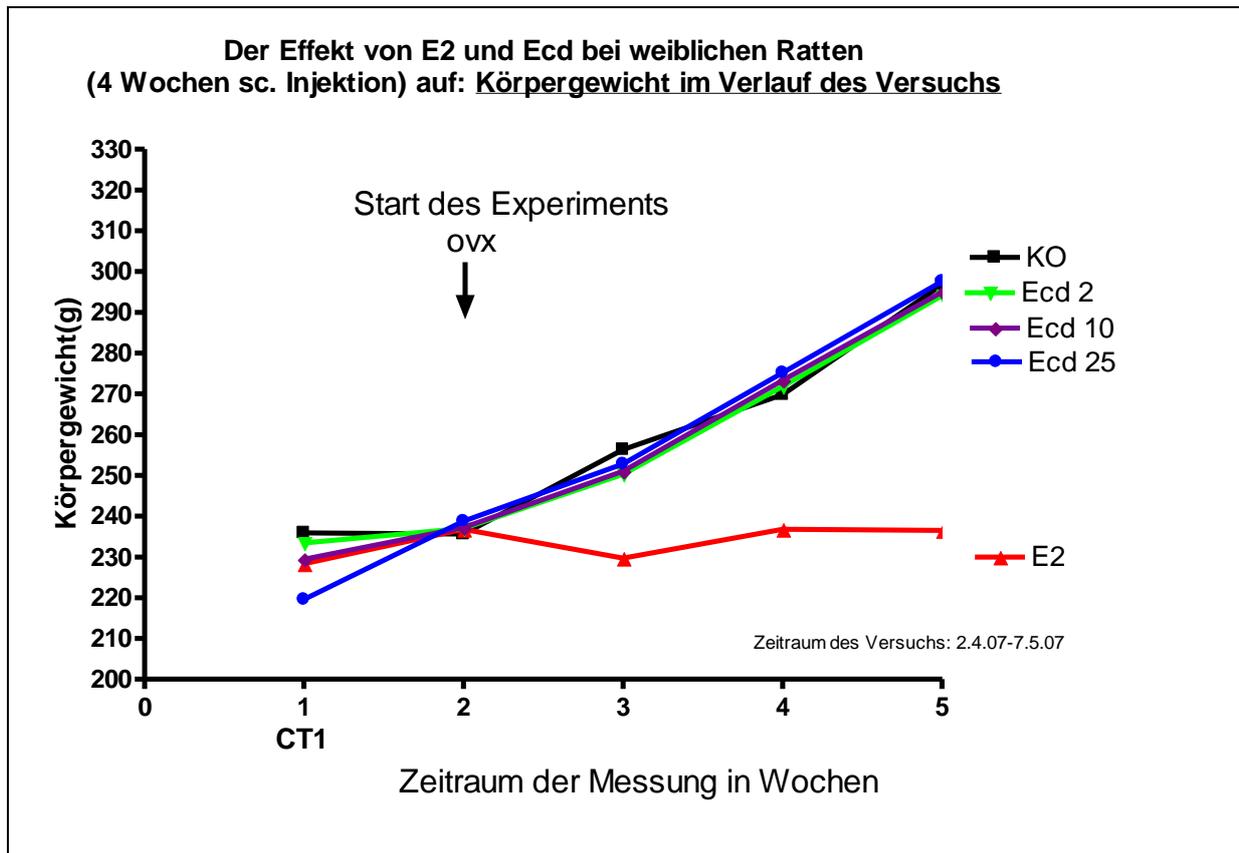


Abb. 12: Durchschnittliche Körpergewichtszunahme der jeweiligen Behandlungsgruppen (g/ Tier/).

Vor Versuchsbeginn bestanden signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (*Ecd. 25* vs. *KO*). Die Randomisierung vor Versuchsbeginn wurde orientierend am Körpergewicht durchgeführt, um relevante Unterschiede der Versuchsgruppen vor Applikation der Testsubstanz zu verhindern.

Im Vergleich zur *Ovx-Kontrollgruppe (KO)* war der ausbleibende Anstieg des Körpergewichts bei der *E2-Gruppe* schon nach der ersten Behandlungswoche signifikant. Ihr Körpergewicht zu Versuchsende unterschied sich mit der Zunahme von durchschnittlich 7,5 g kaum vom durchschnittlichen Gewicht der Tiere vor Versuchsbeginn. Die *KO* steigerten ihr Körpergewicht um durchschnittlich 77 g. Das Körpergewicht der *Ecd-Gruppen* verhielt sich ähnlich wie das der *KO*. Sie erreichten unabhängig von der applizierten Konzentration ein durchschnittliches Gewicht von 292 – 296 g (s. Abb. 12).

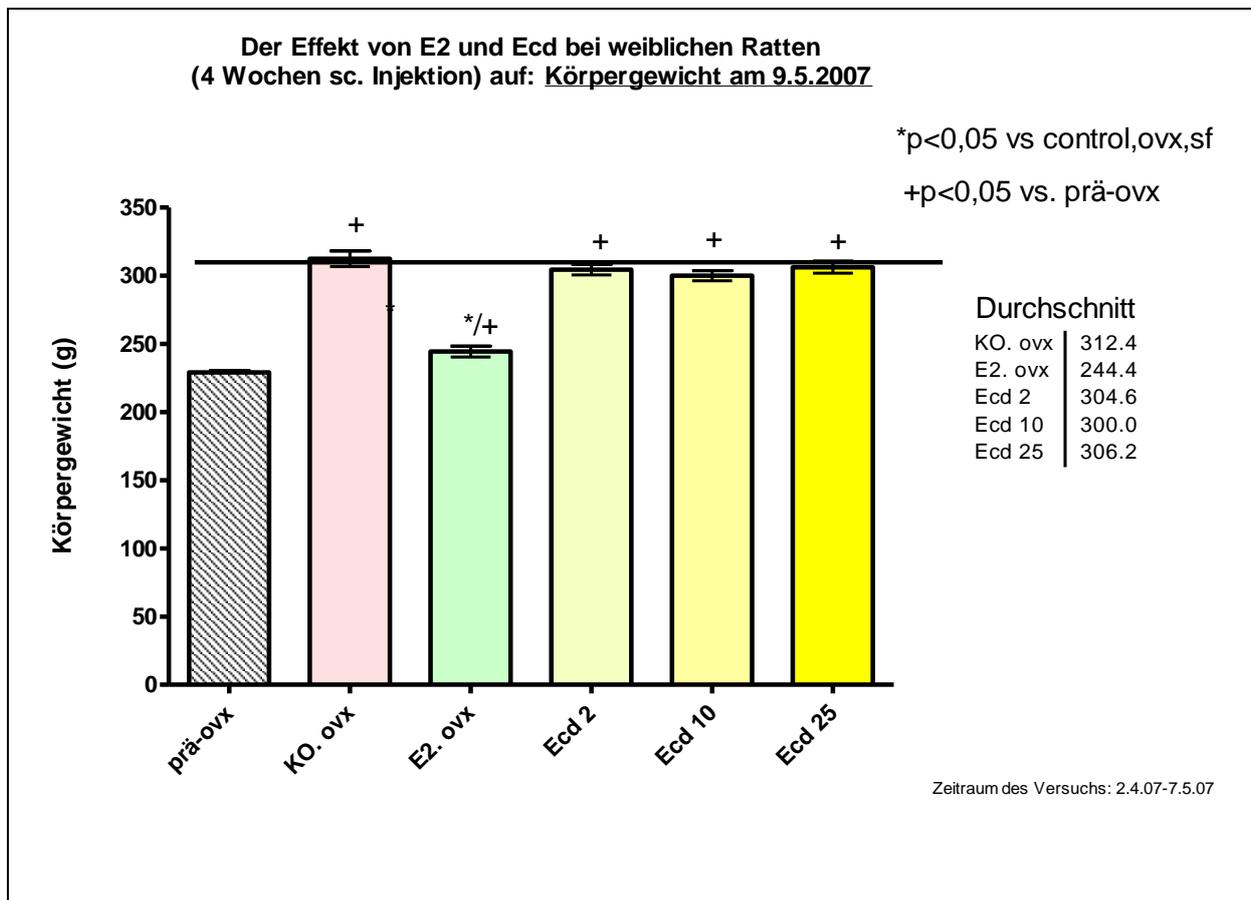


Abb. 13: Durchschnittliches Körpergewicht der jeweiligen Behandlungsgruppen (g/Tier).

Beim ersten Versuch betrug das durchschnittliche Körpergewicht aller Tiere zu Versuchsbeginn 229 g. Die Abbildung 13 zeigt, dass nach vierwöchiger s.c. Applikation der Testsubstanz die Gruppe *KO ovx* und alle *Ecd* behandelten Tiere (*Ecd 2*, *Ecd 10*, *Ecd 25*) ihr Körpergewicht am stärksten gegenüber dem Ausgangsgewicht erhöhen konnten. Die Kontrolltiere (*KO*) nahmen am meisten zu und erreichten ein durchschnittliches Körpergewicht von 312,4 g. Dies entspricht durchschnittlich 134 % ihres Ausgangsgewichts. Die mit Östradiol (*E2*) behandelten Tiere nahmen signifikant weniger an Gewicht zu als die Kontrolltiere. Sie hatten nach vierwöchiger Applikationszeit ein Körpergewicht von 244,4 g und somit ihr Ausgangsgewicht mit einer Zunahme von 6 % kaum verändert.

3.2.2 Versuch II – Rattenkörpergewichte

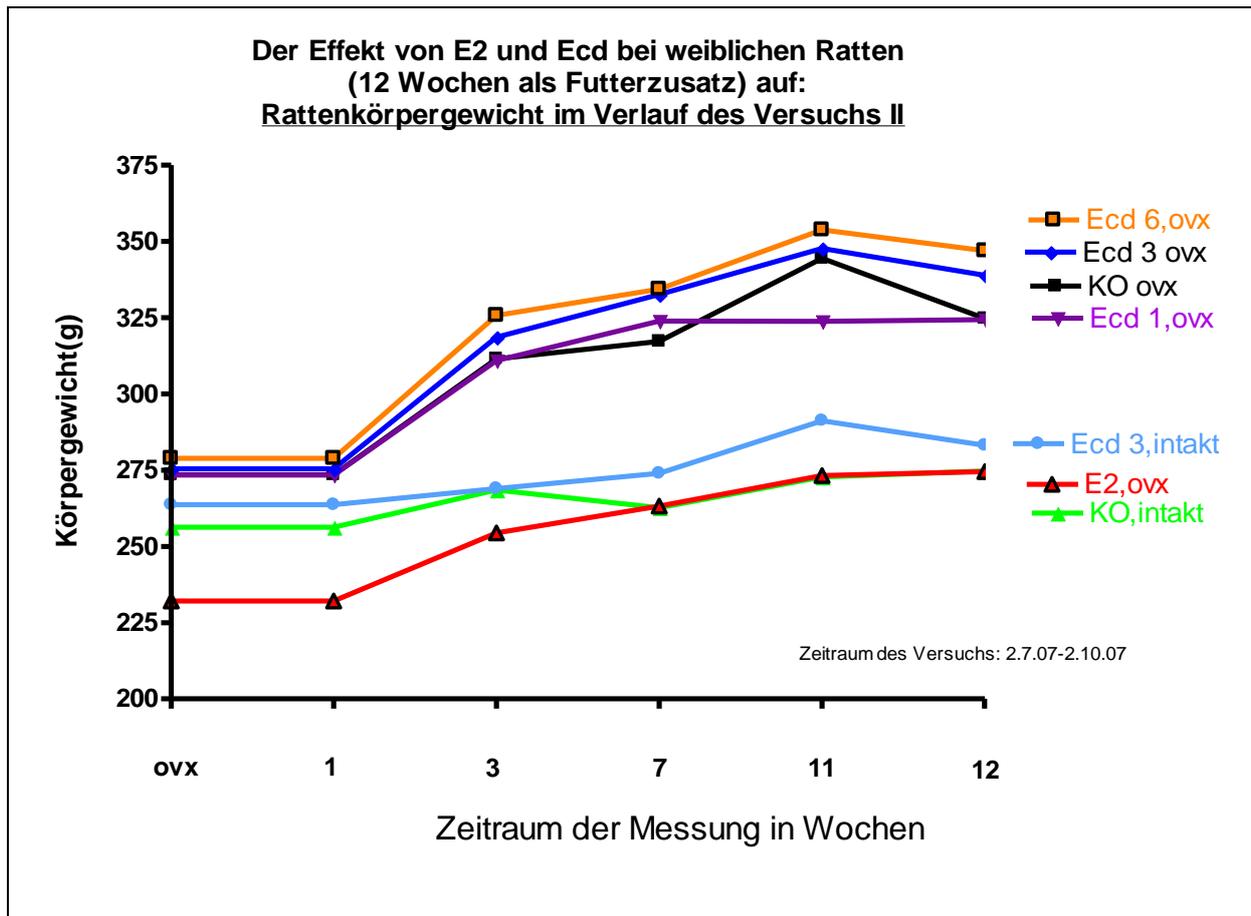


Abb. 14: Durchschnittliche Körpergewichtszunahme (g) der jeweiligen Behandlungsgruppe (g/kg Futter Tier).

Die Gruppe *KO* steigerte ihr Körpergewicht während des zweiten Versuchs, ähnlich wie bei dem ersten Versuch, um durchschnittlich 71,5 g auf durchschnittlich 325 g. Die *Ecd*-Gruppen zeigten ähnliche Tendenzen. Die Gruppe *E2* besaß bei allen Körpergewichtsbestimmungen nach *Ovx* ein signifikant niedrigeres Körpergewicht als die Gruppe *KO*. Zum Zeitpunkt der *Ovx*. betrug das Körpergewicht der Gruppe *E2* durchschnittlich 262 g und nach den 12 Behandlungswochen durchschnittlich 12,5 g mehr. Somit hatte diese Gruppe ihr Ausgangsgewicht nicht wesentlich verändert. Das Körpergewicht der intakten Tiere (*KO, intakt*) verhielt sich ähnlich dem der Gruppe *E2*, ab Versuchswoche sieben decken sich die linearen Graphen beider Gruppen.

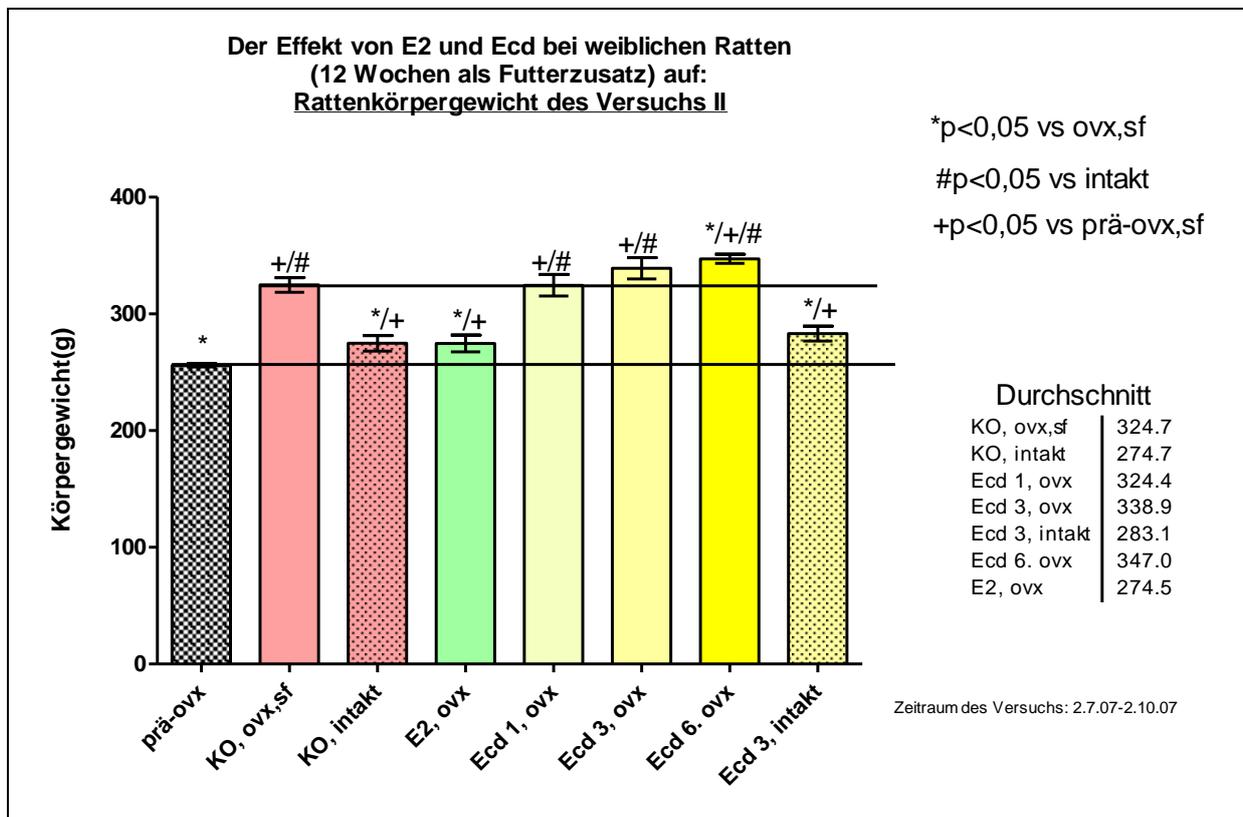


Abb. 15: Durchschnittliches Körpergewicht (g) der jeweiligen Behandlungsgruppen (g/kg Futter).

Alle behandelten Gruppen im zweiten Versuch konnten ihr Körpergewicht signifikant gegenüber dem durchschnittlichen Ausgangsgewicht aller Tiere vor dem Behandlungsintervall (*prä-ovx.*) erhöhen.

Die *Ecd 6-Gruppe* steigerte ihr Körpergewicht am stärksten und besaß am Ende des Versuches ein Körpergewicht von 347 g. Diese Körpergewichtszunahme war deutlich höher als bei der *KO-Gruppe*.

