

Der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen
eingereicht von Priv.-Doz. Dr. med. D. Seidlová-Wuttke

Langfristige Auswirkungen von β -Ecdyson auf Knochen und
Knorpel

-Eine histomorphometrische Studie am osteoporotischen Tiermodell-

INAUGURAL- DISSERTATION

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

vorgelegt von

Anne Christine Lanzer

aus

San Francisco

Göttingen 2013

Die Arbeit entstand im Zeitraum 2010 bis 2013 in der Arbeitsgruppe Endokrinologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen.

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. med. D. Seidlová-Wuttke

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Michael Hüfner

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung.....	3
1.1 Krankheitsbild Osteoporose	3
1.1.1 Definition und Diagnostik.....	3
1.1.2 Prävalenz und Problematik.....	4
1.1.3 Einteilung, Ursachen und Risikofaktoren	5
1.1.4 Postmenopause und Osteoporose	5
1.1.5 Therapieansätze	7
1.2 Die ovariectomierte (ovx) Ratte als Modell der postmenopausalen Frau	8
1.3 Die Testsubstanz β -Ecdyson	9
1.3.1 Vorkommen und Funktion	9
1.3.2 Wirkungen von β -Ecdyson bei Säugetieren.....	11
1.4 Allgemeine Aspekte der Histomorphometrie	13
1.5 Fragestellung und Zielsetzung	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Durchführung des Tierversuchs.....	15
2.1.1 Allgemeines zur Haltung und Versorgung der Versuchstiere	15
2.1.2 Versuchsablauf	16
2.2 Herstellung der histologischen Präparate	18
2.2.1 Acrylat-Einbettung.....	18
2.2.2 Schneiden	19
2.2.3 Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner	19
2.3 Gemessene Parameter	20
2.3.1 Allgemeines zu den Messungen	20
2.3.2 Knorpelmessung.....	22
2.3.3 Messungen zu den einzelnen Zonen der Epiphysenfuge	24
2.3.4 Berechnung der Gesamtdicke der Epiphysenfuge	26
2.3.5 Kortikalismessung.....	27
2.3.6 Messung des Flächenanteils von Trabekeln, Fett und Knochenmark in der tibiären Metaphyse.....	28
2.3.7 Analyse der Trabekelvernetzung im metaphysären Bereich	29
2.4 Statistik.....	31
3. Ergebnisse.....	32
3.1 Gewichtsentwicklung und Futteraufnahme der Tiere	32

3.2 Ergebnisse der einzelnen Versuche.....	35
3.2.1 Untersuchung des Gelenkknorpels der proximalen Tibia	35
3.2.2 Gesamtdicke der Epiphysenfuge	36
3.2.3 Untersuchung der einzelnen Zonen der Epiphysenfuge	37
3.2.3.1 Dicke der Reservezone	37
3.2.3.2 Dicke der Proliferationszone	38
3.2.3.3 Dicke der hypertrophen Zone	39
3.2.4 Untersuchung der Kortikalis.....	40
3.2.5 Bestimmung des Trabekelanteils in der Metaphyse	41
3.2.6 Bestimmung des Fettanteils in der Metaphyse.....	42
3.2.7 Bestimmung des Knochenmarkanteils in der Metaphyse.....	43
3.2.8 Vernetzungsanalyse.....	44
3.2.8.1 Anzahl der freien Enden	44
3.2.8.2 Anzahl der Trabekelverbindungspunkte	45
3.2.8.3 Anzahl der Trabekelknotenpunkte	46
3.2.8.4 Index Knoten/freie Enden	47
4. Diskussion.....	48
4.1 Allgemeines zur Studie und zur Testsubstanz.....	48
4.2 Analyse der Untersuchungsergebnisse	49
4.2.1 Gewichtsentwicklung und Futteraufnahme der Tiere	49
4.2.2 Gelenkknorpel	50
4.2.3 Epiphysenfuge	52
4.2.4 Kortikalis	54
4.2.5 Trabekulärer Flächenanteil in der Metaphyse	56
4.2.6 Flächenanteil des Fettgewebes in der Metaphyse.....	57
4.2.7 Flächenanteil des Knochenmarks in der Metaphyse.....	58
4.2.8 Vernetzungsanalyse.....	60
4.3 Zusammenhänge der einzelnen Gewebearten	61
4.4 Schlussfolgerungen.....	63
5. Zusammenfassung.....	66
6. Anhang.....	69
7. Literaturverzeichnis.....	77
8. Abbildungsverzeichnis.....	88
9. Tabellenverzeichnis	91

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
B.Ar	<i>bone area</i> (hier: Fläche des spongiösen Knochens)
BMD	<i>bone mineral density</i>
BMI	<i>body mass index</i>
bzw	beziehungsweise
DEXA, DXA	<i>dual energy X-ray absorptiometry</i>
DVO	Dachverband Osteologie
Ecd	β-Ecdyson (Testsubstanz)
ER	Östrogenrezeptor
FRAX	<i>fracture risk assessment tool</i>
HRT	<i>hormone replacement therapy</i>
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
IL	Interleukin
int	intakt (belassene Ovarien, die zur Östrogenproduktion fähig sind)
NIH	National Institute of Health
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
ovx	ovarietomiert
Ovx	Ovariectomie
Priv.-Doz.	Privatdozent/in
p.o.	<i>per os</i>
pQCT	periphere quantitative Computertomographie
QCT	quantitative Computertomographie
RANK	<i>receptor activator of nuclear factor κB</i>
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor κB ligand</i>
S.D.	Sprague-Dawley
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwerts
sf	Soja-freies Futter, Kontrollfutter

SPA	<i>single-photon absorptiometry</i>
T.Ar	<i>tissue area</i> (Gesamtfläche des examinierten Gewebes)
TNF	Tumornekrosefaktor
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
vs	versus
WADA	World Anti-Doping Agency

1. Einleitung

1.1 Krankheitsbild Osteoporose

1.1.1 Definition und Diagnostik

Bei Osteoporose handelt es sich um eine systemische Skeletterkrankung, die mit einer verminderten Knochenmasse, Störung der Mikroarchitektur und einem erhöhten Frakturrisiko einhergeht (Consensus Development Conference 1993). Die Festigkeit und Belastbarkeit des Knochens wird durch zwei wesentliche Parameter bestimmt: die Knochendichte und die Knochenqualität (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy 2001).

Zur Messung der Knochendichte gibt es verschiedene Techniken. Als Beispiele sollen hier die Einzelphoton-Absorptiometrie (SPA), die Dualphotonenröntgenabsorptiometrie (DEXA oder DXA), die weitverbreitet als Standardmethode genutzt wird, und die quantitative Computertomographie (QCT) genannt werden. Laut der WHO-Definition von 1994 wird bei Frauen eine Osteoporose dann diagnostiziert, wenn der gemessene Knochendichte-Wert (*bone mineral density*= BMD) um 2.5 und mehr Standardabweichungen niedriger liegt als der eines gesunden Referenzkollektivs von jungen Erwachsenen (Kanis 1994). Diese Differenz in Standardabweichungen zwischen einem Individuum und der benannten Vergleichsgruppe wird als T-Score bezeichnet und kennzeichnet das Ausmaß des tatsächlichen Knochenverlusts. Liegt der T-Score zwischen -1 und -2.5 Standardabweichungen, handelt es sich um eine verminderte Knochendichte, auch Osteopenie genannt (Kanis 1994). Der Z-Score (ebenfalls in Standardabweichungen) bezieht die Knochendichte eines Individuums auf den Mittelwert einer Vergleichsgruppe gleichen Alters.

Es konnte gezeigt werden, dass allein die Knochendichtebestimmung nur teilweise Rückschlüsse auf Qualität und Funktionalität des Knochens zulässt (Borah et al. 2002, Dempster 2003). Die Knochenqualität hängt wesentlich von der Mikroarchitektur, dem Knochenumsatz (*turn over*), der Summe an Knochenschäden (z.B. Mikrofrakturen) und der Mineralisation des Knochens ab (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy 2001). Bei der Evaluation des Knochens spielt seine Mikroarchitektur demzufolge eine wichtige Rolle. Besonders das trabekuläre Netzwerk der Spongiosa ist von Interesse, da sich ein Östrogenmangel, wie er in der Postmenopause der Frau vorzufinden ist, vor allem dort bemerkbar macht. Parameter, die Aussagen über die spongiöse Mikroarchitektur ermöglichen, sind zum Beispiel Anzahl und Dicke der einzelnen

Trabekel, der Interkonnektivitäts-Index sowie Node/Termini-Index. Diese Parameter können durch histomorphometrische Methoden erfasst werden (Dalle Carbonare et al. 2005). Allerdings eignen sich diese histomorphometrischen Untersuchungen eher für die Forschung als für die klinische Praxis. Dort kommen bisher vor allem die bereits erwähnten Techniken der Knochendichtemessung zum Einsatz. Um die Spezifität und Sensitivität in der Erfassung Fraktur-gefährdeter Patienten zu erweitern, wurde von der WHO 2008 das sogenannte FRAX (*fracture risk assessment tool*) vorgestellt. Dabei werden klinische Risikofaktoren und die Knochendichte eines Patienten sowie epidemiologische Faktoren erfasst, verrechnet und als 10-Jahres Prognose für das Erleiden einer osteoporotischen Fraktur quantifiziert (Siris et al. 2010, Fardellone 2008).

1.1.2 Prävalenz und Problematik

Eine Analyse von anonymisierten Daten einer gesetzlichen Krankenkasse ergab, dass 2009 die Prävalenz von Osteoporose bei Personen, die 50 Jahre und älter waren, in Deutschland bei 14 % lag (Hadji et al. 2013). Aufgeschlüsselt nach Geschlecht lag die Prävalenz der Osteoporose bei 24 % für Frauen und 6 % für Männer (Hadji et al. 2013).

Durch die zunehmende Alterserwartung der Menschen ist die Tendenz deutlich steigend. Die klinische Manifestation der Osteoporose sind Frakturen; am häufigsten an Wirbelsäule, Hüfte und Handgelenk (Consensus Development Conference 1993).