Die *Gruppe KO intakt* sowie die *Gruppe E2* hatten ein signifikant niedrigeres Körpergewicht als die *Gruppe KO*. Das Körpergewicht der intakten Tiere betrug am Ende des Versuchs 274,7 g, vergleichbar mit dem Körpergewicht der *Gruppe E2* von 274,5 g. Alle anderen Versuchsgruppen hatten zu Versuchsende ein deutlich höheres Körpergewicht als die intakten Tiere (s. Abb. 15).

3.3 Rattenherzgewichte

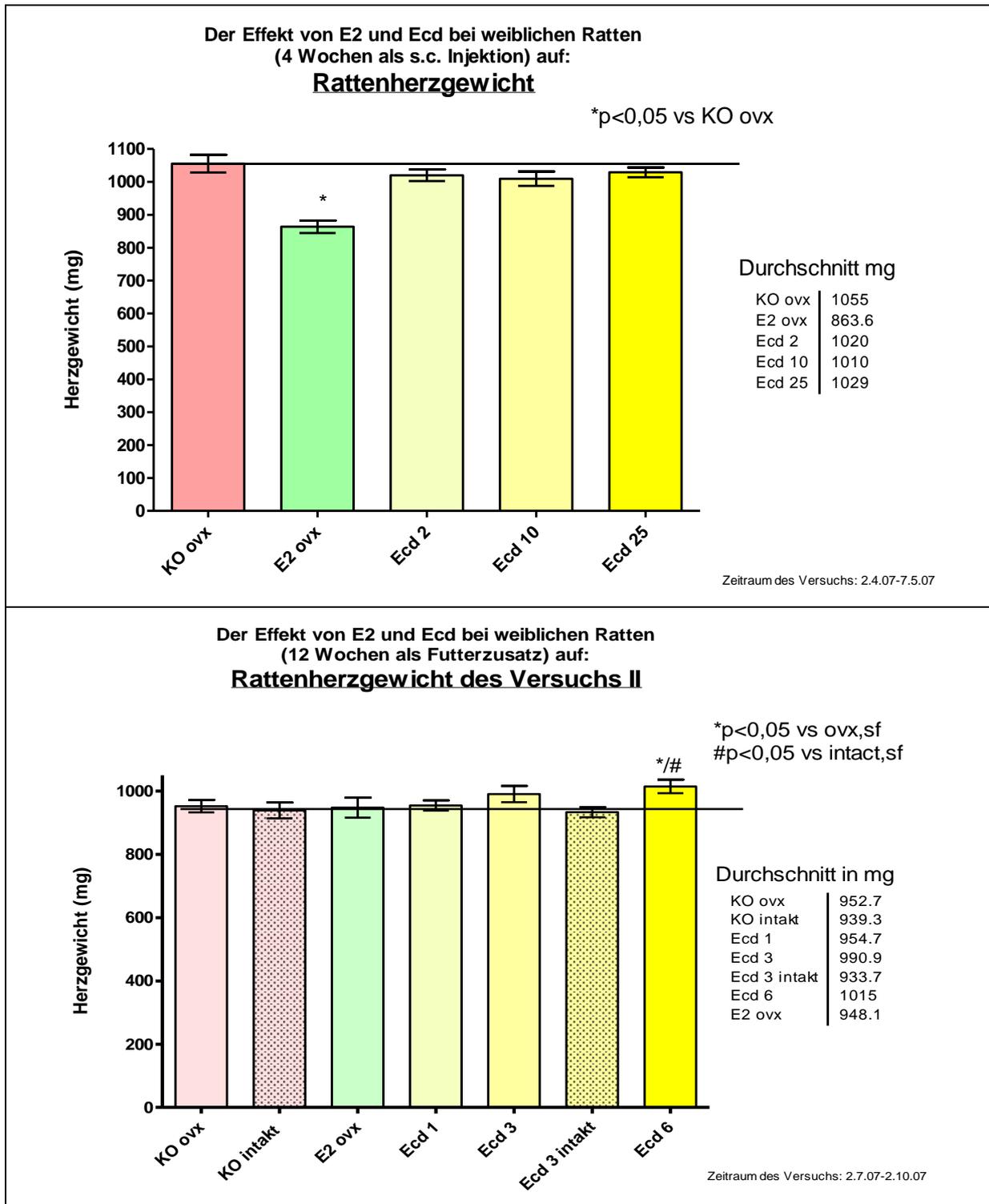


Abb. 16: Durchschnittliche Herzgewichte (g) der jeweiligen Behandlungsgruppen (mg/ml s.c Tier/d) im Versuch I und Versuch II (g/kg Futter).

Im Versuch I zeigte sich keine signifikante Zunahme zur *KO ovx sf* des Gewichts der Herzen bei den Tieren, die mit *Ecd* behandelt wurden. Eine starke Abnahme des Herzgewichts gibt es lediglich bei der *E2-Gruppe* im Vergleich zur *KO ovx sf-Gruppe* (s. Abb.16)

Im Versuch II zeigte sich keine deutliche Veränderung der *E2-Gruppe* im Vergleich zur *KO ovx sf-Gruppe*. Bei diesem Versuch wird aber eine signifikant leichte Erhöhung des Rattenherzgewichts der *Ecd 6-Gruppe* gegenüber der *KO ovx* deutlich, während die Gruppen der anderen *Ecd-Gruppen* keinen signifikanten Unterschied aufwiesen (s. Abb. 16).

3.4 CT – Auswertung

3.4.1 Versuch I – Tibia

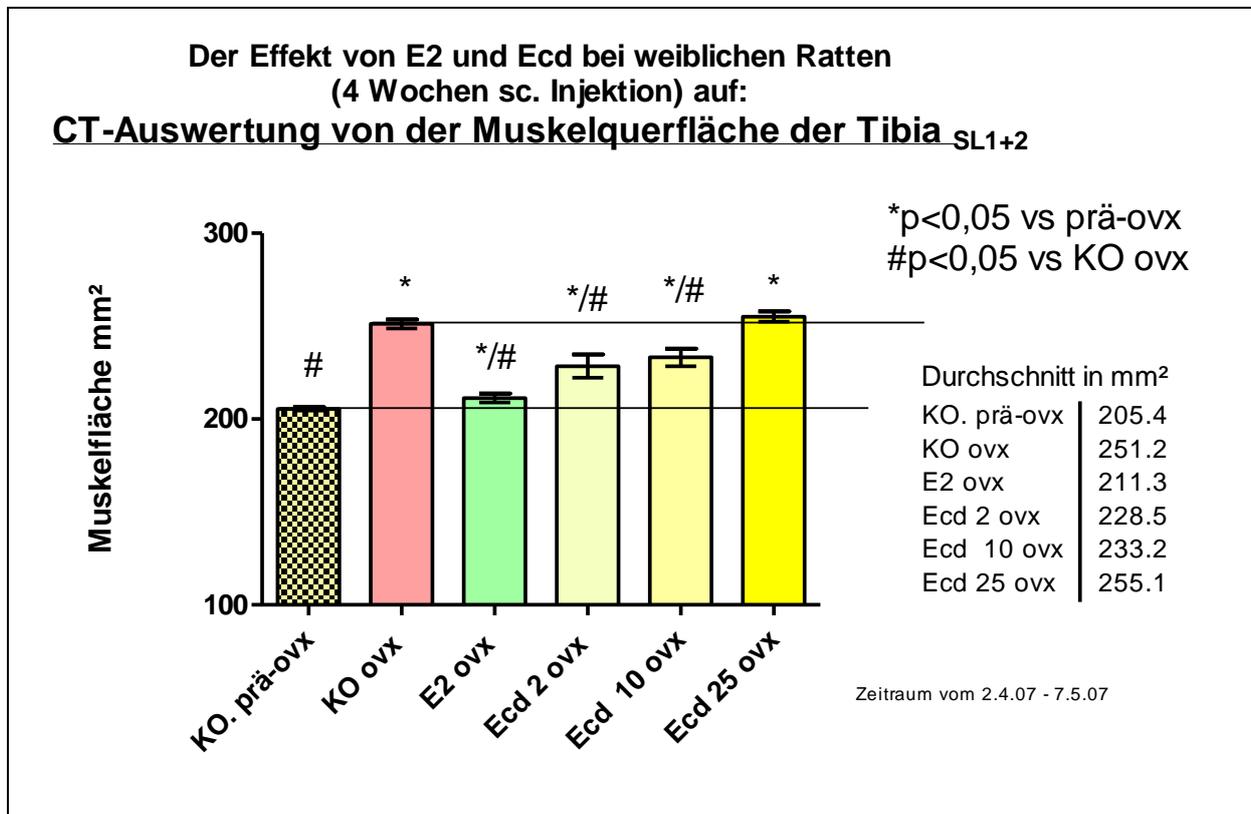


Abb. 17 Durchschnittliche Muskelgröße der jeweiligen Behandlungsgruppen in mm² (mg/ml s.c.Tier/d), sowohl vor dem Versuch (prä-ovx) als auch nach dem Versuch

Bei der Computertomographie zum Zeitpunkt vor der ovx (*KO prä-ovx-Gruppe*) vor dem Versuchsbeginn des ersten Versuchs sah man eine gleichmäßige Verteilung der Tiere in den verschiedenen Gruppen. In der CT-Messung der Tiere vier Wochen nach Versuchsende ergab sich jedoch ein gewisser Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen und den Muskelgrößenzunahmen in der Tibia. Während die *Gruppe E2* nur eine geringe signifikante Zunahme der Muskelgröße von +2,87 % aufwies, zeigten sich jedoch in allen anderen Gruppen deutlich signifikante Zunahmen der Muskelquerfläche im Vergleich zu dem Wert *KO prä-ovx*. Am deutlichsten ergab sich für die *Gruppe KO ovx* mit +22,29 % und die *Gruppe Ecd 25 ovx* mit +24,09 % eine Zunahme der Muskelquerfläche in Bezug auf ihren Ausgangswert. Des Weiteren haben die Tiere der *Gruppen E2, Ecd 2 ovx und Ecd 10 ovx* nach dem ersten Versuch im CT nach Versuchsende im Vergleich zur *KO ovx-Gruppe* einen

signifikant geringeren Anteil an Muskelmasse in der Tibia. Lediglich die *Gruppe Ecd 25 ovx* hatte eine, wenn auch nicht signifikant geringere Zunahme um +1,47 % gegenüber der *KO ovx-Gruppe* (s. Abb. 17).

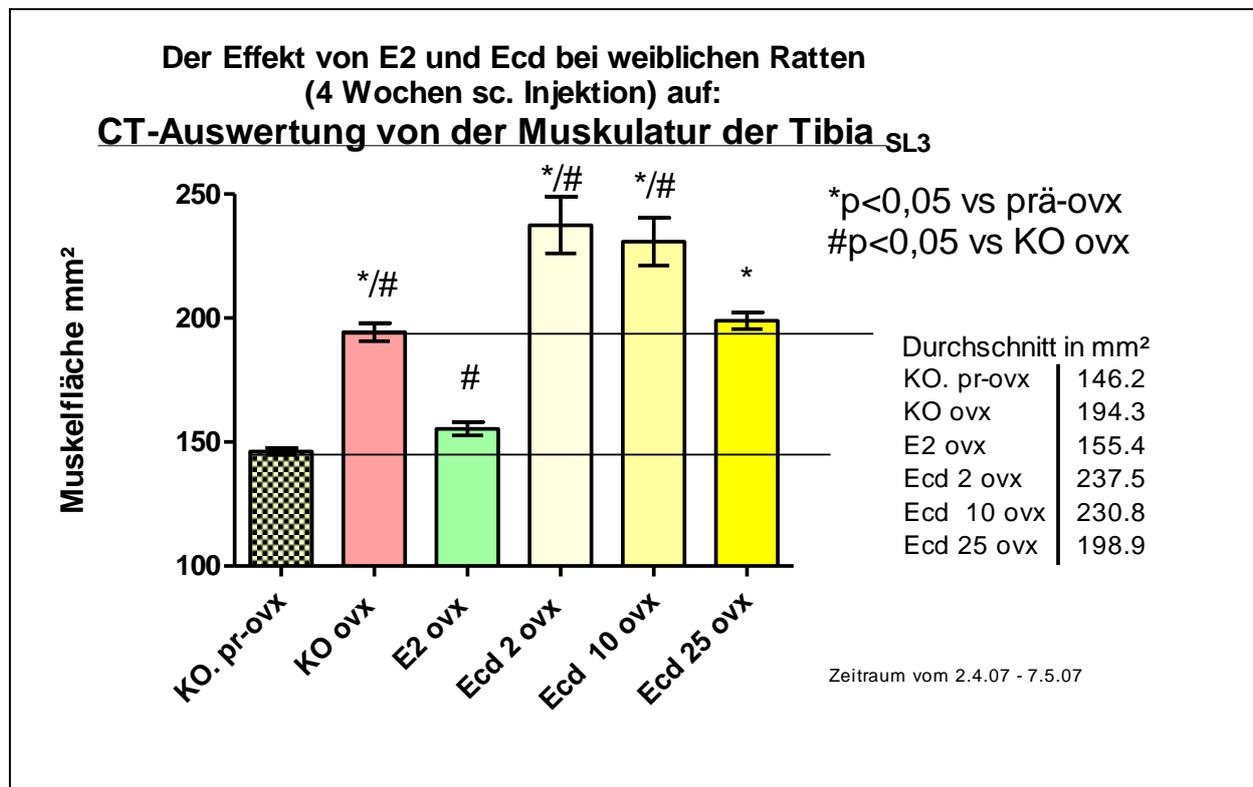


Abb. 18: Durchschnittliche Muskelfläche in mm² auf Höhe der Tibia der jeweiligen Behandlungsgruppen (mg/ml s.c.Tier/d) sowohl vor dem Versuch (prä-ovx) als auch nach dem Versuch nur vom SL3 des CTs.

Wie bei der Auswertung der Muskelquerfläche im SL1+2 des ersten Versuchs, so bestand auch in der Auswertung des SL3 bei der *prä-ovx* CT-Messung der Gruppe vor Versuchsbeginn eine gleichmäßige Verteilung der Tiere in den verschiedenen Gruppen. In der CT-Messung der Tiere vier Wochen nach Versuchsende zeigte sich jedoch erneut ein gewisser Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen und den Muskelflächenzunahmen in der Tibia. Während die *Gruppe E2* nur eine geringe signifikante Zunahme der Muskelfläche aufwies, ergaben sich jedoch in allen anderen Gruppen deutlich signifikante Zunahmen der Muskelquerfläche im Vergleich zu dem Wert *prä-ovx*. Am deutlichsten zeigten die Gruppen *Ecd 2 ovx* mit +62,44 % und die *Gruppe Ecd 10 ovx* mit +57,86 %, sowie die *Gruppe Ecd 25 ovx* mit +36,04 % und die *Gruppe KO ovx* mit +32,9 % eine Zunahme der Muskelquerfläche in Bezug auf ihren Ausgangswert. Des Weiteren weisen die Tiere nach dem Ende des ersten Versuchs im CT der Gruppen *Ecd 2 ovx* um +22,23 % und *Ecd 10 ovx* um +18,78 % einen signifikant höheren Anteil der Muskelmasse in der Tibia auf als im Vergleich dazu die *KO ovx-Gruppe*. Lediglich die *Gruppe E2 ovx* hatte eine gering signifikante Abnahme um -20,02 % gegenüber der *KO ovx-Gruppe* (s. Abb. 19).

3.4.2 Versuch II – Tibia

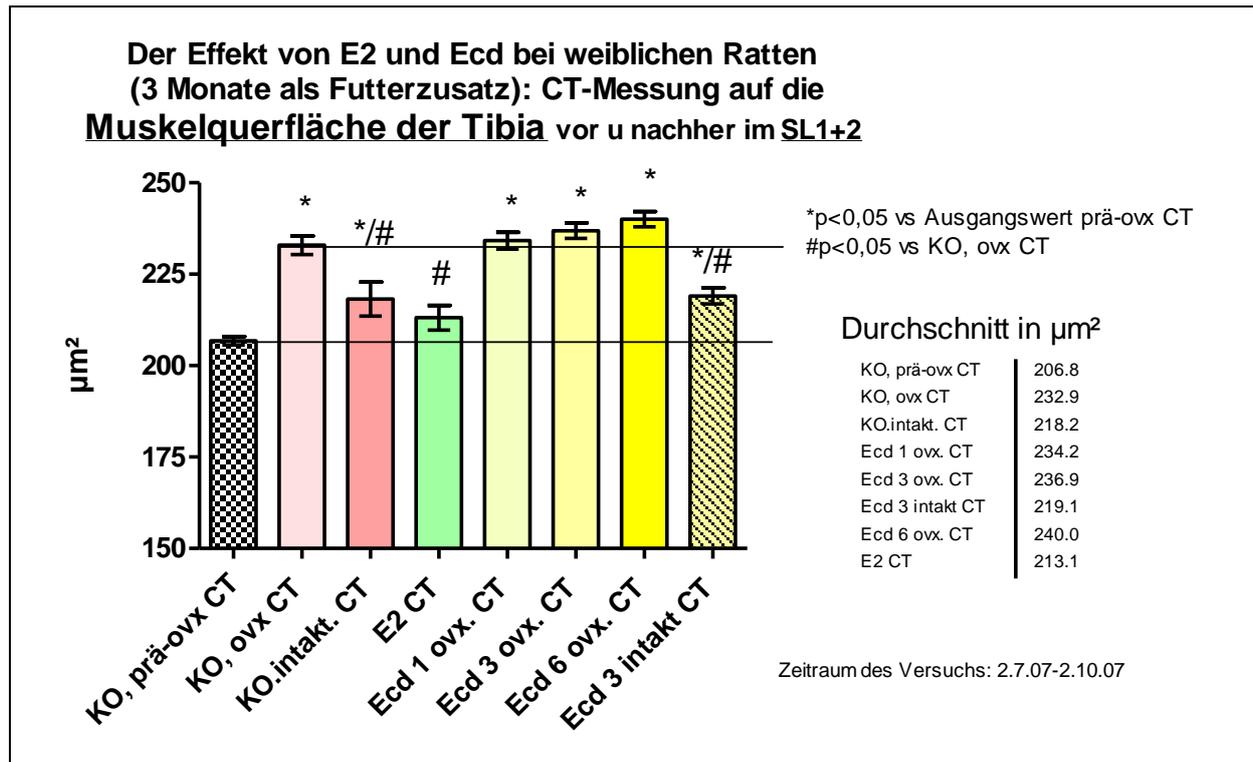


Abb. 19: Durchschnittliche Muskelfläche in μm^2 auf Höhe der Tibia der jeweiligen Behandlungsgruppen (g/kg Futter Tier) sowohl vor dem Versuch (prä-ovx) als auch nach dem Versuch nur vom SL1 und SL2 des CTs.

Im Langzeitversuch wurde in der Auswertung zwischen den Gruppen SL1+SL2 und SL3 bei der Beurteilung des Computertomographen (CT) unterschieden (siehe Methodik). Nach dem Versuchsende wurden auch hier wieder deutliche Unterschiede im SL1+SL2 der Tibia in der Muskelfaserzunahme in den verschiedenen einzelnen Gruppen deutlich. Während die Gruppe E2 mit +3,04 % und die physiologisch normale Gruppe (Gruppe KO intakt) mit +5,51 % kaum eine Zunahme aufwiesen, änderten sich die Muskelflächen in der Tibia in den übrigen Gruppen gegenüber ihrem Ausgangswert signifikant nach oben. Am deutlichsten war dies bei der Gruppe KO ovx mit +12,62 %, bei der Gruppe Ecd 1 ovx mit +13,24 %, der Gruppe Ecd 3 ovx mit +14,55 % und bei der Gruppe Ecd 6 ovx mit +16,04 % sichtbar. Beim Vergleich der einzelnen Gruppen im zweiten Versuch mit der KO ovx nach 12 Wochen ergibt sich nur eine Verringerung der Gruppen KO intakt, E2 und Ecd 3 intakt zur KO ovx-Gruppe. Alle anderen Gruppen wiesen keine signifikante Veränderung zur KO ovx-Gruppe auf (s. Abb. 19).

**Der Effekt von E2 und Ecd bei weiblichen Ratten
(3 Monate als Futter): CT-Messung auf die
Muskelquerfläche der Tibia vor u nachher nur im SL3**

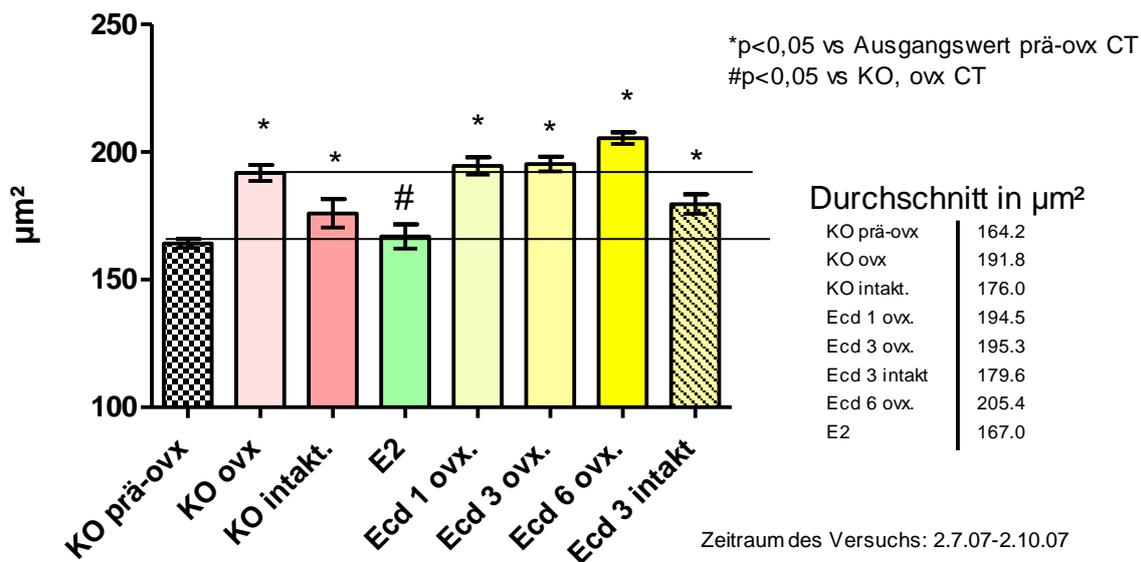


Abb. 20: Durchschnittliche Muskelfläche in mm^2 auf Höhe der Tibia der jeweiligen Behandlungsgruppen (g/kg Futter Tier) sowohl vor dem Versuch (prä-ovx) als auch nach dem Versuch nur vom SL3 des CTs.

In der Auswertung des SL3 im CT zeigen sich ähnliche Ergebnisse wie in der Auswertung der SL1+SL2. Hier ist jedoch eine noch deutlichere Zunahme der Muskelfaserfläche der Tibia im Vergleich zu den Vorwerten sichtbar im Vergleich zu den Werten von SL1+SL2. Selbst die Gruppe *KO intakt* mit +7,18 % und die Gruppe *E2* mit +1,7 % konnten hier leicht gegenüber dem Ausgangswert zulegen. Beachtlich sind allerdings erneut die deutlichen Zunahme in der Gruppe *KO ovx* mit von +16,32 %, der Gruppe *Ecd 1 ovx* mit +18,45 %, der *Ecd 3 ovx* mit +18,94 % und der Gruppe *Ecd 6 ovx* mit +25,09 %.

Wenn die Ergebnisse des zweiten Versuchs der einzelnen Gruppen mit der *KO ovx* am Versuchsende nach zwölf Wochen verglichen werden, so ergibt sich dort nur eine Abnahme der Gruppen *KO intakt* und der Gruppe *Ecd 3 intakt* sowie eine signifikante negative Veränderung der Gruppe *E2* zur *KO ovx*-Gruppe. Alle anderen Gruppen wiesen eine leichte Erhöhung gegenüber der *KO ovx* auf, die jedoch keine signifikante Veränderung darstellte. Am stärksten dominierte hier die Gruppe *Ecd 6 ovx* mit einer um +7,09 % höheren Zunahme als die *KO ovx*-Gruppe (s. Abb. 20).

3.4.3 Versuch II – Abdomen

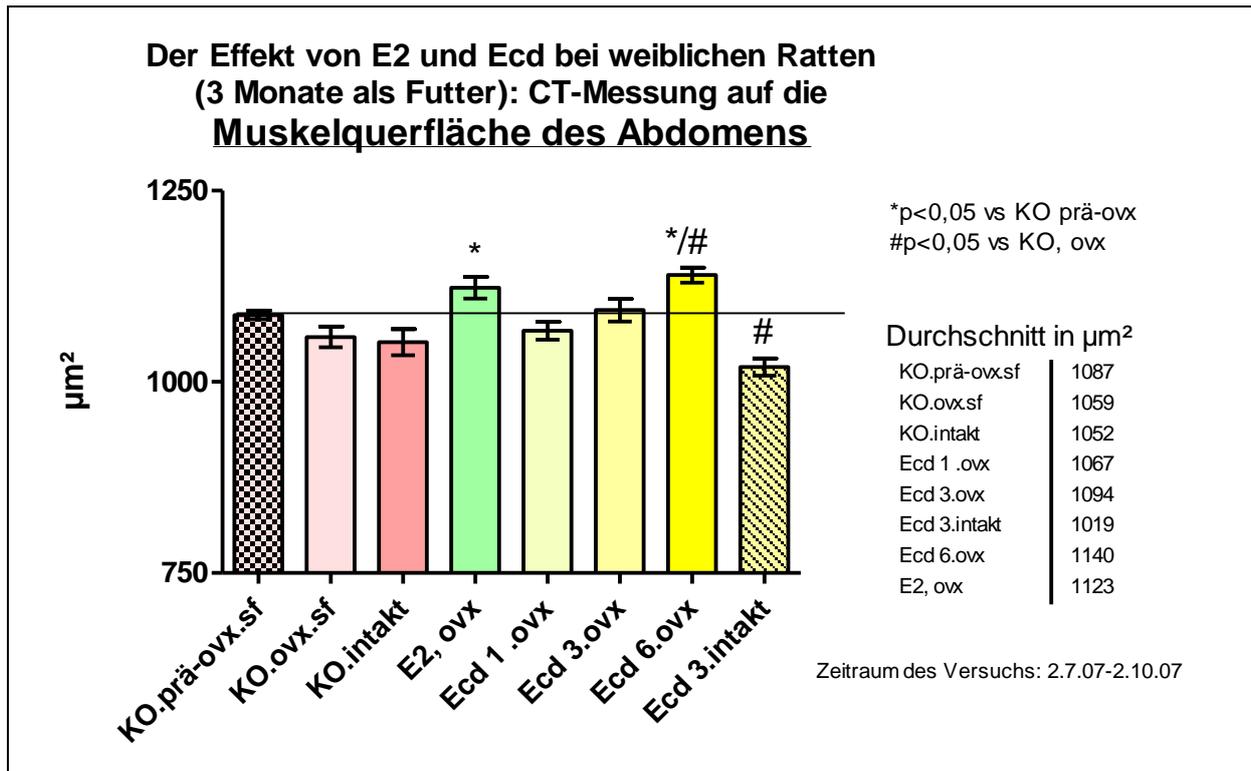


Abb. 21: Durchschnittliche Muskelfläche in µm² auf Höhe des Abdomens der jeweiligen Behandlungsgruppen (g/kg Futter Tier) sowohl vor dem Versuch (prä-ovx) als auch nach dem Versuch

In der Auswertung des Abdomen-CTs im Langzeitversuch wird deutlich, dass die beiden Kontrollgruppen an Muskelfläche im Abdomen verloren haben, während die Gruppe E2 mit +3,31 % und Ecd 6 ovx mit +4,87 % signifikant zu ihren Ausgangswerten KO prä-ovx dazu gewonnen haben. Des Weiteren gibt es eine leichte Abnahme der Muskelfläche im Abdomen der Gruppe Ecd 1 ovx um -1,84 % und der Gruppe Ecd 3 intakt um -6,25 % sowie eine leichte Muskelzunahme im Abdomen in der Gruppe Ecd 3 ovx um +1,01 % gegenüber der Gruppe KO prä-ovx, welche allerdings nicht signifikant waren. Vergleicht man in den CT-Auswertungen nach dem Versuch die einzelnen Gruppen mit der Kontrollgruppe KO ovx, so gibt es eine signifikante Veränderung bei der Zunahme der Muskelmasse im Abdomen nur in der Gruppe Ecd 6 ovx um +7,65 % und in der E2-Gruppe um +6,04 %. Alle anderen Gruppen zeigen keine signifikanten Veränderungen, lediglich leichte Zunahmen der Gruppe Ecd 3 ovx sowie der Gruppe Ecd 3 ovx (s. Abb. 21).

3.5 Muskelhistologie

3.5.1 Versuch I - M. gastrocnemius

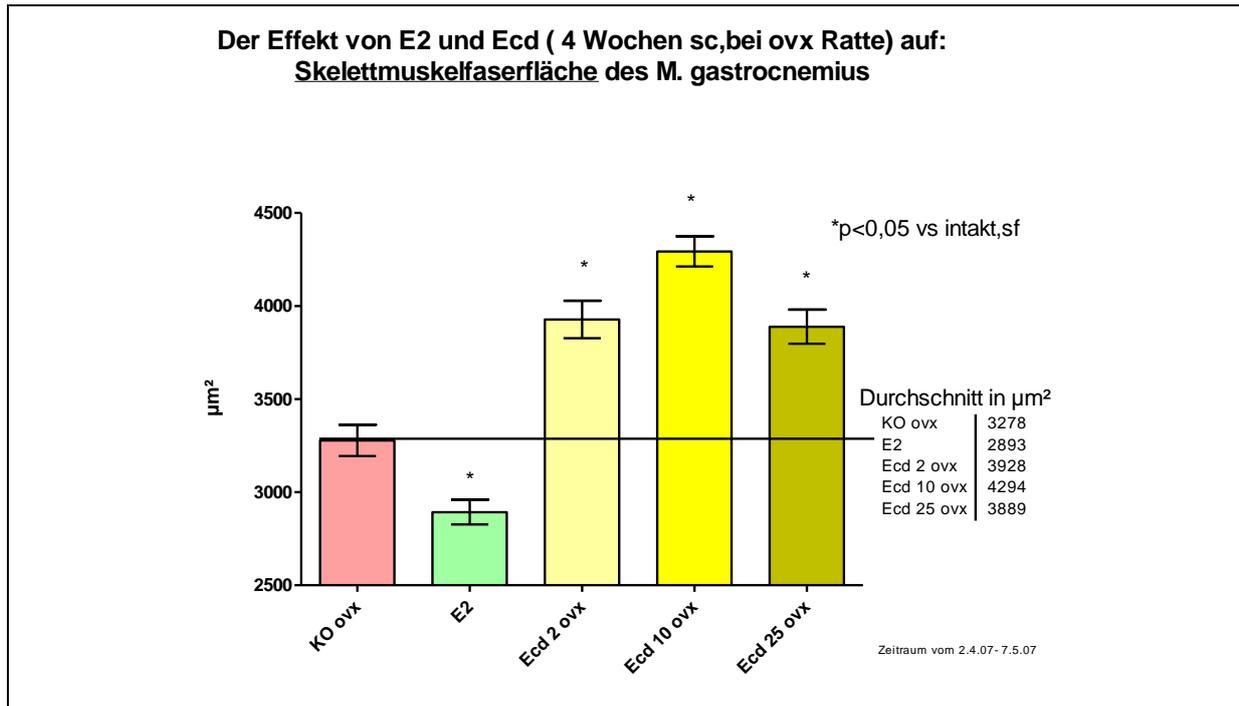


Abb. 22a Durchschnittliche Muskelfaserfläche des M. gastrocnemius der Versuchsratten in μm^2 .
Kurzzeitversuch (mg/ml s.c. Tier/d)

Im Kurzzeitversuch (Abb. 22a) zeigte sich eine deutlich signifikante Zunahme der Skelettmuskelfasern des M. gastrocnemius in den *Ecd*-Gruppen im Vergleich zur *KO ovx* Gruppe. Dabei nahm die Gruppe *Ecd 10 ovx* am meisten mit +31 % auf einen Durchschnittswert von 4294 μm^2 zu, während die Gruppe *Ecd 2 ovx* mit +19,8 % und die Gruppe *Ecd 25 ovx* mit +18,6 % nur an der Muskelfaserfläche zunahmen. Die Gruppe *E2* nahm im Vergleich zur *KO ovx*-Gruppe signifikant um -11,75 % ab und kam somit nach Versuchsende auf eine durchschnittliche Muskelfaserfläche von 2893 μm^2 .

3.5.2 Versuch II – M. gastrocnemius

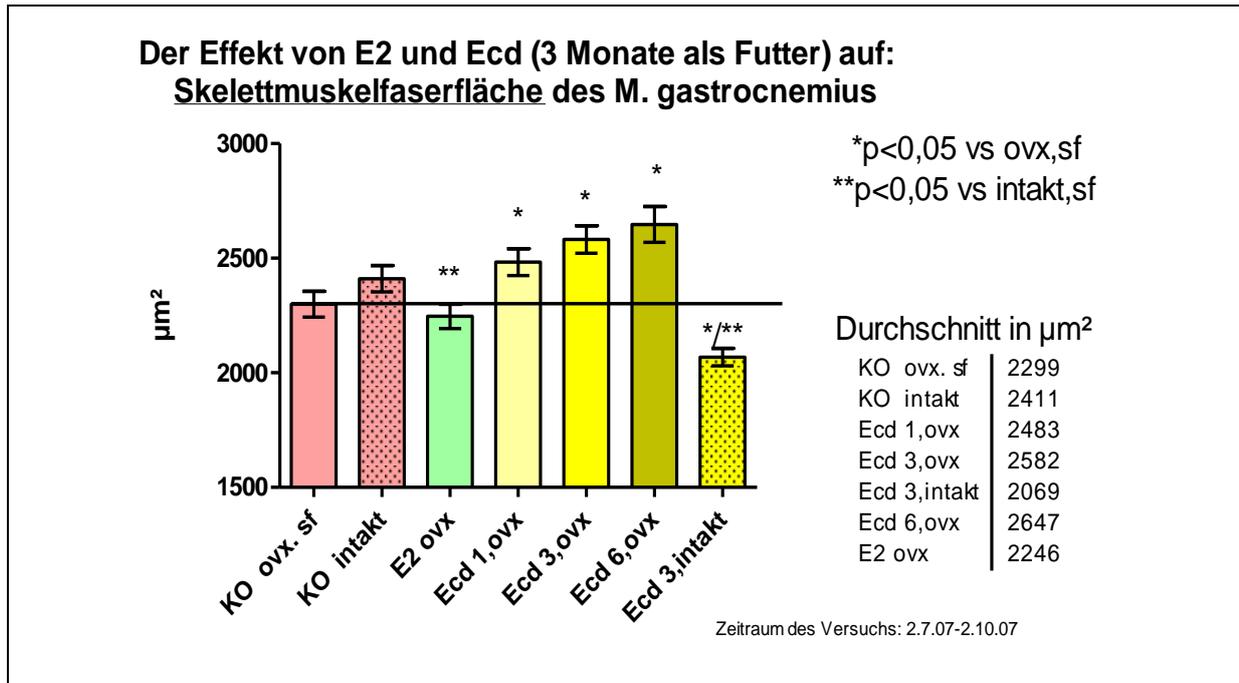


Abb. 22b Durchschnittliche Muskelfaserfläche des *Mm. gastrocnemius* der Versuchsratten in µm².
Langzeitversuch (g/kg Futter/Tier).