Circa 75% der osteoporotischen Frakturen in den westlichen Ländern betreffen Frauen (Kanis 1994). So kommt nur eine von drei bis fünf Osteoporose-bedingten Hüftfrakturen bei Männern vor (Trombetti et al. 2002). Gründe für die geringere Frakturinzidenz bei Männern können beispielsweise sein, dass diese eine höhere *peak bone mass* entwickeln, eine kürzere Lebenserwartung haben sowie keinen beschleunigten, postmenopausal-bedingten Knochenverlust erleiden müssen (Trombetti et al. 2002).

Viele Studien haben gezeigt, dass sich die Lebenszeit von älteren Menschen, die eine Hüftfraktur erlitten haben, im Vergleich mit gleich alten Menschen ohne Hüftfraktur dramatisch verkürzt (Trombetti et al. 2002, Vestergaard et al. 2009, Vestergaard et al. 2007). Das National Institute of Health schrieb im Jahr 2001, dass von allen Patienten, die eine osteoporotische Hüftfraktur erleiden, 20% im ersten Jahr nach dem Ereignis sterben (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy 2001).

Von der Dramatik einer osteoporotischen Fraktur für den einzelnen abgesehen, bedeutet Osteoporose zusätzlich eine enorme finanzielle Belastung der Gesundheitssysteme. Schätzungen gehen von 17 bis 20 Milliarden Dollar an jährlichen Kosten allein für die USA aus (Becker et al. 2010).

1.1.3 Einteilung, Ursachen und Risikofaktoren

Man unterscheidet zwischen primärer und sekundärer Osteoporose. Zur ersten Gruppe gehören die juvenilen, prämenopausalen, postmenopausalen (=Typ I) und senilen (=Typ II) Osteoporosen. Hingegen sind sekundäre Osteoporosen als Folge einer anderen Grunderkrankung zu deuten. Diese können zum Beispiel endokrinologische, neoplastische, malabsorptive und viele andere Ursachen haben. Mit einem Anteil von circa 95 % stellen die primären Osteoporosen die weitaus häufigere Variante dar.

Viele Risikofaktoren zur Entwicklung einer Osteoporose wurden bislang aufgedeckt; Beispiele sind ein hohes Alter (speziell ≥ 65 Jahre), eine positive Familienanamnese, Geschlechtshormonmangel, weibliches Geschlecht, eine verminderte Exposition von Östrogenen (durch späte Menarche und frühe Menopause), vorangegangene Frakturen, ein geringes Körpergewicht, Zigaretten- und Alkoholkonsum, körperliche Inaktivität, verminderte Calcium-Aufnahme zudem Erkrankungen oder Medikamente, die einen negativen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel haben (DVO e.V. 2009, Schnatz et al. 2010, Lane 2006, Consensus Development Conference 1993).

1.1.4 Postmenopause und Osteoporose

Diese Arbeit befasst sich speziell mit der postmenopausalen Form der Osteoporose (Typ I). Die Postmenopause ist Teil des Klimakteriums der Frau. Das Klimakterium wiederum, umgangssprachlich auch „Wechseljahre“ genannt, bezeichnet den Übergang von der Geschlechtsreife in das Senium. Bedeutsam ist hierbei der Zeitpunkt der Menopause, die als die letzte ovariell gesteuerte Menstruation definiert ist. Sie wird nach einjähriger Amenorrhö retrospektiv festgestellt. Das Durchschnittsalter der Frauen zum Zeitpunkt der Menopause beträgt 51 Jahre (Janssen et al. 2008, Keller et al. 2010). Die Zeiträume des Klimakteriums, die vor bzw. nach der Menopause liegen, werden entsprechend als Prä- bzw.

Postmenopause bezeichnet. Die mit dem Klimakterium einhergehende Alterung der Ovarien, die sich zum Beispiel durch Gefäßsklerosierungen und Follikelverarmung ausdrückt, bedeutet eine hormonelle Umstellung für den Körper. Entscheidend ist dabei die kontinuierlich sinkende Östrogen- und Progesteronproduktion. Ein Anstieg der Gonadotropinspiegel im Blut und körperliche Veränderungen sind die Folgen. Das klinische Vollbild des Klimakteriums wird vor allem durch das Östrogenmangelsyndrom bestimmt. Typische Symptome beziehungsweise klimakterische Beschwerden sind plötzliche Hitzewallungen, nächtliches Schwitzen, Herzrasen, depressive Verstimmungen, Schlafstörungen, Gewichtszunahme sowie körperlicher als auch mentaler Leistungsabfall, Alopezie, Schleimhauttrockenheit und viele mehr. Zu den langfristigen Auswirkungen des Östrogenmangels zählt man insbesondere die Osteopenie sowie Osteoporose und die Arteriosklerose.