Im Langzeitversuch (siehe Abb. 22b) zeigte sich auch nach drei Monaten eine signifikante Erhöhung der Muskelfaserfläche in den *Ecd-Gruppen*, wobei diesmal der Unterschied zur *KO ovx-Gruppe* nicht so deutlich ausfiel wie im Kurzzeitversuch. Bei diesem Versuch ergab sich die stärkste signifikante Zunahme bei der *Ecd 6 ovx Gruppe* mit einem Zuwachs von +15,1 % auf einen Durchschnittswert von 2647 µm², während die *Gruppe Ecd 1 ovx* mit +8 % und die *Gruppe Ecd 3 ovx* mit +12,3 % an Muskelfaserfläche zunahm. Des Weiteren zeigte sich im zweiten Versuch eine signifikante Abnahme der Muskelfaserfläche in der *Gruppe Ecd 3 intakt*, also Tiere mit intakten Ovarien im Vergleich sowohl zur *KO ovx*, als auch zur *KO intakt-Gruppe*. Die *Gruppe E2* nahm nur gering an Muskelfaserfläche im Vergleich zur *KO ovx-Gruppe* ab, jedoch signifikant zur *KO intakt-Gruppe*.

3.5.3 Versuch I – Rattenmyokard

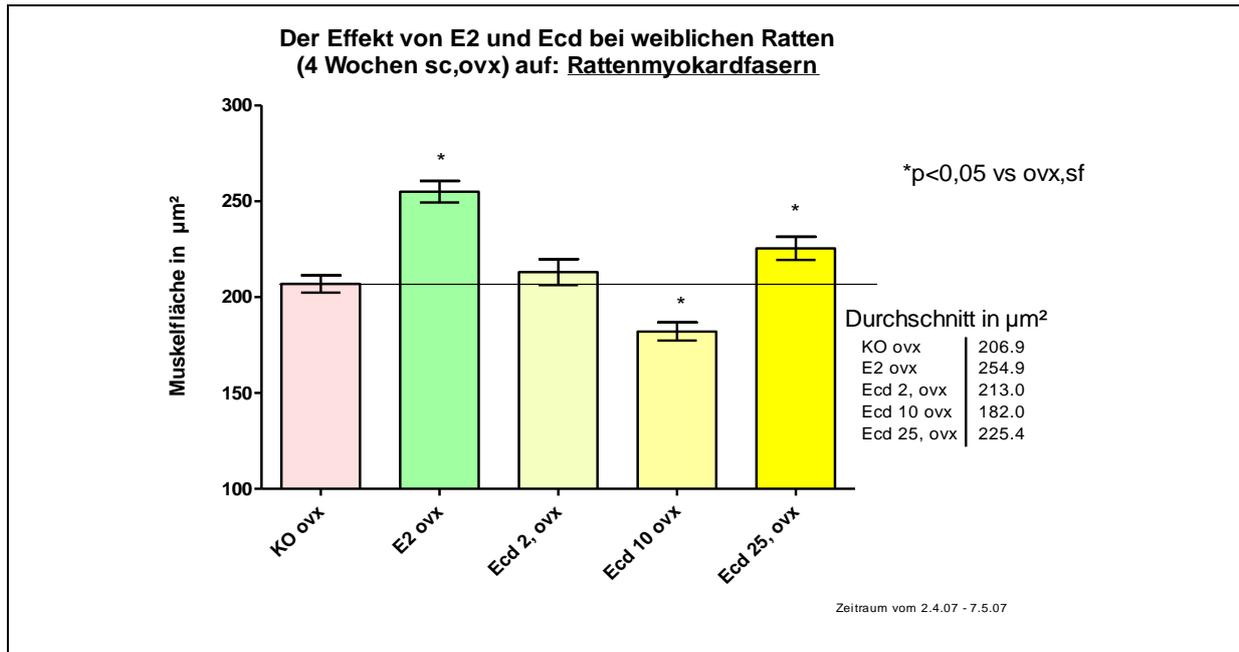


Abb. 23a

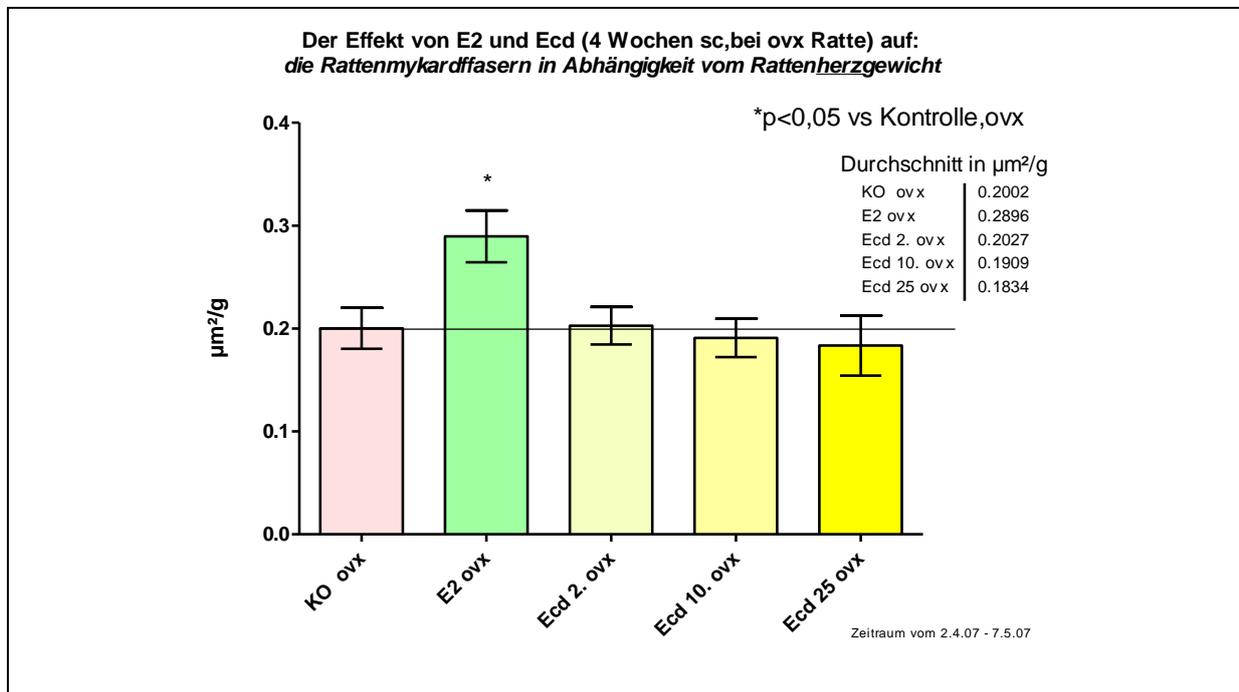


Abb. 23b:

Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse des Kurzzeitversuchs der durchschnittlichen Rattenmyokardfaserfläche der Versuchsgruppen (mg/ml s.c.Tier/d) in µm².

Abb. a Myokardfaserfläche für sich allein

Abb. b Abhängigkeit vom Rattenherzgewicht

Nach der Auswertung der Werte des ersten Versuchs wird ein unterschiedliches Ergebnis in den *Ecd-Gruppen* deutlich, während die *E2-Gruppe* im Vergleich zur *KO ovx-Gruppe* signifikant an Rattenmyokardfaserfläche zunahm. Die *Gruppe Ecd 2 ovx* gewann an Rattenmyokardfaserfläche hinzu, während sich bei *Ecd 10 ovx* eine signifikante Ab- und bei

Ecd 25 ovx eine signifikante Zunahme der Myokardfaser im Vergleich zur *KO ovx-Gruppe* (s. Abb. 23a) zeigte. Wenn man allerdings die Ergebnisse der Rattenmyokardfaserfläche in Abhängigkeit zum Rattenherzgewicht setzt, so ergibt sich für keine der *Ecd-Gruppen* ein signifikanter Unterschied zur *KO ovx-Gruppe*. Während die *Gruppe Ecd 2 ovx* leicht mit +1,25 % an Myokardfaserfläche dazugewinnt, nehmen die *Gruppe Ecd 10 ovx* mit -4,65 % und die *Gruppe Ecd 25 ovx* mit -8,39% eher noch ab. Wenn die Myokardfasern in Abhängigkeit zu den Herzgewichten gesetzt werden, zeigt sich eine positive Signifikanz der *E2-Gruppe* zur *Kontrollgruppe ovx* (s. Abb.23b).

3.5.4 Versuch II – Rattenmyokard

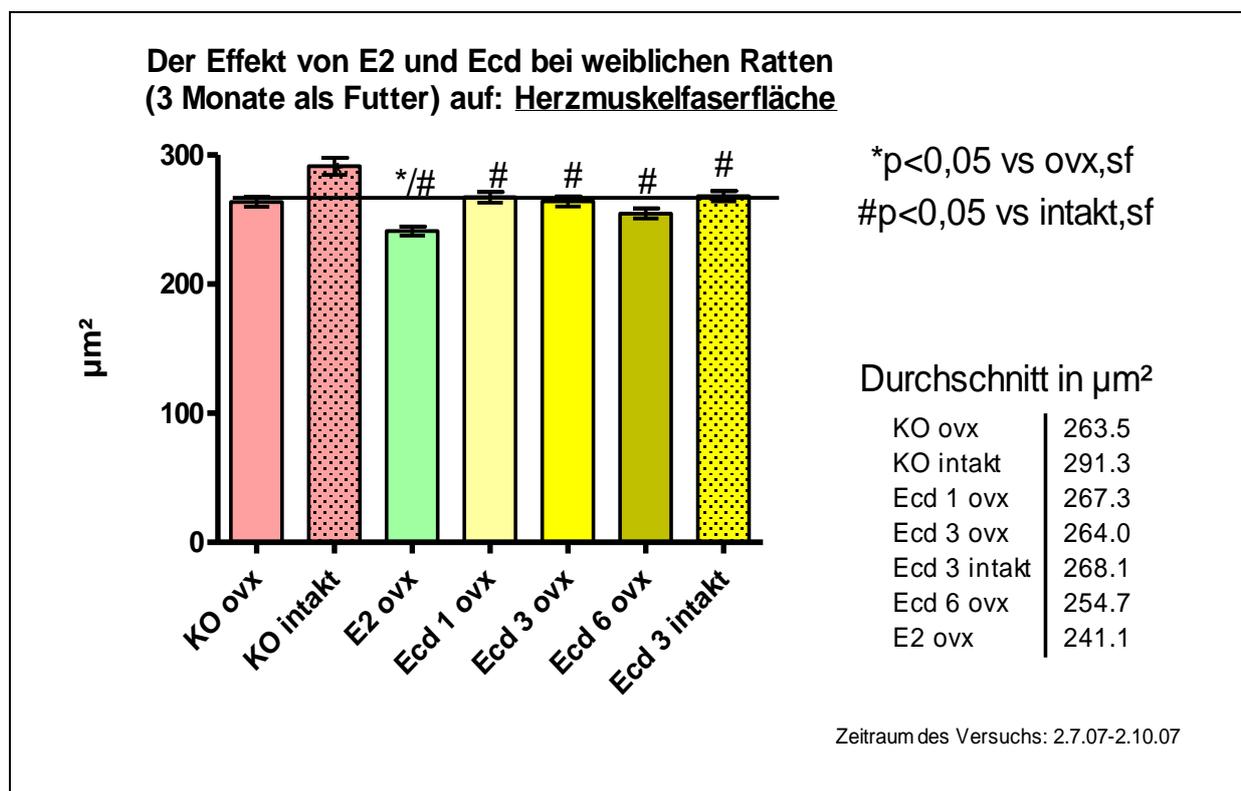


Abb. 24a Myokardfaserdicke

Nach dem Langzeitversuch wurden die Myokardfaserflächen der Ratten wie im Kurzzeitversuch erst allein, dann in Abhängigkeit von den jeweiligen Rattenherzgewichten betrachtet. Sieht man die Myokardfaserfläche unabhängig von den Rattenherzgewichten (s. Abb. 24a), so zeigt sich in den *Ecd-Gruppen* keine signifikante Änderung im Vergleich zur *KO ovx-Gruppe*. Lediglich bei der physiologisch normalen *Gruppe (KO intakt)* und der *E2-Gruppe* ergab sich eine signifikante Zu- bzw. Abnahme der Myokardfaserflächen zur *KO ovx-*

Gruppe. Somit hatte die *KO-ovx-Gruppe* im Vergleich zur physiologisch normalen, nicht ovx-Gruppen (*KO intakt*) deutlich an Myokardfaserflächen verloren.

Vergleicht man die Werte der *Ecd-Gruppen* mit der physiologisch normalen *KO intakt-Gruppe*, so lassen sich bei allen Gruppen signifikante Abnahmen erkennen.

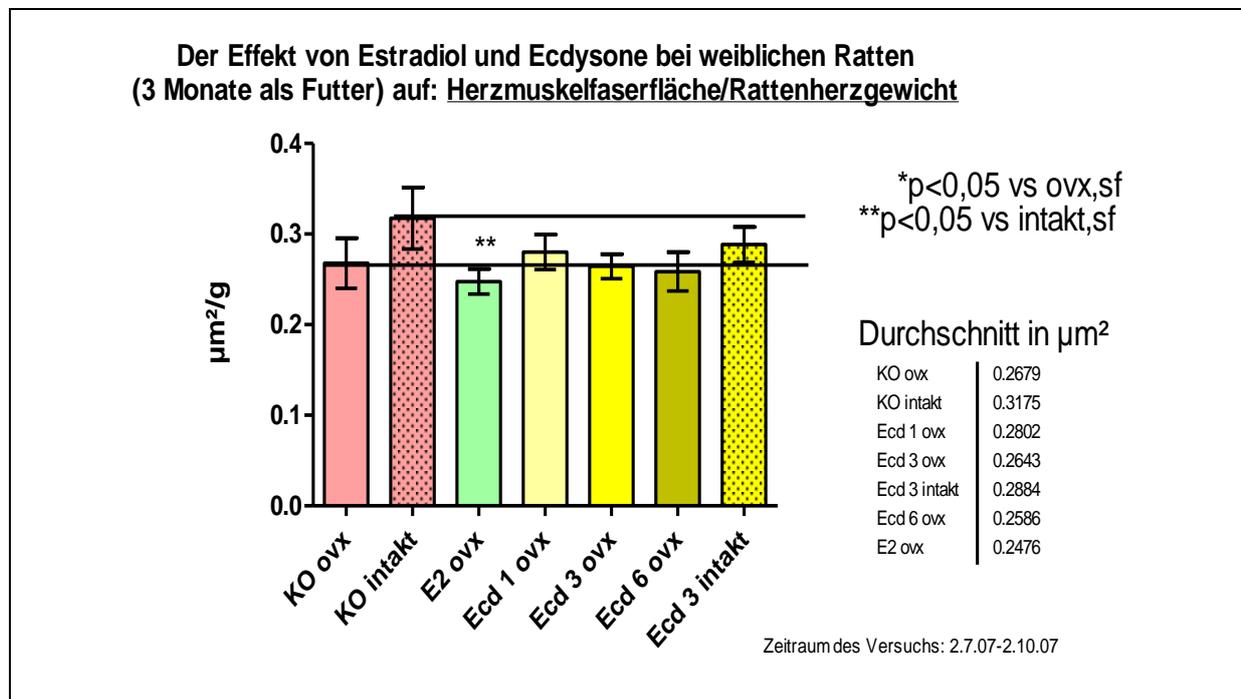


Abb. 24b: Myokardfaserdicke in Abhängigkeit vom Rattenherzgewicht

Abb. 24a+b zeigen die Ergebnisse des Langzeitversuchs der durchschnittlichen Myokardfaserdicke des Rattenherzmuskels der Versuchsgruppen (g/kg Futter/Tier) in μm^2 .

Betrachtet man die Myokardfaserfläche in Abhängigkeit vom Rattenherzgewicht (s. Abb. 24b), so zeigen alle Gruppe leichte Veränderungen im Vergleich zur *KO ovx-Gruppe*, jedoch sind diese nicht signifikant. Fungiert die Gruppe der physiologisch normale *KO intakt* als Bezugsgruppe, so ist in allen Gruppen die Myokardfläche signifikant reduziert, wobei die *Gruppe E2* mit -22,01 %, die *Gruppe Ecd 6 ovx* mit -18,55 % und die *Gruppe KO ovx* mit -15,622 % am deutlichsten hervorstechen.

3.6 Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) – Versuch I und II

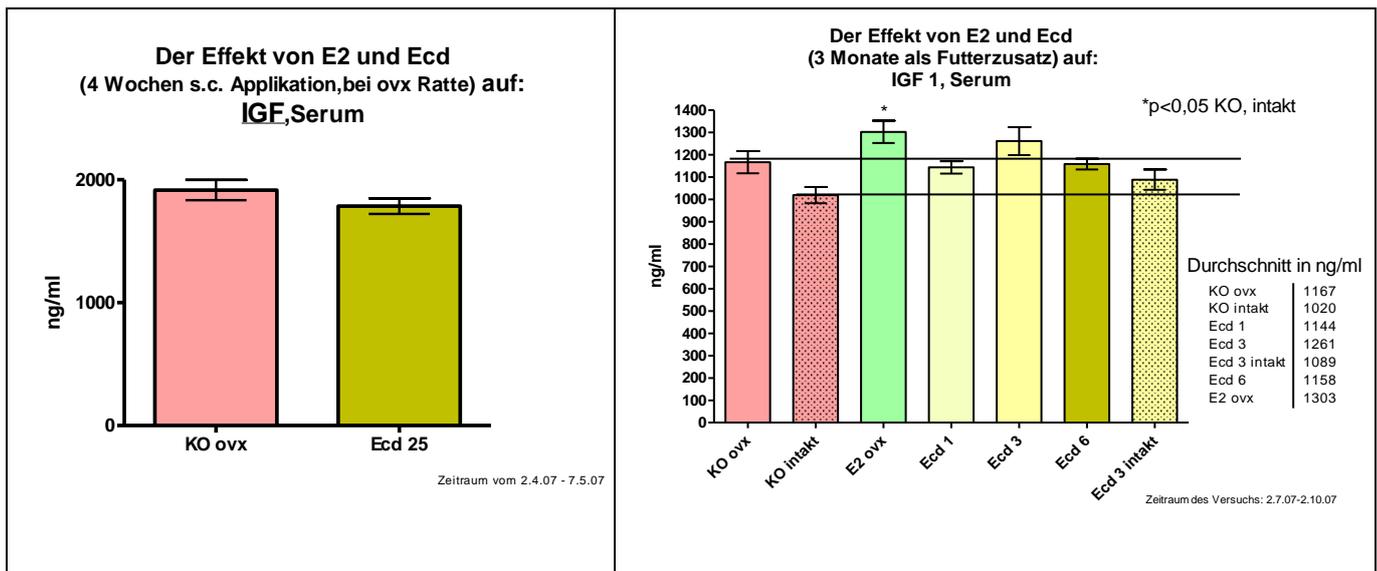


Abb. 25a+b: Durchschnittlicher IGF-Gehalt des Serums der Versuchsgruppen in ng/ml.