Östrogene spielen sowohl während des Knochenwachstums (Modeling) als auch für den Erhalt des Knochens, also den lebenslang anhaltenden Prozess des Knochenumbaus (Remodeling), beim ausgewachsenen Individuum eine entscheidende Rolle. Die zellulären Wirkungen von Östrogenen werden über verschiedene Wege vermittelt. Eine schnellvermittelte Antwort durch Östrogene erfolgt zum einen über Östrogenrezeptoren (ER), die in der Membran lokalisiert sind, zum anderen über Bindung von Östrogenen an den Membran-assoziierten Rezeptor GPR30/GPER (Nilsson und Gustafsson 2011). Der langsamere Weg der Östrogenwirkung wird an Knochen und anderen Geweben über zwei Typen von nukleären Rezeptoren vermittelt: ER α und β (Nilsson und Gustafsson 2011). Sie sind Steroidrezeptoren, die zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren gehören und nach Ligandenbindung und Dimerisierung als Transkriptionsfaktoren auf die Genexpression Einfluss nehmen. Es ist bekannt, dass Östrogene über ER α die Osteoklasten-Apoptose stimulieren und gleichzeitig die Apoptose der Osteoblasten und Osteozyten hemmen. Demzufolge bedeutet ein Östrogenmangel eine Verlängerung der Lebensspanne der Osteoklasten und eine verkürzte Lebensspanne für Osteoblasten (Khosla 2010). Die Balance zwischen Knochenresorption (durch Osteoklasten) und -formation (durch Osteoblasten) wird somit zugunsten der Resorption verschoben. Des Weiteren bewirkt ein Mangel an Östrogenen einen Anstieg von proresorptiven Zytokinen wie TNF α und IL-1 α im Knochenmark, die Vergrößerung des Pools an Osteoklasten-Vorläuferzellen sowie eine vermehrte Expression von RANKL (Khosla 2010). Das Schlüsselmolekül RANKL wird von

Osteoblasten produziert und stimuliert über RANK die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Osteoklasten.

Der postmenopausale Knochenverlust der Frau kann in zwei Phasen eingeteilt werden. Die erste Phase wird, bedingt durch die rasch abfallenden Östrogenspiegel, durch rapiden und massiven Knochenverlust charakterisiert. Es handelt sich hierbei um eine *high turnover*-Phase, wobei sowohl die Osteoblasten als auch die Osteoklasten eine gesteigerte Aktivität aufweisen. Eine Studie zur Analyse biochemischer Marker zeigte, dass die Knochenresorption zur Menopause um 90%, während die Knochenformation nur zu 45% ansteigt (Riggs et al. 2002). Hier betrifft der Knochenverlust vor allem die Spongiosa, wohingegen die kortikalen Verluste eher gering bleiben (Riggs et al. 2002, Genant et al. 2006).

Die sich anschließende zweite Phase (auch als senile oder *low turnover*-Phase bezeichnet) ist sowohl beim Mann als auch bei der Frau anzutreffen und zeichnet sich durch einen langsam-kontinuierlichen Knochenverlust aus. Vor allem der Östrogenmangel, aber auch andere Alterserscheinungen wie verminderte Nierenfunktion mit einhergehendem Vitamin D-Mangel und sekundärem Hyperparathyreoidismus, sind hier ursächlich (Riggs et al. 2002).

1.1.5 Therapieansätze

Nachdem der kausale Zusammenhang zwischen der postmenopausalen Osteoporose und dem Mangel an Östrogenen festgestellt worden war, schien die Hormon-Ersatztherapie (HRT) die sinnvollste Lösung zur Prophylaxe und Behandlung der Osteoporose zu sein. Eine Studie der Women's Health Initiative offenbarte jedoch eine erhöhte Inzidenz von Brustkrebs und kardiovaskulären Erkrankungen bei Frauen unter der kombinierten Therapie von Östrogen und Progestin (Rossouw et al. 2002). Danach wurde eine Langzeitbehandlung mit Östrogenen als umstritten bewertet. Laut aktuellen DVO-Leitlinien sollen Östrogene nur ausnahmsweise, zum Beispiel bei Versagen anderer Therapieoptionen, und nach „sorgfältiger individueller Abwägung von Nutzen und Risiken gemeinsam mit der Patientin“ zum Einsatz kommen (DVO e.V. 2009). Mittlerweile mehren sich allerdings Hinweise, dass HRT als Therapieoption der postmenopausalen Osteoporose wieder anerkannt wird (Stevenson et al. 2011). Die Leitlinien der DVO zur Osteoporosetherapie werden derzeit aktualisiert (Stand 04/2013).

Für folgende Medikamente ist eine effiziente Senkung des Frakturrisikos bei postmenopausalen Frauen am besten belegt (DVO e.V. 2009):

- Bisphosphonate: Alendronat, Ibandronat, Risedronat, Zoledronat
- Hormone oder Hormonfragmente: Östrogene, Teriparatid, Parathyroidhormon
- Selektive Estrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM): Raloxifen
- Strontium: Strontiumranelat.

Eine Prophylaxe kann durch Supplementierung von Vitamin D3 1000-2000 IE/täglich und Calcium 500 mg/täglich bei gegebener Indikation erfolgen. Die Suche nach anderen effektiven Therapiemöglichkeiten vor allem für die Langzeitanwendung läuft derweil weiter. Als Beispiele für neue Therapiemethoden sollen hier Denosumab (Prolia®), ein humaner monoklonaler Antikörper gegen RANKL, und Odanacatib, ein Cathepsin-K-Inhibitor, genannt werden (Rachner et al. 2011).