Abb.25 a bezieht sich auf den Kurzzeitversuch (mg/ml s.c. Tier/d)

Abb 25 b bezieht sich auf den Langzeitversuch (g/kg Futter/ Tier).

Im Kurzzeitversuch wurde lediglich in der *Gruppe KO ovx* und der *Gruppe Ecd 25 ovx* der Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) im Serum bestimmt. Dabei zeigte sich eine leichte Abnahme des IGF-1 in der *Gruppe Ecd 25 ovx* um -6,78 % im Vergleich zur *KO ovx-Gruppe* (s. Abb. 25a).

Im Langzeitversuch wurde der IGF-1-Serumgehalt aller Gruppen bestimmt. Fungiert die *KO ovx* als Kontrollgruppe, so existiert keine signifikante Zunahme des IGF-1 in den Versuchsgruppen. Bei den *Gruppen KO intakt, Ecd 1 ovx, Ecd6 ovx* und *Ecd 3 intakt* sind die IGF-1-Spiegel leicht reduziert, in der *Gruppe E2* (+11,65 %) und *Ecd 3 ovx* (+8,05 %) leicht erhöht. Nimmt man die *Gruppe KO intakt* als Kontrollgruppe der einzelnen Gruppen, so existiert nur bei der *Gruppe E2* eine signifikante Zunahme des IGF-1 (s. Abb. 25b).

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die folgenden Tabellen fassen die Ergebnisse des ersten Versuchs, bei dem die Ratten vier Wochen lang s.c. die zu untersuchende Substanz injiziert bekamen, und des zweiten Versuchs zusammen. Bei diesem Versuch bekamen die Ratten die zu untersuchende Substanz als Futterzusatz über einen Zeitraum von 3 Monaten. Die Mittelwerte der *Gruppe KO* wurden für jedes untersuchte Organ gleich 100 % gesetzt. Die Mittelwerte der dargestellten Versuchsgruppen beziehen sich auf diesen 100 % - Wert der *Gruppe ovx sf* und beschreiben prozentuale Veränderungen. Die folgenden Tabellen dienen nicht der statistischen Analyse, vielmehr sollen sie einen zusammenfassenden Überblick vermitteln.

3.7.1 Versuch I – s.c. Kurzzeitversuch

| Untersuchte Parameter | Versuchsgruppen | | | |
|---|-----------------|-------------|------------|------------|
| | E2 ovx | Ecd 2 ovx | Ecd 10 ovx | Ecd 25 ovx |
| Futterkonsum | ↓↓ -17% | ↑ +5% | ↓ -2% | ↔ |
| Körpergewicht | ↓↓ -12% | ↓ -1% | ↓ -1% | ↓ -1% |
| Rattenherzgewicht | ↓ -18,14% | ↓ -3,32% | ↓ -4,265% | ↓ -2,46% |
| CT-Auswertung Muskelquerfläche/Tibia _{SL1+2} | ↓↓ -15,88% | ↓ -9,037% | ↓ -5,573% | ↑ +1,47% |
| CT-Auswertung Muskelquerfläche/Tibia* _{SL1+2} | ↑ +2,87%* | ↑↑ +11,25%* | ↑↑+15,48%* | ↑↑+24,09%* |
| CT-Auswertung Muskelquerfläche/Tibia _{SL3} | ↓↓-20,02% | ↑↑ +22,23% | ↑↑ +18,78% | ↑ +2,36% |
| CT-Auswertung Muskelquerfläche/Tibia* _{SL3} | ↑ +6,29%* | ↑↑+62,44%* | ↑↑+57,86%* | ↑↑+36,04%* |
| Muskelfaserdicke | ↓↓ -11,75% | ↑↑ +19,8% | ↑↑+30,99% | ↑↑ +18,64% |
| Herzmuskelfaserdicke/ Rattenherzgewicht | ↑↑ +44,66% | ↑ +1,25% | ↓ -4,65% | ↓ -8,39% |
| IGF-1 | | | | ↓ -6,78% |
| Östrogenrezeptor-α | ↑↑ +30,6% | ↑↑ +67,4% | ↑↑ +42,8% | ↑↑ +43,2% |
| Östrogenrezeptor-β | ↑↑↑+182,9% | ↓↓ -32,13% | ↓↓ -65,41% | ↑↑+175,2% |

Tab. 4: Die Tabelle stellt die prozentualen Veränderungen der unterschiedlichen Versuchsgruppen des ersten Versuchs im Vergleich zur *KO ovx sf* dar. Die prozentualen Werte wurden aus den statistischen Durchschnittswerten (means) berechnet: ↑ erhöhte Werte versus *KO*, ↓ reduzierte Werte versus *KO*, ↑↑ stark erhöhte Werte versus *KO*, ↓↓ stark reduzierte Werte versus *KO*, ↔ unveränderte Werte versus *KO sf*.

*Diese Werte beziehen sich auf die Ausgangswerte (means) prä-ovx, welche vor dem Versuch erhoben wurden

3.7.2 Versuch II – Futterzusatz im Langzeitversuch

| Untersuchte Parameter | Versuchsgruppen | | | |
|---|-----------------|------------|------------|------------|
| | E2 ovx | Ecd 1 ovx | Ecd 3 ovx | Ecd 6 ovx |
| Futterkonsum | ↓ -7% | ↑ +3% | ↑ +8% | ↑↑ +14% |
| Körpergewicht | ↓↓ -15% | ↓ -1% | ↑ +2% | ↑ +4% |
| Rattenherzgewicht | ↓ -0,48% | ↑ +0,20% | ↑ +4,01% | ↑ +6,54% |
| CT-Auswertung der Muskelquerfläche/Tibia SL1+2 | ↓ -8,50% | ↑ +0,56% | ↑ +1,71% | ↑ +3,049% |
| CT-Auswertung der Muskelquerfläche/Tibia SL1+2* | ↑ +3,04%* | ↑↑+13,24%* | ↑↑+14,55%* | ↑↑+16,05%* |
| CT-Auswertung der Muskelquerfläche/Tibia SL3 | ↓↓ -12,93% | ↑ +1,41% | ↑ +1,82% | ↑ +7,09% |
| CT-Auswertung der Muskelquerfläche/Tibia SL3* | ↑ +1,70%* | ↑↑+18,45%* | ↑↑+18,94%* | ↑↑+25,09%* |
| CT-Auswertung der Muskel im Abdomen | ↑ +6,04% | ↑ +0,76% | ↑ +3,68% | ↑ +7,65% |
| CT-Auswertung der Muskel im Abdomen* | ↑ +3,31%* | ↓ -1,83%* | ↑ +1,01%* | ↑ +4,87%* |
| Muskelfaserdicke | ↓ -2,31% | ↑ +8% | ↑↑ +12,3% | ↑↑ +15,1% |
| Herzmuskelfaserdicke** | ↓ -7,57% | ↑ +4,59% | ↓ -1,35% | ↓ -3,47% |
| IGF-1 | ↑↑+27,75% | ↑↑ +12,16% | ↑↑+23,62% | ↑↑ +13,53% |

Tab. 5: Die Tabelle stellt die prozentualen Veränderungen der unterschiedlichen Versuchsgruppen des zweiten Versuches im Vergleich zur ovx sf dar. Die prozentualen Werte wurden aus den statistischen Durchschnittswerten (means) berechnet: ↑ erhöhte Werte versus KO, ↓ reduzierte Werte versus KO, ↑↑ stark erhöhte Werte versus KO, ↓↓ stark reduzierte Werte versus KO, ↔ unveränderte Werte versus KO sf.

*Diese Werte beziehen sich auf die Ausgangswerte prä-ovx (means) vor dem Versuch

** in Abhängigkeit vom Rattenherzgewicht

4. Diskussion

4.1 Futterverbrauch und Gewichtszunahme

Frauen mit zunehmendem Alter leiden, vor allem nach der Menopause, aufgrund eines E2- und Testosterondefizits häufig an einer Muskelabnahme, einem Zuwachs des intraabdominalen Fettdepots, an Gewichtszunahme, bzw. unter einer Zunahme des BMIs (Dobs et al. 2002).

Um dies zu simulieren, wurden weibliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet, bei denen das Futterverhalten und die Gewichtszunahme nach ovx bereits schon in einigen Versuchen beobachtet wurde. Dabei wurde festgestellt, dass bei den Versuchstieren die Futteraufnahme, das Körpergewicht, der BMI und der Zuwachs des Fettdepots stark von den ovariellen Hormonen abhängig sind (Burguera et al. 2001; Toth M et al. 2001).

Allerdings muss man erwähnen, dass die Gabe von E2 zu unterschiedlichen Wirkungen führen kann. Während E2 bei kommerziell gehaltenen Farmtieren zur Fleischgewinnung eher anabol wirkt, so hemmt E2 bei Ratten das allgemeine Wachstum (Fisher et al. 2000) und zeigte bei verschiedenen Versuchen in der Abteilung während der Auswertung bezogen auf 100g/kg ein Gleichbleiben der Muskulatur.

Normales Pellet-Futter enthält als Haupteiweißquelle Soja. Soja besitzt allerdings in relevanten Mengen Östrogen-ähnliche Substanzen wie Genistein und Diadzein, welche im Tiermodell eine fettreduzierende Wirkung zeigten und somit den Lipidmetabolismus beeinflussen können (Kim et al. 2006; Rachon et al. 2008). Daher wurde in beiden Tierversuchen nur sojafreies Pellet-Futter verwendet. Um das fehlende Eiweißdefizit auszugleichen, wurden dem Futter wichtige Nährstoffe und Vitamine sowie die Testsubstanz nach einer Vorgabe der Abteilung der experimentellen Endokrinologie durch den Futterhersteller beigemischt.

Im Kurzzeitversuch zeigte sich, dass alle Versuchsgruppen, sowohl die ovx-Kontrollgruppe als auch sämtliche *Ecd-Gruppen*, bis zum Ende des Versuchs ihren Futterverbrauch steigerten und bis auf die *Gruppe E2* an Gewicht signifikant zunahmen. Wenn man die Gruppen am Ende des ersten Versuches allerdings mit der Kontrollgruppe vergleicht, so wird sichtbar, dass die *E2-Gruppe* signifikant weniger Futter verbraucht und Gewicht zugenommen hat. Dies bestätigt somit das bereits in vielen Versuchen beobachtete Verhalten von ovx-Ratten in Bezug auf Futterkonsum und Körpergewichtszunahme. Dabei sah man, dass nach ovx die Ratten deutlich an Gewicht zunahmen und den Futterverbrauch erhöhten, es sei denn, man gab den Ratten E2, welches der Gewichtszunahme und Futterverbrauch entgegenwirkte

(Burguera et al. 2001; Toth M et al. 2001).

Auch im Langzeitversuch ergaben sich ähnliche Beobachtungen, jedoch fiel hier die Gewichtszunahme etwas geringer aus als im Kurzzeitversuch. Dieses Ergebnis kann durch die längere Eingewöhnungszeit der Versuchstiere zu Beginn des Versuchs erklärt werden, wo die Tiere ein höheres Ausgangsgewicht als im Kurzzeitversuch erreichen konnten.

Während das Körpergewicht kontinuierlich bis zum Ende des Versuchs langsam zunahm und in allen Gruppen signifikant höher war als der Ausgangswert, stieg zunächst der Futterverbrauch in den ersten drei Wochen, pendelte sich jedoch danach bei einem konstanten Level ein. Der Futterverbrauch war am Ende des Versuches zwischen der *Kontrollgruppe KO ovx* und der *Ecd 3 ovx-Gruppe* sehr ähnlich, während die *E2-Gruppe*, die *Gruppen KO intakt* und *Ecd 3 intakt* ähnlich weniger Futter zu sich nahmen wie die *KO ovx-Gruppe*. Auffällig ist diesmal der signifikant höhere Verbrauch an Futter der *Ecd 3-* und *6-ovx Gruppen* im Vergleich zur *KO ovx-Gruppe*, obwohl lediglich die *Ecd 6-ovx* Gruppe signifikant mehr Körpergewicht im Vergleich zur *KO ovx* zugenommen hatte. Auch wenn alle Gruppen signifikant an Gewicht zugenommen hatten, so war die Gewichtszunahme der *KO ovx-Gruppe* sowie der *Ecd 1 ovx, 3 ovx* und *6 ovx* signifikant höher als die der *Gruppen E2 ovx, Ecd 3 intakt* und *KO intakt*. Eine Erklärung hierfür wäre erneut die Möglichkeit der Beeinflussung des Futterverbrauchs und der Gewichtszunahme durch E2. E2 schützt vor einer Zunahme des Futterverbrauchs, Gewichts (Roudebush et al. 1993) und der Zunahme des Körperfettes nach ovx (Wade und Gray 1979; Richard 1986; Toth et al. 2001). Man vermutet durch E2 eine Beeinflussung der Lipoproteinlipase, welche von den weißen Adipozyten freigesetzt wird, über das Blutplasma die Bluthirnschranke passiert und im Hypothalamus die Futteraufnahme beeinflusst (Burguera et al. 2001). Zudem hemmt E2 die Muskelproteinbiosynthese und den Energieumsatz. Allerdings wird eine Veränderung des Energieumsatzes bei Ratten auch dann unabhängig von E2 beobachtet, sobald die Versuchstiere *ad libitum* Futter bekommen und dies wiederum einen Stimulus für LPL darstellt (Toth M et al. 2001). Die geringere Körpergewichtszunahme bei beiden Versuchen der E2-Gruppen sowie der Gruppen des Langzeitversuchs, bei denen die ovariale Funktion noch intakt war, kann somit einerseits durch die von E2 verursachte Hemmung der Muskelproteinbiosynthese (Toth M et al. 2001) und andererseits den wirkenden Schutz des E2 vor einer Körperfettzunahme (Burguera et al. 2001) erklärt werden. Ob aber die signifikante Gewichtszunahme der übrigen Gruppen, vor allem der *Ecd-Gruppen*, durch eine Zunahme des Körperfettes oder durch die anabole Wirkung des Ecd und den damit verbundenen Muskelzuwachs zu erklären ist, zeigt sich in den Ergebnissen der Muskelauswertung.

4.2 CT-Auswertung Muskulatur

Um eine erste Vorhersage treffen zu können, ob die Gewichtszunahme durch eine Zunahme des Fettdepots oder durch eine Zunahme der Muskelmasse bei dem Versuch bedingt war, wurden die Versuchstiere vor und nach den Versuchen mittels eines qCT gescannt und die erhobenen Daten mit Hilfe eines Computerprogrammes ausgewertet. Bereits Evian und Campbell versuchten 1993, mit dieser Methode eine qualitative Aussagekraft über einen Muskelzuwachs bei alten Männern nach körperlichem Training als Therapie gegen Sarkopenie zu finden und belegten einen Zuwachs von + 11.4% (Evian und Campbell 1993). Im ersten Versuch wird bei der Auswertung der Muskelquerfläche der Tibia deutlich, dass sämtliche Gruppen im Vergleich zum Anfang des Versuchs an Muskelmasse zunahmten, egal ob die Slice 1+2 (SL1+2) oder Slice 3 (SL3) ausgewertet wurden. Allerdings gibt es signifikante Unterschiede zwischen der Höhe der Zunahme der Muskulatur in den einzelnen Gruppen und SLs. Im SL 1+2 verzeichneten den deutlichsten Zuwachs an Muskelmasse die *Gruppe Ecd 25 ovx* und die *Gruppe KO ovx*, gefolgt von der *Gruppe Ecd 10 ovx* und der *Gruppe Ecd 2 ovx*. Die Gruppe *E2 ovx* nahm im Vergleich zu den anderen Gruppen relativ gering an Muskelmasse zu und hat somit eine ähnliche Muskelmasse wie in der Ausgangssituation. Im SL 3 wiederum verzeichnete nicht die *Gruppe KO ovx* den größten Zuwachs, sondern die *Gruppen Ecd 2 und 10 ovx*. Auch im SL3 ist erneut die nur geringe Zunahme der *Gruppe E2 ovx* mit +6,29 % im Vergleich zum Ausgangswert deutlich.