1.2 Die ovariectomierte (ovx) Ratte als Modell der postmenopausalen Frau

Die ovx Ratte stellt mittlerweile ein etabliertes Modell zur Abbildung ossärer Verhältnisse in der postmenopausalen Frau dar. Die Verwendung von Ratten hat sich aus folgenden Gründen bewährt: Die Haltung der Tiere ist einfach und sicher zu handhaben sowie mit vergleichsweise geringen finanziellen Kosten und räumlichen Anforderungen verknüpft. Entwicklung, Reproduktionszyklen sowie die Lebensdauer stellen überschaubare Zeiträume dar. Sowohl die postmenopausale Frau als auch die ovx Ratte verlieren Knochensubstanz als Folge des Östrogenmangels (Kalu 1991). Wie bei der postmenopausalen Frau kommt es bei der Ratte nach Ovx zuerst zu einer Phase des rapiden Knochenverlusts, wo besonders die Spongiosa betroffen ist. Dem schließt sich standortspezifisch eine Phase des langsameren Knochenabbaus an (Wronski et al. 1989). Die erste Phase ist, wie auch bei der postmenopausalen Frau, durch einen erhöhten Knochenumsatz (*turn over*) gekennzeichnet, wobei die Resorption die Formation überwiegt (Wronski et al. 1989). Die proximale Tibiametaphyse ist besonders schnell vom Trabekelverlust betroffen: 30-60 Tage nach Ovx beträgt der Knochenverlust hier schon etwa 50% (Jee und Yao 2001). Aufgrund ihrer hohen

Sensibilität für Östrogenmangel erscheint die tibiale Metaphyse daher für die Untersuchung und Erprobung potenziell osteoprotektiver Substanzen geeignet.

Trotz vieler Übereinstimmungen der Knochenphysiologie zwischen Mensch und Ratte existieren Unterschiede. So haben Ratten auch im hohen Alter, im Gegensatz zum Menschen, wo mit Abschluss der Pubertät das Wachstum durch den Epiphysenfugenschluss eingestellt wird, noch offene Epiphysenfugen (Roach et al. 2003). Die Aktivität der Rattenepiphysenfugen wird zu unterschiedlichen Zeitpunkten eingestellt, sodass das Wachstum der einzelnen Knochen unterschiedlich lange anhält. Beispielsweise endet das Wachstum an der distalen Tibia im Alter von 3 Monaten, wohingegen die proximale Tibia erst mit 15 Monaten das Wachstum einstellt (Jee und Yao 2001). Da die postmenopausale Osteoporose ein Erkrankungsbild des gealterten Knochens ist, muss bei der histomorphometrischen Untersuchung darauf geachtet werden, dass Bereiche des Knochens untersucht werden, die primär dem Remodeling und nicht dem Modeling unterliegen. Die Standardprozedur für die proximale Tibiametaphyse sieht daher vor, die Untersuchung einen Millimeter distal der Epiphysenfuge zu beginnen. Dies hat den Vorteil, dass die Analyse auf die Spongiosa beschränkt wird, wo vorwiegend Remodeling-Prozesse stattfinden (Jee und Yao 2001).

1.3 Die Testsubstanz β -Ecdyson

1.3.1 Vorkommen und Funktion

Die Substanz 20-Hydroxy- oder auch β -Ecdyson stellt den Hauptvertreter der Ecdysteroide dar (Dinan 2001). Ecdysteroide sind die Steroidhormone der Arthropoden (Gliederfüßer). Das β -Ecdyson wurde erstmals 1954 aus Puppen der Seidenraupe von Butenandt und Karlson isoliert (Karlson 1996). Seine Strukturformel (siehe Abbildung 1) wurde 1965 endgültig von Huber und Hoppe entschlüsselt und wird durch die Summenformel $C_{27}H_{44}O_6$ charakterisiert (Karlson 1996). Die Funktion der Ecdysteroide in Arthropoden beinhaltet die Regulierung von Häutung, Metamorphose, Reproduktion und Diapause (Dinan und Lafont 2006). Bei Insekten wird Ecdyson beispielsweise in der Prothoraxdrüse produziert und spielt als Häutungshormon für die verschiedenen Entwicklungsstadien eine entscheidende Rolle

(Campbell und Reece 2003). Die meisten Wirkungen von Ecdysteroiden werden dabei über die Bindung an einen intrazellulären Rezeptor vermittelt. Dieser Rezeptor entsteht durch die heterodimere Formation zweier Proteine: dem Ecdysteroid-Rezeptor (EcR) und dem Ultraspiracle-Protein (USP), welches analog beim Vertebraten als Retinoid-X-Rezeptor vorkommt (Yao et al. 1993). Beide Rezeptoren gehören zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren und dienen nach Bindung des Liganden als Transkriptionsfaktor (Mangelsdorf et al. 1995). Allerdings gibt es auch Effekte, die nicht über die Regulation der Genexpression vermittelt werden, sondern innerhalb kurzer Zeit und mithilfe Membran-gebundener Rezeptoren erzielt werden (Tomaschko 1999).

Das Vorkommen von Ecdyson beschränkt sich jedoch nicht nur auf Arthropoden; auch in Pflanzen, Pilzen und Algen konnte es nachgewiesen werden (Dinan 2009). Die pflanzlichen Analoga der Ecdysteroiden werden als Phytoecdysteroiden bezeichnet. Das Ecdyson stellt sowohl in den Phytoecdysteroid-haltigen Pflanzen als auch bei den Ecdysteroiden der Insekten den Hauptvertreter dar, wobei die Konzentration von Ecdysteroiden in bestimmten Pflanzen viel höher ist als in Insekten (Dinan 2001). Dinan führte 1995 Tests an Pflanzen im Hinblick auf deren Phytoecdysteroid-Gehalt durch. 5-6% der getesteten Pflanzenspezies waren dabei positiv für Phytoecdysteroiden (Dinan 2001). Beispiele für Phytoecdysteroid-enthaltende Pflanzen, die auch dem Menschen als Nahrung dienen, sind Spinat (*Spinacia oleracea*) und Quinoa (*Chenopodium quinoa*) (Dinan 2009). Die Funktion von Phytoecdysteroiden in Pflanzen ist nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass Phytoecdysteroiden zur Abwehr pflanzenfressender Invertebraten dienen, indem sie Häutungs- und körperliche Entwicklungsdefekte im Schädling hervorrufen (Dinan 2009). Es wurde zum Beispiel demonstriert, dass durch mechanische (Schmelz et al. 1998) oder Insekten-bedingte (Schmelz et al. 1999) Schädigung von Spinatwurzeln eine vermehrte Akkumulation von Phytoecdysteroiden induziert werden kann.

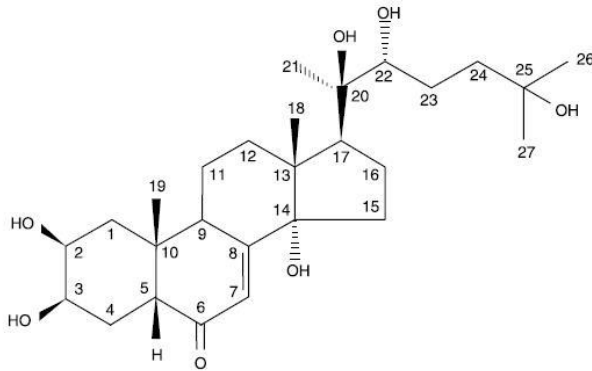


Abbildung 1: Strukturformel des β -Ecdysons ($C_{27}H_{44}O_7$)
(aus Dinan und Lafont 2006, S.2)

1.3.2 Wirkungen von β -Ecdyson bei Säugetieren

Ecdysteroide und somit auch Ecdyson werden nicht im Stoffwechsel von Säugetieren produziert, können aber durch Nahrungsaufnahme von Ecdysteroid-haltigen Pflanzen oder Insekten im Körper von Säugetieren nachgewiesen werden (Sláma und Lafont 1995, Dinan und Lafont 2006). Die akute Toxizität von Ecdysteroiden in Säugetieren ist als sehr niedrig zu werten: die mittlere letale Dosis von β -Ecdyson beträgt für Mäuse 6,4g/kg nach intraabdomineller Gabe und über 9g/kg nach oraler Applikation (Sláma und Lafont 1995). Eine Reihe von Wirkungen bei Säugetieren konnte bislang festgestellt werden. Zudem wurden bei einer Reihe von traditionellen Heilpflanzen reiche Vorkommen an Ecdysteroiden nachgewiesen; so zum Beispiel bei *Leuzea carthamoides*, welches im asiatischen Raum wegen seiner stärkenden und antidepressiven Wirkung Verwendung findet (Sláma und Lafont 1995). Die wohl am besten dokumentierte Wirkung beinhaltet die gesteigerte Proteinsynthese durch Ecdysteroide. Otaka et al. (1968) und Okui et al. (1968) demonstrierten als Erste eine anabole Wirkung von Ecdyson auf die Proteinsynthese in Mäuselebern. Nachfolgende Versuche, zum Beispiel an Ratten, Schafen und Schweinen, bestätigten anabole Effekte von Ecdyson (Dinan 2009). Zudem konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass allein die Applikation von Ecdyson die physische Ausdauer ohne

vorhergehendes Training steigern kann (Chermnykh et al. 1988). Ecdyson steigert sowohl die Proteinsynthese in Skelettmuskelzellen (Gorelick-Feldman et al. 2008) als auch die Größe der einzelnen Fasertypen im Muskel von Ratten (Tóth et al. 2008). Oehme et al. (2006) publizierten über anti-apoptotische Effekte von Ecdyson-Analoga.

Von Interesse für diese Studie sind insbesondere bisherige Ergebnisse über Wirkungen an Knochen und Knorpel. Syrov et al. demonstrierten 1986, dass die orale Einnahme von β -Ecdyson (5mg/kg) bei Ratten zu einem beschleunigten Heilungsprozess von Knochenfrakturen führte (Lafont und Dinan 2003). Desweiteren wurde herausgefunden, dass β -Ecdyson die Proliferation von Osteoblasten-ähnlichen UMR106-Zellen fördert (Gao et al. 2000). β -Ecdyson stimuliert *in vitro* die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen und wirkt vorbeugend gegen osteoporotische Prozesse bei der Maus (Gao et al. 2008, Wu et al. 2010). Untersuchungen an ovx Ratten konnten protektive beziehungsweise stimulierende Wirkungen von β -Ecdyson auf Epiphysenfuge und Gelenkknorpel von Tibiaknochen belegen (Kapur et al. 2010). Auch knochenprotektive und muskelanabole Effekte von β -Ecdyson bei ovx Ratten wurden in Studien unserer Abteilung demonstriert (Seidlová-Wuttke et al. 2010 a, Seidlová-Wuttke et al. 2010 b). Tabelle 1 im Anhang fasst bisher erforschte Wirkungen von β -Ecdyson als Überblick zusammenfassen.