Dass bei Ratten nach ovx eine Organ-, Körpergewichts- und Muskelzunahme besteht, wurde bereits in vielen Versuchen gezeigt (Fisher et al. 2000; McClung et al. 2006; Moran et al. 2007). Dieses Phänomen ist durch eine Hochregulation von GH und IGF-1 um bis zu 30 % zu erklären (Fisher et al. 2000). Allerdings vermutet man den Muskelzuwachs nicht durch eine gesteigerte Proteinsynthese, sondern durch eine vermehrte Flüssigkeitsansammlung extrazellulär in der Muskulatur (McClung et al. 2006; Moran et al. 2007). Die Ca^{2+} -Konzentration nimmt nach ovx bis zu 30 % ab. Es kommt durch verminderte Myosinfunktion zu einer verminderten Muskelkontraktilität (Moran et al. 2007). Die Gabe von E2 bei ovx-Ratten hemmt die Organ-, Körpergewichts- und Muskelzunahme (Kobori und Yamamuro 1989; Moran et al. 2007; Suzuki und Yamamuro 1985; Tsai et al. 2007), während es bei kommerziellen Zuchttieren in der Landwirtschaft zur Fleischherstellung eher anabol wirkt (Fisher et al. 1998 + 2000; Tsai et al. 2007). Die Ergebnisse des Versuchs I der *Gruppen E2 ovx* und *KO ovx* bestätigen somit das Verhalten von ovx-Ratten in Bezug auf Körpergewicht und Muskelzu- bzw. -abnahme.

Wenn man die Endergebnisse im SL 1+2 der Versuchsgruppen nur mit der *KO ovx*-Gruppe

am Ende des ersten Versuchs vergleicht, so wird deutlich, dass bis auf die *Gruppe Ecd 25 ovx* alle anderen Gruppen signifikant weniger an Muskelquerfläche im SL 1+2 zugenommen haben. Im SL3 hatten alle *Ecd-Gruppen* eine größere Muskelquerfläche als die Gruppe *KO ovx*. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der SL1+2- und der SL 3- Auswertung wäre die Höhe des gescannten Rattenfußes (siehe Abb. 4 S. 30). Während SL1+2 eher am Muskelansatz in Höhe des knöchernen Muskelansatzes gemessen hat, so scannte SL3 eher den Muskelbauch, welcher deutlich voluminöser ist.

Im zweiten Versuch, dem Langzeitversuch, zeigten sich ähnliche Ergebnisse bei der SL1+2- und SL3-Auswertung wie im ersten Versuch. Auch hier nahmen sämtliche Versuchsgruppen an Muskelquerfläche im Vergleich zum Ausgangsgewicht zu, allerdings nicht so deutlich wie im ersten Versuch. Sowohl im SL1+2 und SL3 zeigt die *Gruppe E2 ovx* erneut die geringste Vergrößerung der Muskelquerfläche, gefolgt von den *KO intakt* und *Ecd 3 intakt*. Am deutlichsten waren die Zunahmen der Muskelquerfläche erneut im SL1+2 sowie SL3 bei den *Gruppen KO ovx, Ecd 3 ovx* und *Ecd 6*. Allerdings wird im Langzeitversuch deutlich, dass sich die Muskelquerflächen der *KO ovx-Gruppen* und der *Ecd ovx-Gruppen* deutlich mehr annäherten als im ersten Versuch. Tsai stellte 2007 diesen Effekt bei chronischen Versuchen ebenfalls fest und führte ihn auf die Muskelzunahme durch IGF-1 zurück, welches nach ovx in den ersten zwei Wochen am stärksten hoch reguliert wird und sich nach fünf bis sechs Wochen wieder dem Ausgangswert annähert. Auch Báthori vermutet einen Zusammenhang zwischen der anabolen Wirkung von Ecd und des IGF-1 (Báthori et al. 2008).

Zusätzlich zur Messung der Muskelquerfläche der Tibia der Versuchstiere wurden im Langzeitversuch die Muskelquerflächen im Abdomen untersucht. Dort zeigten sich kaum Veränderungen im Vergleich zum Ausgangswert. Lediglich die *Gruppen E2 ovx* und *Ecd 6 ovx* nahmen an Muskelquerfläche zu. Wenn man bei dieser Auswertung die Gruppen am Ende des Versuchs mit der *KO ovx* vergleicht, nahmen auch hier lediglich die *Gruppe E2 ovx* und die *Gruppe Ecd 6 ovx* an Muskelquerfläche zu. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die geringe Ansprechrate von E2-Schwankungen und Ecd auf langsame Muskelfasern, welche sich vermehrt im Halteapparat des Abdomens befinden im Vergleich zu den intermediären und schnellen Muskelfasern in der Tibia. Ob aber der Muskelzuwachs der Ecd-Gruppen ähnlich der *KO ovx* durch vermehrte Flüssigkeitsansammlung extrazellulär mit verminderter Kontraktilität (McClung et al. 2006; Moran et al. 2007) zu erklären ist, ist fraglich, da Ecd eine anabole Wirkung zugeschrieben wird (Dinan und Lafont 2006) und sich dies vereinzelt in Schwimmversuchen mit Ratten bereits bestätigte (Sláma und Lafont 1995). Um dies genauer beurteilen zu können, wurden zusätzliche histologische Präparate des M. gastrocnemius angefertigt.

4.3 Histologische Auswertung der Muskulatur

4.3.1 Skelettmuskulatur

Bei der histologischen Auswertung des M. gastrocnemius konnte man leider die erhobenen Werte am Ende des ersten Versuchs nicht mit Werten vor dem Versuch vergleichen und somit nur die Referenzgruppe *KO ovx* als Vergleichsgruppe heranziehen. Wenn man die Theorie verfolgt, dass nach *ovx* Ratten an Muskelmasse durch extrazelluläre Flüssigkeitszunahme zunehmen (McClung et al. 2006; Moran et al. 2007) und die Gabe von E2 die Skelettmuskelproteinbiosynthese hemmt (Toth M et al. 2001; Kumar et al. 2008), so müsste theoretisch die Gruppe *E2* signifikant weniger und die Gruppen *Ecd* eher mehr als die Kontrollgruppe *KO ovx* eine Skelettmuskelfaserfläche aufzeigen.

Im ersten Versuch zeigten sich diese theoretischen Ergebnisse nur partiell. Im Vergleich zur *KO ovx* hatte die Gruppe *E2* eine deutlich geringere Muskelfaserfläche. Allerdings wiesen alle *Ecd* Gruppen erheblich größere Muskelfaserflächen als die *KO ovx* auf.

Im zweiten Versuch, dem Langzeitversuch, zeigten sich diese theoretischen Überlegungen nicht. Die Muskelfaserfläche der *KO ovx*-Gruppe wies ähnliche Veränderungen wie die *E2*-Gruppe auf. Interessanterweise legte sogar die Gruppe *KO intakt*, wenn auch nicht signifikant, im Vergleich zur Gruppe *KO ovx* an Muskelfaserfläche zu. Eine Erklärung hierfür wäre, dass durch *ovx* die Aktivität der Ratten gehemmt wird (Latour et al. 2001; Fisher et al. 1998 + 2000). Durch die nun fehlende *ovx* konnten somit die Versuchstiere in der Gruppe *KO intakt* aktiver als die der Gruppe *KO ovx* sein und somit durch vermehrte Bewegung mehr an Muskelmasse zunehmen. Diese Mutmaßung würde auch für die Beobachtungen während des Versuchs sprechen. Sämtliche Tiere der *Ecd*-Gruppen sowie der Gruppen mit intakten Ovarien und *E2*-Gruppen schienen viel aktiver und agiler im Verhalten als die *KO ovx*. Im zweiten Versuch ergab sich für alle *Ecd*-Gruppen erneut eine deutlich größere Skelettmuskelfaserfläche des M. gastrocnemius als für die Gruppe *KO ovx*. Diese Ergebnisse zeigen den in einigen Tierversuchen bereits beobachteten anabolen Effekt von *Ecd*. Azizov und Seifulla konnten zeigen, dass Versuchstiere nach Gabe von *Ecd* signifikant länger laufen und schwimmen konnten (Azizov und Seifulla 1998; Lafont und Dinan 2003), während Syrov sogar einen anabolen Effekt durch *Ecd* bei Ratten ohne Muskeltraining nachweisen konnte (Syrov 1984; Lafont und Dinan 2003). Kholodova belegte, dass die bei bestehender Hypovitaminose D3 negativen Folgen bei Ratten durch *Ecd* ausgeglichen werden können und Muskel-ATP erhöhen (Kholodova et al. 1997; Lafont und Dinan 2003).

Wenn man beide Versuche mit ihren Versuchsergebnissen in Bezug auf die anabole Wirkung vergleicht, so wird im Kurzzeitversuch (s. c. Gabe von *Ecd*) eine stärkere anabole Wirkung

als im Langzeitversuch (orale Gabe von Ecd) deutlich. Eine Erklärung wäre die vermutete geringe Halbwertszeit des 20E, welche somit auf einen schnelleren Metabolismus bei oraler Gabe hindeutet (Lafont und Dinan 2003) als bei s.c. Injektion.

Im Langzeitversuch in der *Gruppe Ecd 3* mit intakten Ovarien sah man eine signifikant kleinere Skelettmuskelfaserfläche im Vergleich zu den Kontrolltieren sowohl ovx als auch intakt. Báthori zeigte 2008, dass Ecd seine anabole Wirkung über die Stimulation von Satellitenzellen verursacht und somit die Größe der Muskelfaser durch Erhöhung der myonuklearen Zellen bewirkt. Dieser Effekt soll, so vermutet Báthori, durch das Signal-Transduction System des IGF-1 verursacht werden (Báthori et al. 2008). Wenn man bedenkt, dass IGF-1 durch E2 gehemmt und durch ovx gefördert wird (Fisher et al. 2000), so würde in der *Gruppe Ecd 3 intakt* durch vermehrtes E2 gegenüber den *Ecd-Gruppen ovx* eine schwächere Stimulation des Ecd bewirkt werden, wenn nicht sogar überhaupt ausfallen.

4.3.1.1 IGF-1

Um dies genauer zu untersuchen, wurde im ersten Versuch nur bei den *Gruppen KO ovx* und *Ecd 25 ovx* das Serum-IGF-1 bestimmt, während im zweiten Versuch das Serum-IGF-1 von allen Gruppen bestimmt wurde. Im ersten Versuch zeigte sich somit, dass das IGF-1 in der *Gruppe Ecd 25 ovx* geringer ausfiel als in der *KO ovx-Gruppe*. Fungiert im Langzeitversuch die *KO ovx* als Kontrollgruppe, so existiert keine signifikante Zunahme des IGF-1 in den Versuchsgruppen. Bei den *Gruppen KO intakt, Ecd 1 ovx, Ecd 6 ovx* und *Ecd 3 intakt* ist der IGF-1 leicht reduziert, in der *Gruppe E2* und *Ecd 3 ovx* leicht erhöht. Nimmt man die *Gruppe KO intakt* als Kontroll-Vergleichsgruppe, welche somit den Ausgangswert des Versuchs simuliert, so zeigte sich in allen anderen Gruppen eine signifikante Erhöhung des IGF-1, allerdings unterschiedlich stark. IGF-1 stieg in der *Gruppe Ecd 3 intakt* am wenigsten an und würde somit den geringeren anabolen Effekt im Vergleich zu den anderen Gruppen erklären. Während das IGF-1 in den *Gruppen Ecd 1 ovx* und *Ecd 6 ovx* ähnlich anstieg, zeigte die *Gruppe Ecd 3 ovx* einen deutlicheren Anstieg. Somit würde der Anstieg des IGF-1 in den Ecd-Gruppen deren anabolen Wirkungen entsprechen und diese, wie Báthori vermutete, beeinflussen. Verschiedene Versuche zeigten, dass die Gabe von E2 bei ovx Ratten IGF-1 hemmt (Fisher et al. 1998 + 2000; Tsai et al. 2007). Dies zeigte sich in der Auswertung des zweiten Versuchs nicht, denn dort stieg das Serum-IGF-1 der *E2 ovx-Gruppe* im Vergleich zur *KO intakt-Gruppe*, ohne einen anabolen Effekt auf die Muskulatur zu zeigen. Eine Erklärung hierfür wäre die Hemmung der Muskelproteinbiosynthese und Abnahme der Skelettmuskelgröße bei ovx-Ratten nach E2-Gabe, was durch andere Studien bereits eindrucksvoll gezeigt wurde (Toth M et al. 2001; Tsai et al. 2007; Kumar et al. 2008).

4.3.2 Herzmuskulatur

Bis vor kurzem wurde in weiten Kreisen angenommen, dass die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Wirkung der Geschlechtshormone auf das kardiovaskuläre System und den Lipidmetabolismus die Ursache für die erhöhte Häufigkeit der KHK bei Frauen im Vergleich zu den Männern seien (Dietel et al. 2005). Östrogene erhöhen HDL, senken LDL (Rako 2009; Dietel et al. 2005), schützen die Muskelmembrane, erhöhen die Kontraktilität (Grohé et al. 1999), senken den Herzsympathikus und reduzieren dadurch die Herzfrequenz (Armstrong et al. 1996), während Androgene einen gegenteiligen Effekt auf das vaskuläre Endothel haben (Dietel et al. 2005; Hartgens und Kuipers 2004), eine Herzhypertrophie verursachen können und den Blutdruck erhöhen (Kutscher et al. 2002; Tsunoda 2001; Urhausen et al. 2003). Der auffallende Anstieg der KHK nach einer chirurgischen und der biologischen Menopause unterstützte die Hypothese, dass Östrogene kardioprotektiv wirken. Diese Beobachtungen führten zu einem weitläufigen Einsatz der postmenopausalen Hormonersatztherapie in der Primär- und Sekundärtherapie der KHK. Allerdings haben zwei klinische Meilensteinstudien, HERS und WHI, die Sichtweise der HRT stark verändert und ein ungünstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis aufgezeigt (Dietel et al. 2005).

Ob die anabol wirkende Substanz Ecd kardioprotektiv oder eher kardiodestruktiv ist, wurde bis jetzt nicht näher untersucht. Man weiß, dass Ecd die Proteinbiosynthese aktiviert, sich positiv auf Stress auswirkt, den Cholesterinwert senkt und direkt am Herzen antiarrhythmogen wirkt (Báthori und Pohgrác 2005). Ob Ecd aber eine Kardiomyopathie verursacht, wie es eine hoch dosierte Einnahme von Androgenen zeigt (Urhausen et al. 2003) oder nach ovx bei Ratten aufgrund des E2-Defizits beobachtet werden konnte (Grohé et al. 1999; Basaria et al. 2001), wurde noch nicht näher untersucht.

Im ersten Versuch wurde deutlich, dass es bei der Betrachtung der Rattenmyokardfasern in Unabhängigkeit vom Herzgewicht zu einer Vergrößerung der Fasern in der *Gruppe E2 ovx* und der *Gruppe Ecd 25 ovx* kam. Bezieht man allerdings das Gewicht des Herzens mit ein, so zeigten sich erneut deutlich größere Myokardfasern in der *Gruppe E2 ovx*, allerdings nur minimal vergrößerte Fasern in der *Gruppe Ecd 2 ovx*, sowie eine Abnahme der Faserfläche in den *Gruppen Ecd 10 ovx* und *Ecd 25 ovx*.

Im zweiten Versuch kam es zu ähnlichen Ergebnissen. Bei der Betrachtung der Myokardfasern allein wird deutlich, dass sämtliche Ecd-Gruppen keine signifikante Veränderung zur *KO ovx*-Gruppe aufweisen. Lediglich die *Gruppe E2 ovx* nahm signifikant an Myokardfaserfläche ab. Vergleicht man die Gruppen mit der *KO intakt*, welche die physiologisch normalen Tiere darstellen, so nahmen sämtliche Ecd-Gruppen signifikant an Myokardfaserfläche ab. Auch wenn die Myokardfaserfläche in Abhängigkeit zum erzielten

Rattenherzgewicht gesetzt wird, so nahm die *Gruppe E2 ovx* signifikant gegenüber der *Gruppe KO intakt* ab und sämtliche Ecd-Gruppen reduzierten im Vergleich zur *KO intakt* ihre Muskelfaserfläche, wenn auch nicht signifikant. Somit zeigte die Substanz Ecd keine anabole Wirkung auf die Herzmuskulatur, welches eine Kardiomyopathie verursachen könnte.

5. Zusammenfassung

Immer älter werdende Menschen, insbesondere Frauen in der Menopause, können durch den zunehmenden Mangel an E2, T und IGF-1 von bis zu 1 % pro Lebensjahr (Bauer et al. 2008) an einer Sarkopenie erkranken.

Des Weiterem tritt ein Verlust der Muskelmasse um bis zu 25 % ein, welcher mit einer erhöhten Anfälligkeit für Knochenfrakturen einhergeht, die zu starken Mobilitäts-einschränkungen und Folgeerkrankungen führen kann. Es kann somit ein Teufelskreislauf entstehen, dem man am liebsten durch nebenwirkungsarme Medikamente oder andere Methoden (z.B. Sport) entgegenwirken möchte (Sipila et al. 2001; Kumar et al. 2008). Ein Ansatz, die HRT-Therapie, zeigte bei postmenopausalen Frauen nur eine geringe Wirkung auf den Muskelverlust (Greeves et al. 1999; Kent-Braun und Alexander 1999; Armstrong et al. 1996; Ribom 2003). Sie linderte manch andere durch das E2-Defizit verursachte Nebenwirkungen, doch zeigte diese Therapie ein zu schlechtes Nutzen-Risiko-Verhältnis, da sich viele Nebenwirkungen ergaben (Hodges et al. 2000; Kley 1998; Ribom 2003).

Ein anderer Ansatz war die Gabe von T oder DHT bei postmenopausalen Frauen. Man sah durch die Gabe von Androgenen einen protektiven Effekt auf die altersbedingte Muskelabnahme (Basaria et al. 2001; Hartgens und Kuipers 2004; Wu 1997). Doch auf Dauer dominieren die Nebenwirkungen in einer Konzentration, die über dem physiologischen Bereich liegt (Hartgens und Kuipers 2004; Kutscher et al. 2002; Wu 1997) und durch die unter anderem das Herz irreversibel geschädigt werden kann (Tsunoda 2001; Urhausen et al. 2003).