Insgesamt scheinen die Wirkungen von Ecdyson im Säugetier durchaus positiv zu sein, allerdings fehlen ausgedehnte Studien zur Evaluierung von Langzeiteffekten. Außerdem besteht weiterhin Unklarheit darüber, wie die Effekte von Ecdyson im Säugetier biochemisch vermittelt werden, da Ecdysteroid-Rezeptoren im Säugetier nicht exprimiert werden (Palli et al. 2005). Trotz der strukturellen Verwandtschaft mit humanen Steroidhormonen konnte keine Interaktion zwischen β -Ecdyson und zytosolischen Steroidrezeptoren (Östrogen-, Glukokortikoid- und Androgenrezeptoren) festgestellt werden (Seidlová-Wuttke et al. 2010 a, Báthori et al. 2008). Somit lässt sich nicht sagen, ob die bisher gemessenen Effekte von β -Ecdyson durch eine direkte Wirkung am Gewebe oder durch indirekte Einflüsse vermittelt werden.

Anwendung findet Ecdyson heute in vielerlei Hinsicht: Mittlerweile gibt es viele Ecdyson-haltige Präparate auf dem Markt, die im Leistungssport oder Bodybuilding aufgrund der Muskel-anabolen Wirkung genutzt werden. Ecdyson ist nicht Bestandteil der „Prohibited List 2013“ der WADA (World Anti-Doping Agency 2013). Zudem gibt es eine Anzahl von

Patenten, denen eine vorteilhafte Ecdyson-Wirkung zu Grunde liegt; beispielsweise zur Wundheilung und Hautregeneration von β -Ecdyson oder als orales Antidiabetikum (Lafont und Dinan 2003). Ein weiteres Forschungsgebiet, auf dem Ecdyson, seine Abkömmlinge und der Ecdysteroid-Rezeptor Aufmerksamkeit finden, betrifft die Gen-Therapie. Es wird dabei nach Möglichkeiten gesucht, krankheitsverursachende Gene oder Gene generell (z.B. bei Pflanzen) in ihrer Aktivität zu regulieren. Modifizierte Ecdysteroid-Rezeptoren und ihre Aktivatoren (z.B. das Ecdysteroid Muristeron A) sind dabei als Genregulationssysteme oder „gene-switch elicitors“ von Interesse (Dinan 2009).

1.4 Allgemeine Aspekte der Histomorphometrie

Mithilfe der Histomorphometrie können zweidimensionale Studien zur Evaluierung der Mikroarchitektur des Knochens durchgeführt werden. Sie bietet im Vergleich zu anderen bildgebenden Verfahren, wie zum Beispiel QCT und Mikro-CT, den Vorteil einer sehr hohen Bildauflösung (Lelovas et al. 2008). Als Einschränkung in der Histomorphometrie gilt hingegen die vergleichsweise geringe Größe des untersuchten Areals (Lelovas et al. 2008). Bei dem Vergleich von jeweils mit 2-D Histomorphometrie und 3-D Mikro-CT-Technik gemessenen Variablen konnte eine gute bis sehr gute Korrelation zwischen den Resultaten beider Techniken festgestellt werden (Akhter et al. 2007, Chappard et al. 2005, Müller et al. 1998).

Ziel der zweidimensionalen Studien ist es, möglichst genaue Aufschlüsse über die dreidimensionale Knochenarchitektur zu gewinnen. Parameter, die sich auf zwei Dimensionen beziehen, heißen Fläche, Umfang, Breite und Anzahl, wohingegen die auf drei Dimensionen bezogenen Parameter als Volumen, Oberfläche und Dicke bezeichnet werden (Parfitt 1988). Ein Komitee der American Society of Bone and Mineral Research gab 1987 die Empfehlung zur Standardisierung der Nomenklatur für die Histomorphometrie des Knochens heraus. Diese sieht vor, dass Ergebnisse bevorzugt als dreidimensionale Parameter präsentiert werden, da der Knochen nur als dreidimensionale Struktur völlig verstanden werden kann (Parfitt et al. 1987).

Histomorphometrische Parameter werden in zwei Kategorien geteilt: Remodeling- und strukturelle Parameter (Kulak und Dempster 2010). Letztere geben Aufschluss über Masse

und die strukturelle Mikroarchitektur des Knochens. Zu den strukturellen Parametern gehören zum Beispiel die Breite der Kortikalis und die Breite der spongiösen Trabekel. Parameter, die hingegen Remodeling-Prozesse untersuchen, messen beispielsweise die Masse an nicht-mineralisiertem Knochen oder die Rate der Knochenformation pro Tag (Kulak und Dempster 2010).