Ein weiterer möglicher Ansatz bei postmenopausalen Frauen ist die Verwendung von Stoffen aus dem Tier- und Pflanzenreich, wie die Substanz Ecd. Die bisher unzureichend wissenschaftlich untersuchte Substanz gehört zu den Phytosteroiden. Eine gewisse anabole Wirkung konnte schon beim Menschen festgestellt werden (Báthori und Pohgrác 2005; Kley 1998), eine knochenprotektive Wirkung bei ovx-Ratten (Seidlová-Wuttke und Wuttke 2008), doch inwieweit die anabol wirkende Substanz dem Muskelabbau bei postmenopausalen Frauen entgegenwirken kann und ob sie, wie anabole Androgene, eine Kardiomyopathie verursachen könnte, wurde bis jetzt nicht näher untersucht. Zusätzlich sollte noch die

Veränderung der Substanz Ecd auf die Blutserumlipide untersucht werden, um eventuell eine Vorhersage über eine protektive Wirkung gegen KHK treffen zu können. Hierzu bekamen ovx-SD-Ratten die Testsubstanz Ecd und E2 im vierwöchigen Kurzzeitversuch subkutan injiziert und im dreimonatigen Langzeitversuch als Futterzusatz. Die Veränderung in der Skelettmuskulatur wurde abdominal und paratibial mittels qCT quantifiziert. Zusätzlich wurde histologisch die Muskulatur des M. gastrocnemius und des Herzen ausgewertet und nach dem Langzeitversuch das Rattenblutserum auf IGF-1 untersucht.

1. Futterverbrauch und Körpergewicht: Sowohl der Futterverbrauch als auch das Körpergewicht wurden im Vergleich zu den Ausgangswerten und den E2 ovx-Gruppen in allen Ecd-Gruppen gesteigert und zeigten sich ähnlich wie bei den Kontrolltieren, welche ovariectomiert waren. Dadurch, dass die Ecd-Gruppen im Vergleich zu den KO ovx- oder intakt-Gruppen eine deutlichere anabole Reaktion des Muskels zeigten, ist in diesen Gruppen die Gewichtszunahme eher dem Muskelzuwachs zuzuschreiben. Bei den Kontrolltieren resultiert die Körpergewichtszunahme vermutlich eher aus einer Zunahme des Fettgewebes.

2. Paratibiale Muskulatur im qCT: Während bei beiden Versuchen die SL1+2 (Nähe des Muskelansatzes) des qCTs ähnliche Werte bei den Ecd-Gruppen wie den Kontrollgruppen zeigten, so sah man eine signifikante Zunahme der Muskelmasse paratibial im SL3 (Nähe des Muskelbauches) im ersten Versuch der Ecd-Gruppe gegenüber der ovariectomierten Kontrollgruppe und eine leichte Zunahme der Muskelquerfläche paratibial der Ecd-Gruppen gegenüber der ovariectomierten Kontrollgruppe im Langzeitversuch.

3. Histologie des M. gastrocnemius: Hier zeigten sich erneut signifikante Veränderungen der Ecd-Gruppen in Bezug auf die ovariectomierte Kontrollgruppe. In beiden Versuchen nahmen die Tiere der Ecd-Gruppen an Skelettmuskelfaserfläche des M. gastrocnemius im Vergleich zur ovariectomierten Kontrollgruppe zu. Im Langzeitversuch sah man zusätzlich eine Zunahme der Skelettmuskelfaserfläche des M. gastrocnemius der Ecd-Gruppen gegenüber der intakten Kontrollgruppe.

4. Herzgewicht und Myokardhistologie: Das Rattenherzgewicht veränderte sich im Kurzzeitversuch gegenüber der ovariectomierten Kontrollgruppe kaum, nahm minimal sogar ab, während im Langzeitversuch eine signifikante Zunahme des Rattenherzgewichts in der Gruppe Ecd 6 ovx gegenüber der Kontrollgruppe zu beobachten war. In der histologischen Auswertung zeigte sich jedoch in beiden Versuchen keine signifikante Veränderung der Myokardfasern in den Ecd-Gruppen in Bezug auf die ovariectomierte Kontrollgruppen, was auf eine hypertrophe Kardiomyopathie hindeuten könnte. Selbst im Vergleich der Ecd-Gruppen zu den gesunden Tieren konnte eher eine Abnahme der Myokardfaserdicke beobachtet werden.

5. IGF-1: Im Kurzzeitversuch zeigte sich keine signifikante Veränderung des Serum-IGF-1 zwischen E2 und Ecd 25. Auch im Langzeitversuch zeigte sich keine signifikante Veränderung des IGF-1 in den Ecd Gruppen zum Vergleich zur KO ovx Gruppe. Jedoch ist das IGF-1 der Ecd Gruppen erhöht im Vergleich zur Ko intakt Gruppe. Selbst die Gruppe E2 zeigte eine signifikante Zunahme des IGF-1 im Vergleich zur KO intakt.

Fazit: Die Studie hat gezeigt, dass die anabole Wirkung der Substanz Ecd auch bei ovariectomierten Ratten sichtbar ist, ohne dabei die Herzmuskulatur negativ zu beeinflussen, indem es nicht wie anabole Steroide eine hypertrophe Kardiomyopathie verursacht hatte. Inwieweit diese Ergebnisse sich auf die Entwicklung einer Sarkopenie bei alten Menschen und vor allem auf postmenopausale Frauen übertragen lassen, bedarf weiterer Untersuchungen direkt am Menschen. Man kann aufgrund der Ergebnisse nur vermuten, dass durch Ecd der Muskelverlust im Alter und vor allem bei postmenopausalen Frauen aufgehalten werden könnte, ohne dabei die negativen Effekte der anabolen Steroide wie Kardiomyopathie oder die Verminderung von HDL zu haben.

6. Literaturverzeichnis

Alying B (2005): Director of the “Women’s Health Initiative 1993-2005” (WHI) ,
<http://www.whi.org> , <http://nhlbi.nih.gov/whi/> [online] 2010

Armstrong A L, Osborne J, Coupland C A (1996): Effect of hormone replacement therapy on muscle performance and balance in postmenopausal women. *Clin Sci* 91, 685-690.

Azizov A P, Seifulla R D (1998): The effect of elton, leveton, fitoton and adapton on the work capacity of experimental animals. *Eksp Klin Farmakol* 61, 61-63.

Basaria S, Wahlstrom J T, Dobs A S (2001): Anabolic-Androgenic Steroid Therapy in the Treatment of Chronic Diseases. *J Endocrinol Metabol* 86, 5108-5117.

Báthori M, Pohgrác Z (2005): Phytoecdysone - From Isolation to their Effects on Human. *Curr Med Chem* 12, 153-172.

Báthori M, Tóth N, Hunyadi A (2008): Phytoecdysteroids and Anabolic-Androgenic Steroids - Structure and Effects on Humans. *Curr Med Chem* 15, 75-91.

Bauer J M , Wirht R, Volkert D, Werner H, Siebert C, (2008): Malnutrition, Sarkopenie und Kachexie im Alter - Von der Pathophysiologie zur Therapie. *Dtsch Med Wochenschr* 113, 305-310.

Baumhoer D, Steinbrück I, Götz W: *Kurzlehrbuch Histologie*. 2.Aufl., Urban& Fischer Verlag, München/Jena 2003, S. 74-76

Beckett T, Tchernof A, Toth M, (2002): Effect of ovariectomy and estradiol replacement on skeletal muscle enzyme activity in female rats. *Metabolism* 51, 1397-1401.

Bein M: Der Einfluss von 20-Hydrpxyecdyson und 17 β -Östradiol auf das Colonepithel und die Serumfette der ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratte als Therapiemodell der postmenopausalen Frau. Med.-Diss. Göttingen: 2010.

Bhashin S, Storer T, Berman N, Callegri C, (1996): The Effect of supraphysiologic doses of Testosterone on muscle size and strength in normal men. *New Engl J Med* 335, 1-7.

Bühling K J , Lepenies J , Witt K: Intensivkurs - Allgemeine und spezielle Pathologie: 3. Aufl., Urban& Fischer, München/Jena 2004, S. 172.

Burguera B, Hofbauer C L, Thierry T (2001): Leptin Reduces Ovariectomy-Induced Bone Loss in Rats. *Endocrinology* 142, 3546-3553.

Constantino R, Santos R, Gisselbrecht F, (2001): The ecdysone inducible gene expression system. *Eur Cytokine Netw* 12, 3, 365-367

- Cosman F, Lindsay R, (1999):** Selective Estrogen Receptor Modulators Clinical Spectrum. *Endocr Rev* 20, 418-434.
- Dietel M, Suttorp N, Zeitz M:** Harrison - Innere Medizin. : ABW - Wissenschaftsverlag GmbH, Berlin 2005, S. 1463, 2246, 2459
- Dinan L, Lafont R (2006):** Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroid) in mammals. *J Endocrinol* 191, 1-8.
- Dobs A S, Nguyen T, Pace S (2002):** Differential Effect of Oral Estrogen versus Oral Estrogen-Androgen Replacement Therapy on Body Composition in Postmenopausal Women. *J Endocrinol Metabol* 87, 1509-1516.
- Evian W J, Campbell W E (1993):** Sarcopenia and Age-Related Changes in Body Composition and Functional Capacity. *Am Inst Nutrit* 93, 465-468.
- Ferretti J L (1999):** Peripheral quantitative computed tomography (pQCT) for evaluating structural and Mechanical Properties of small Bone. *J Musculoskel Neuron Interact* 25, 1-25.
- Fisher J S, Hasser M E, Brown M (1998):** Effects of ovariectomy and hindlimb unloading on skeletal muscle. *J Appl Physiol* 85, 1316-1321.
- Fisher J S, Kohrt M W und Brown M (2000):** Food restriction suppresses muscle growth and augments osteopenia on ovariectomized rats. *J Appl Physiol* 88, 265-271.
- Gower B A, Nyma L (2000):** Associations among Oral Estrogen Use, Free Testosterone Concentration, and Lean Body Mass among Postmenopausal Women. *J Clin Endocrinol* 85, 4476-4480.
- Greeves J P, Cable N T, Reilly T (1999):** Changes in muscle strength in women following the menopause: a longitudinal assessment of the efficacy of HRT. *Clin Sci* 97, 79-84.
- Grohé C, Meyer R, Vetter H (1999):** Östrogen und Myokard. *J Menopause* 6 12-16.
- Gurrieri E, Boes F (2009)** Verein "Qwanki Do - Wermelskirchen" Abbildung aus Internetseite: http://www.qwankidowermelskirchen.de/training/first_aid/muskelaufbau_3.jpg [Online] 2009
- Haehling S (2010):** Dietary Foods for Special Medical Purposes Containing Essential Amino Acids in Chronic Diseases and in Advanced Age. *Aktuel Ernährungsmed* 35, 115-123.
- Hartgens F, Kuipers, H (2004)** Effects of Androgenic-Anabolic Steroids in Athletes. *Sports Med* 34, 513-554.
- Hegstrom C D (1998):** Steroid and Neuronal Regulation of Ecdysone Receptor Expression during Metamorphosis of Muscle in the Moth, *Manduca sexta*. *J Neurosci* 18, 1786-1794.
- Herold G :** *Innere Medizin* . Köln 2009: Dr. med. Gerd Herold, S. 660

Hodges Y, Tung L, Yan X D, Graham D (2000): Estrogen Receptors α and β : Prevalence of Estrogen Receptor α and β mRNA. in Human Vascular Smooth Muscle and Transcriptional Effects. *Circulation* 101, 1792-1798.

Janssen I, Heymsfield S B, Ross R (2002): Low Relative Skeletal Muscle Mass (Sarcopenia) in Older Persons is Associated with Functional Impairment and Physical Disability. *J Am Geriatr Soc* 50, 889-896.

Janssen I, Shepard D S, Katzmarzyk P T (2004): The Healthcare Costs of Sarcopenia in the United States. *J Am Geriatr Soc* 52, 80-85.

Karim F D, Thummel C S (1992): Temporal coordination of regulatory gene expression by the steroid hormone ecdysone. *EMBO J* 11, 4083-4093.

Kent-Braun J, Alexander V (1999): Specific strength and voluntary muscle activation in young and elderly women and men. *J Appl Physiol* 87, 22-29.

Kholodova I D, Tugai V A, Zimina V P (1997): Effect of vitamin D3 and 20-hydroxyecdysone on the content of ATP, creatine phosphate, carnosine and Ca²⁺ in skeletal muscles. *Ukr Biokhim Zh* 69, 3-9.

Khushbatkova Z A, Azizova S S, Syrov V N, Umarova F T (1987): The Effect of celanide and ecdysterone on the activity of sodium-potassium ATPase in the myocardium. *Med Zhu Uzbek* 5, 68-70.

Kim H K, Nelson-Dooley C, Della-Fera M A (2006): Genistein decrease food intake, body weight, and fat pad weight and cause adipose tissue apoptosis in ovariectomized female rats. *J Nutrition* 136, 409-414.

Kley H K (1998): Medikamentenmissbrauch beim Freizeitsportler im Fitnessbereich. *Dtsch Arztebl* 16, 958-960.

Klinke R, Silbernagl S: *Lehrbuch der Physiologie.*: 4.Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003, S. 83, 106, 519.

Kobori M, Yamamuro T (1989): Effects of gonadectomy and estrogen administration on rat skeletal muscle. *Clin Orthop Rel* 234, 306-311.

Krinket G J: *The laboratory rat.* Academic Press, London 2000.

Kumar V, Atherton P, Smith K (2008): Human muscle protein synthesis and breakdown during and after exercise. *J Appl Physiol* 106, 2026-2039.

Kutscher E C, Lund B C, Perry P I (2002): Anabolic Steroids - A Review for the Clinician. *Sports Med* 32, 285-296.

Lafont R, Divan L (2003): Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J Insect Sci* 3, 7.

- Latour M G, Shinoda M, Lavoie J-M (2001):** Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *J Appl Physiol* 90, 235-241.
- Liu Y, Gampert L, Prokopchuk O, Steinacker J M (2007):** Satellitenzellaktivierung beim Krafttraining. *Dtsch Z Sportmed* 53, 6-11.
- Lovato T L, Benjamin A, Cripps R (2005):** Transcription of Myocyte enhancer factor-2 in adult *Drosophila* myoblast is induced by the steroid hormone ecdysone. *Devl Biolog* 288, 612-621.
- Lüllmann H, Mohr K, Wehling M:** *Pharmakologie und Toxikologie*. : 15. Aufl., Georg Thieme Verlag , Stuttgart 2003, S. 381
- Marsh J D, Lehmann M H, Ritchie R H (1998):** Androgen Receptors Mediate Hypertrophy in Cardiac Myocytes. *J Am Heart Assoc* 98, 256-261.
- Mayer F, Scharhag-Rosenberger F, Carlson A, Cassel M, Müller S, (2011):** Intensität und Effekt von Krafttraining bei Alter. *Dtsch Ärztebl* 21, 359-365.
- McClung J M, Davis J M, Wilson M A, Goldsmith E C (2006):** Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy. *J Appl Physiol* 100, 2012-2023.
- Miura Y, Kato H, Noguchi T (1992):** Effect of dietary proteins on insulin-like growth factor-1 (IGF-1) messenger ribonucleic acid content in rat liver. *Br J Nutr* 67, 257-65.
- Möllenhoff H (2007):** Best Ager on the Slope. *Aktuel Ernährungsmed* 32, 148-150.
- Monier B, Astier M, Sémériva M (2005):** Steroid-dependent modification of HOX function drives myocyte reprogramming in the *Drosophila* heart. *Development* 132, 5283-5193.
- Moran A L, Nelson S A, Landisch R M, Warren G L (2007):** Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. *J Appl Physiol* 102, 1387-1393.
- Morley J E, Kim M J, Haren M T, Kevorkian R, Banks W A (2005):** Frailty and the aging male. *Aging Male* 8, 135–140.
- Münzer T (2010):** Sarkopenie im Alter - Konzept, Klinik und Intervention. *Schweiz Med Forum* 10, 188-190.
- Nebendahl K:** *Routes of Administration - The laboratory rat*. Academic Press, London 2000
- No D, Tso-Pang Y, Evans R (1996):** Ecdysone-inducible Gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Genetic*, 93, 3346-3351.
- Norman K, Bauer J, Smoliner C, Lochs H, Pirlich M (2009):** Bedeutung der Proteinzufuhr bei der Entstehung und Behandlung der Sarkopenie. *Akt Ernährungsmed* 34, 171–177.

Notelovitz M D (2002): Androgen effects on bone and muscle. *Fertil Steril* 77, 34-41.

Rachon D, Voithems T, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W (2008): Effect of black cohosh extract on body weight gain, intraabdominal fat accumulation, plasma lipids and glucose tolerance in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Maturitas* 60, 209-215.

Rako S (2009): Testosterone deficiency and supplementation for women: what do we need to know.

www.centralpharmacy.nf.ca/.../Testosterone%20Deficiency%20and%20Supplementation%..

Rashid H, Ormerod S, Day E (2007): Anabolic androgenic steroids: what the psychiatrist needs to know. *Adv Psychiatr Treat* 13, 203-211.

Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J: Basislehrbuch Innere Medizin. 3.Auflage Verlag Urban& Fischer München/Jena 2006, S. 731, 776-777.

Ribom E L: Muscle, Estrogen, and Bone. Med-Diss ACTA Universitatis Upsaliensis, Uppsala, 2003.

Richard D (1986): Effects of ovarian hormones on energy balance and brown adipose tissue thermogenesis. *Am J Physiol* 250, 245-249.

Römmler A (2006): Substitution mit DHEA bei älteren Männern und Frauen - Lichtblicke als klinischen Studien. *Anti aging for professionals* 2, 20-30.

Roldán E, Capigliani R, Ferretti J L (2001): Postmenopausal changes in the distribution of the volumetric BMD of cortical bone. A pQCT study of the human leg. *J Musculoskel Neuron Interact* 2, 157-162.

Roudebush R E, Magee E D, Benslay N D (1993): Effect of Weight Manipulation on Bone Loss Due to Ovariectomy and the Protective Effects of Estrogen in the Rat. *Calcified Tissue Int* 53, 61-64.

Sayer A A (2010) Sarcopenia. *BMJ* 341, 4097.

Seidlová-Wuttke D, Wuttke W (2008): A Non-Estrogenic and Non-Androgenic Alternative to Estrogen and Androgen Replacement Therapy. *J Gynäkol Endokrinol* 2, 2-23

Seidlová-Wuttke D, Christel D, Kapur P, Nguyen B T, Jarry H, Wuttke W (2010): β -Ecdysone has bone protective but no estrogenic effects in ovariectomized rats. *Phymed* 17, 884-889.

Shepherd P (2004). Secrets of insulin and IGF-1 regulation of insulin secretion revealed. *Biochem J* 377, e1-2

Shinoda M, Latour M, Lavoie J, (2002): Effect of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Int J Obesity* 26, 335-343.

Sipila S, Taaffe D, Cheng S (2001): Effects of hormone replacement therapy and high-impact physical exercise on skeletal muscle in post-menopausal women: a randomized placebo-controlled study. *Clin Sci* 101, 147-157.

Sláma K, Lafont R (1995): Insect hormones - ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates. *Eur J Endocrinol* 92, 355-377.

Sower M F, Beebe J, McConnell D, Randolph J, Kannansch M (2001): Testosterone Concentrations in Women Aged 25-50 Years: Associations with Lifestyle, Body Composition, and Ovarian Status. *Am J Epidemiol* 153, 256-264.

Statistisches Bundesamt Wiesbaden 04.11.2010. Pressemitteilung Nr.401. [Online] Statistisches Bundesamt Wiesbaden, 04.11.2010.
http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2010/11/PD10_401_12621,templateId=renderPrint.psml.

Stauber M: *Gynäkologie und Geburtshilfe* : 2. Aufl., Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2005, S. 137

Steinacker J M, Wang L, Lormes W, Reißnecker S, Liu Y, (2002): Strukturanpassung des Skelettmuskels auf Training. *Dtsch Z Sportmed* 53, 354-360.

Stolze K: Wirkung von selektiven Östrogenrezeptormodulatoren auf Uterus/Vagina und Vesica urina ovariectomierter Ratten als Modell für die Hormonersatztherapie bei postmenopausalen Frauen. Med.-Diss. Göttingen: 2008.

Susan R (2009): Testosterone Deficiency and Supplementation for Women: What do we need to know. www.centralpharmacy.nf.ca. [Online] 2009

Suzuki S, Yamamuro T (1985): Long-Term effects of estrogen on rat skeletal muscle. *Exp Neurol* 87, 291-299.

Syrov V N (1984): Mechanism of the anabolic action of phytoecdysteroids in mammals. *Naeknye Doki Vyss Slikoly Biol Nauki* 11, 16-20.

Thakur M K (2003): Sex Steroid Signaling During Aging. *Mindfully.org*. www.Mindfully.org. [Online] 2003.

Toth M J, Poehlman T E, Dwight E (2001): Effects of estradiol and progesterone on body composition, protein synthesis, and lipoprotein lipase in rats. [Hrsg.] the American Physiological Society. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, 496-501.

Toth N, Hunyadi A, Báthori M, Zador E (2010): Phytoecdysteroids and Vitamin D Analogues - Similarities in Structure and Mode of Action. *Curr Med Chem* 17, 1974-1994.

Tran H T, Shaaban S, Askari H B (2001): Requirement of co-factors for the ligand-mediated activity of the insect ecdysteroid receptor in yeast. *J Mol Endocrinol* 27, 191-209.

- Tsai W-J A, McCormick K M, Brazeau D E (2007):** Estrogen Effects on Skeletal Muscle Insulin-Like Growth Factor-1 and Myostatin in Ovariectomized Rats. *Exp Biol Med* 1314-1325.
- Tsunoda K (2001):** Cardiovascular effects of dihydrotestosterone in rats. *Legal Med* 2, 95-104.
- Urhausen A, Albers T, Kindermann W (2003):** Are the cardiac effects of anabolic steroid abuse in strength athletes reversible? *Cardiovasc Med* 90, 496-501.
- Vanden Heuvel J (2009):** Cardiovascular Disease-related Genes and Regulation by Diet. *Curr Atheroscler Rep* 11, 448-455.
- Wade G, Gray J (1979):** Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. *Physiol Behavior* 22, 583-593.
- Weerden W M V, Bierings H G, v Steenbrugge G J (1992):** Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sci* 50, 857-861.
- Wenker A:** Wirkung von Silymarin und Östradiol auf die Genexpression verschiedener Herz-Kreislauf-Regulierender Gene und Rezeptoren in Herz und Aorta ovariectomierter Ratten. Med.-Diss. Göttingen: 2003.
- Wilborn C D, Taylor L, Campbell B (2006):** Effect of Methoxyisoflavone, Ecdysterone, and Sulfo-Ploysacharide Supplementation on Training Adaptions in Resistance-Trained Males. *J Int Soc Sport Nut* 3, 19-27.
- Wu F C W (1997):** Endocrine aspect of anabolic steroids. *Clin Chem* 43, 7.
- Zeitouni B, Sénatore S, Sèverac D, Aknin C (2007):** Signalling Pathways Involved in Adult Heart Formation Revealed by Gene Expression Profiling in Drosophila. *Bd PloS Genet* 3, 1907-1921.
- Zhao Z, Yang F, Wu X (2002):** Protective effect of β ecdysone on rat heart transplantation. *Chin J Mod App Pharma* 01
- Zhu J, Chen L, Raikhet A (2007):** District roles of Broad isoforms in regulation of the 20 hydroxyecdysone effector gene, Vitellogine in the mosquito *Aedes aegypti*. *Mol Cell Endocrinol* 267, 97-105.

7. Anhang

7.1. Abb. 28-32



Abb. 28 Käfighaltung der Versuchstiere



Abb. 29 qCT-scan der Versuchstiere



Abb. 30 Freipräparieren der Rattenherzen

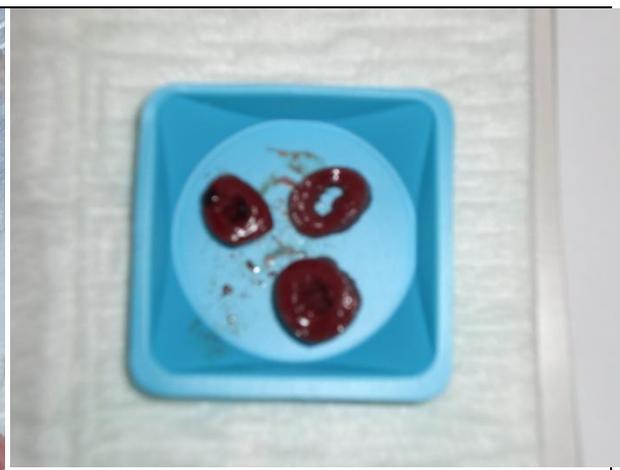


Abb 31 Rattenherz in einer Waagschale

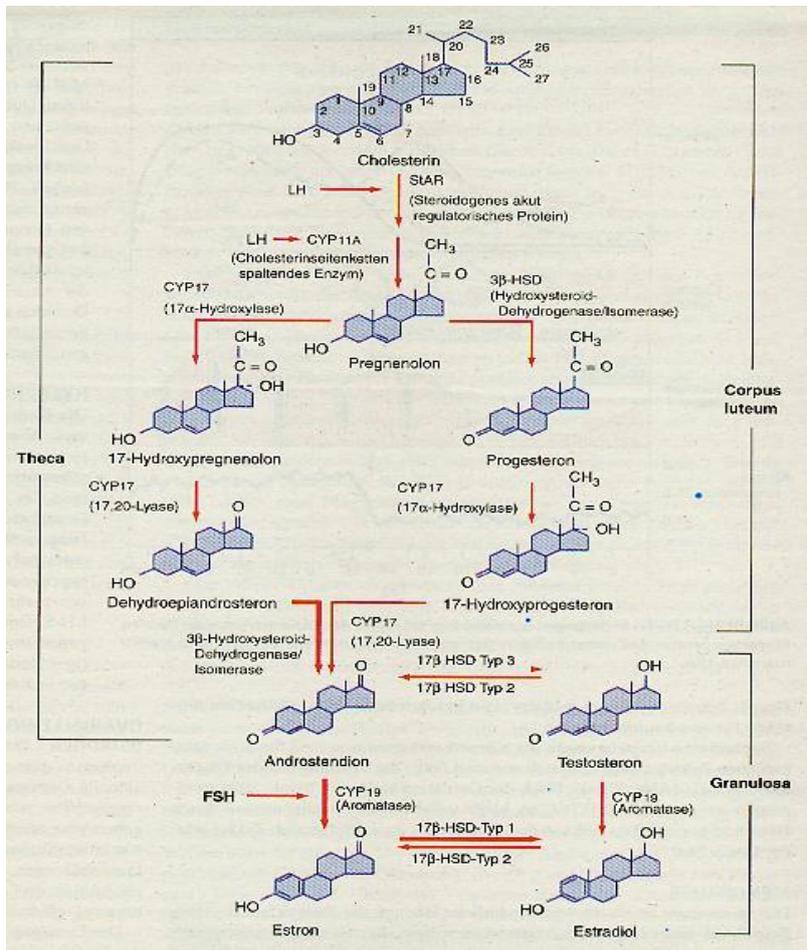


Abb. 32
 Stoffwechselwege der Steroidbiosynthese im Ovar. Die wichtigsten Enzymgruppen für Corpus Luteum, Stroma und Granulosazellen werden von den Klammern markiert. Die Hauptangriffspunkte des luteinisierenden Hormons (LH) und des Follikel stimulierenden Hormons (FSH) im Rahmen der Stoffwechselwege sind durch waagerechte Pfeile dargestellt (Abb. S. 2367 Dietel et al. 2005)

7.2 Tab. 4-6, 8-10

Tab. 4: **Schema der Organentwässerung:** durch Fr. Heidi Brüggemann-Meyer (MTA der Abteilung)

| Substanz | Einwirkzeit |
|------------------|-------------|
| 50%iger Alkohol | 1h |
| 75%iger Alkohol | 1h 20min |
| 75%iger Alkohol | 1h 20min |
| 96%iger Alkohol | 1h 20min |
| 96%iger Alkohol | 1h 20min |
| 100%iger Alkohol | 1h 20min |
| 100%iger Alkohol | 1h 20min |
| 100%iger Alkohol | 1h 20min |
| Xylol | 1h 20min |
| Xylol | 1h 20min |
| Paraffin | 1h |
| Paraffin | 1h |

Tab. 5: Schema der HE-Färbung:

| Substanz | Einwirkzeit |
|-----------------|-------------------------------------|
| Xylene | 5min |
| Xylene | 5min |
| Xylene | 5min |
| Ethanol 100% | 2min |
| Ethanol 100% | 2min |
| Ethanol 96% | 2min |
| Ethanol 96% | 2min |
| Ethanol 75% | 2min |
| Aqua dest. | 2min |
| Hämatoxilin | Je nach Versuch zwischen 20-40 sec. |
| Leitungswasser | 10min |
| Eosin | Je nach Versuch zwischen 20-40 sec. |
| Aqua bidest. | 5-10sec. |
| Ethanol 75% | 5sec. |
| Ethanol 96% | 1min |
| Ethanol 96% | 1min |
| Ethanol 100% | 2min |
| Ethanol 100% | 2min |
| Ethanol 100% | 2min |
| Xylene | 5min |
| Xylene | 5min |
| Xylene | 5min |

Tab. 6 Organhistologie:

| | Skelettmuskelfaser | Herzmuskelfaser |
|---|--------------------|-----------------|
| Schnitte/Tier | 10 | 10 |
| Vergrößerung im Mikroskop | 12,5x | 25x |
| mikroskopisch bearbeitete Schnitte/Tier | 2 | 2 |
| Foto/Schnitt/Tier | 1 | 4 |
| Anzahl d. ausgemessenen Muskelfasern/Foto | 10 | 10 |
| Totalanzahl d. ausgemessenen Muskelfaser/Tier | 20 | 80 |

Tab. 8: Lösungen zur subkutanen Applikation

| | |
|-----------------------|--|
| Ecdyson 2 mg/0,2 ml: | Gesamtmenge 40ml 0,4g in 1 ml 70% ETOH angelöst auf 8ml mit 2% Cremophor aufgefüllt mit NaCl auf das Gesamtvolumen von 40ml aufgefüllt Resultat ist eine klare Lösung |
| Ecdyson 10 mg/0,5 ml | Gesamtmenge 40ml 0,8g in 1 ml 70% ETOH angelöst auf 8ml mit 2% Cremophor aufgefüllt mit NaCl auf das Gesamtvolumen von 40ml aufgefüllt Resultat ist eine trübe Lösung |
| Ecdyson 25 mg/0,5 ml | Gesamtmenge 40ml 2g in 1 ml 70% ETOH angelöst auf 8ml mit 2% Cremophor aufgefüllt mit NaCl auf das Gesamtvolumen von 40ml aufgefüllt Resultat ist eine gesättigte Lösung |
| Kontrollen | 0,2ml NaCl jeweils 6 Tiere 0,2ml 2% Cremophor jeweils 6 Tiere |
| Estradiol 1 µg/0,2 ml | 5µg/ml 17-β-Estradiol in Benzylbenzoate (Sigma B-9550)/Rizinusöl 1:4 |

Tab. 9: Futtertabelle ssniff® R-Z, phytoöstrogenarm (sojafrei)

| Rohnährstoffe | % | Mineralstoffe | % | Fettsäuren | % |
|----------------------------------|----------|----------------------|----------|-----------------------|---------------|
| Trockensubstanz | 88,2 | Calcium | 1 | C 12:0 | |
| Rohprotein | 21,7 | Phosphor | 0,7 | C 14:0 | 0,01 |
| Rohfett | 4,3 | Natrium | 0,19 | C 16:0 | 0,56 |
| Rohfaser | 4,2 | Magnesium | 0,2 | C 16:1 | 0,01 |
| Rohasche | 6,1 | Kalium | 0,76 | C 18:0 | 0,08 |
| N-freie Extraktstoffe | 52,2 | Aminosäuren | | C 18:1 | 0,82 |
| Stärke | 43 | Lysin | 1,22 | C 18:2 | 2,26 |
| Zucker | 3 | Methionin | 0,44 | C 18:3 | 0,22 |
| Vitamine | Pro Kg | Met + Cys | 0,83 | C 20:0 | 0,01 |
| Vitamin A | 15.000IE | Threonin | 0,97 | C 20:1 | 0,02 |
| Vitamin D ³ | 1.000IE | Tryptophan | 0,28 | C 20:5 | |
| Vitamin E | 115mg | Arginin | 1,13 | C 22:6 | |
| Vitamin K | 5mg | Histidin | 0,51 | Spurenelemente | per kg |
| Vitamin B ¹ (Thiamin) | 18mg | Valin | 1,25 | Eisen | 169mg |

| | | | | | |
|-------------------------------------|---------|------------------|------|--------------------|--------------|
| Vitamin B ² (Riboflavin) | 22mg | Isoleucin | 1,03 | Mangan | 78mg |
| Vitamin B ¹² (Cobalamin) | 20mg | Leucin | 1,95 | Zink | 101mg |
| Vitamin B (Pyridoxin) | 100µg | Phenylalanin | 1,21 | Kupfer | 14mg |
| Nicotinsäure | 120mg | Phe + Tyr | 2,2 | Iod | 2,2mg |
| Folsäure | 7mg | Glycin | 1,05 | Selen | 0,4mg |
| Biotin | 460µg | Glutaminsäure | 3,96 | Cobalt | 2,2mg |
| Cholin – Cl | 2.380mg | Asparariginsäure | 2,18 | Energie | MJ/Kg |
| Inositol | 100mg | Prolin | 1,53 | Bruttoenergie | 16,8 |
| | | Alanin | 1,26 | Umsetzbare Energie | 13,3 |
| | | Serin | 1,17 | | |

Tab. 10 **Serumaufarbeitung:** durch Frau Maria Metten (MTA, Mitarbeiterin der Abteilung)

Nach Dekapitation wurde das Blut der Tiere aufgefangen -> Serum bei 3000rpm für 10min abzentrifugiert und bei -20°C gelagert. Bestimmung der Serumparameter mittels bestimmter Kits.

| Serum-Parameter | Kit |
|-------------------------------------|---|
| E2 | Beckmann Coulter, Sinsheim, Germany |
| Cholesterol, HDL, LDL, Triglyceride | Gemessen mit Hitachy 902 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) |

Danksagung

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. med. W. Wuttke für das Angebot und die Möglichkeit der Mitarbeit an den Ecdysonversuchen 2007 in seiner Abteilung und für die Bereitstellung des Arbeitsthemas. Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Wuttke für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die Möglichkeit der Nutzung der umfassenden Arbeitsmöglichkeiten in seiner Abteilung und die aufmerksame, kritische Beurteilung von Vorträgen, Fragestellungen und bei der Doktorarbeit. All dies hatte einen fördernden Einfluss auf die experimentelle und schriftliche Ausarbeitung.

Ein weiterer großer Dank gilt Frau PD Dr. med. D. Seidlová-Wuttke für ihre stets kompetente, aufmerksame und geduldige Unterstützung sowie Gesprächsbereitschaft während des experimentellen Anteils, insbesondere bei der histologischen Auswertung unter dem Mikroskop und bei der statistischen Ausarbeitung und grafischen Darstellung sowie für die fachliche Unterstützung im schriftlichen Teil.

Auch allen Mitarbeitern der Abteilung der Klinischen und Experimentellen Endokrinologie des Zentrums für Frauenheilkunde der Universitätsklinik Göttingen möchte ich für ihre freundliche Unterstützung danken. Hierbei ist speziell Frau H. Brüggemann-Meyer für die kompetente Einarbeitung und Unterstützung in die Laborarbeit zur histologischen Aufarbeitung hervorzuheben.