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Effekte einer langfristigen, oralen Applikation von β -Ecdyson auf Knochen, Knorpel, Markfett und Knochenmark histomorphometrisch zu untersuchen. Hierfür wurden Gewebe von ovx Sprague Dawley (S.D.)-Ratten mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit für eine Osteopenie und Gewebe von Ovar-intakten S.D.-Ratten analysiert und miteinander verglichen. Die Analyse fokussierte sich auf die proximale Tibia, da diese besonders schnell auf hormonelle Schwankungen reagiert. In anderen Studien wurden bereits osteo- und chondroprotektive Eigenschaften des β -Ecdysons beschrieben (Coors 2010, Gao et al. 2008, Kapur et al. 2010, Seidlová-Wuttke et al. 2010 a, Seidlová-Wuttke et al. 2010 b, Walliser 2009, Wu et al. 2010). Im Gegensatz zu diesen Studien, die an Zellkulturen oder Ratten bei deutlich kürzerer Substanzexposition vorgenommen worden waren, soll diese Arbeit Aufschluss über die osteochondralen Auswirkungen einer langfristigen β -Ecdyson Applikation geben.

Meine Aufgabe in diesem Versuch war die Färbung der Tibiapräparate in Zusammenarbeit mit den Medizinisch-technischen Assistentinnen der Abteilung sowie die histomorphologische Untersuchung und Auswertung der Präparate in Bezug auf ausgewählte Parameter. Von besonderem Interesse war dabei, ob Vorteile aus der Applikation von β -Ecdyson zu evaluieren sind, inwieweit die Ergebnisse denen vorheriger Studien gleichen (Gao et al. 2008, Kapur et al. 2010, Seidlová-Wuttke et al. 2010 a, Seidlová-Wuttke et al. 2010 b, Wu et al. 2010, Walliser 2009, Coors 2010) und wie die Substanz im Hinblick auf eine mögliche Rolle als Medikament gegen postmenopausale Osteoporose zu beurteilen ist.

2. Material und Methoden

2.1 Durchführung des Tierversuchs

2.1.1 Allgemeines zur Haltung und Versorgung der Versuchstiere

Die Genehmigung für die Durchführung des Tierexperiments wurde von der Bezirksregierung Braunschweig erteilt (Genehmigungsnummer Az.G.82.06). Für den Versuch unter der Leitung und Aufsicht von Priv.-Doz. Dr. med. Seidlová-Wuttke wurden 20 weibliche Ratten vom Typ Sprague-Dawley verwendet, die von der Harlan Winkelmann GmbH (Borchen) geliefert wurden. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tiere zwei Monate alt und somit im geschlechtsreifen Alter.

Die Unterbringung erfolgte in Makrolonkäfigen (Typ IV, Firma Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg) in den Tierställen des Universitätsklinikums Göttingen. Je 5 Tiere teilten sich einen solchen Käfig. Die Räume waren vollklimatisiert, fensterlos und von täglich 6 bis 18 Uhr belichtet. Es herrschten eine konstante Temperatur von 23°C sowie eine Luftfeuchtigkeit von 50-55%.

Jeder Ratte wurde zur späteren Identifizierung ein UNO MICRO-ID Transponder (Firma UNO ROEVASTAAL BV Zevenaar, Niederlande) subkutan in die Nackenregion eingesetzt. Das dazugehörige Transponder Lesegerät (Gesreader II GE S008: ISO kompatibler Taschenleser) stammte von derselben Firma.

In der Eingewöhnungszeit von einem Monat wurden alle Tiere mit demselben phytoestrogenarmen Pellet-Futter V 1354-000 ssniff R-Z der Firma ssniff® Spezialdiäten GmbH (Soest, Deutschland) gefüttert (siehe Abb. 28). Da Sojabohnen osteoprotektiv wirken (Sugiyama et al. 2006), wurde den Tieren dieses Soja-freie Futter verabreicht, um mögliche Störvariablen zu vermeiden.

Futter und Wasser waren jederzeit frei zugänglich für die Tiere. Die Menge an angebotenem Futter wurde vorher abgewogen. Nach einer Woche wurde das noch nicht gefressene, restliche Futter der einzelnen Käfige gewogen und die Differenz, also die Menge an gefressenem Futter pro Käfig, errechnet. Dieser Wert wurde durch die Anzahl der Tiere pro Käfig und durch die Anzahl der Tage der Zeitspanne jeweils dividiert. So konnte die durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier pro Tag der jeweiligen Gruppe berechnet werden.

Die Versorgung der Versuchstiere wurde durch die Medizinisch-technischen Assistentinnen der Abteilung Endokrinologie der UMG gewährleistet.

2.1.2 Versuchsablauf

Die 20 Ratten wurden in vier Gruppen à 5 Tiere eingeteilt. Die Zuordnung erfolgte randomisiert. Die Unterscheidungsmerkmale der einzelnen Gruppen waren, ob die Tiere ovariectomiert wurden oder int blieben und ob sie das Kontroll- oder das β -Ecdyson-enthaltende Futter erhielten.

Tabelle 2: Übersicht über die einzelnen Gruppen und ihre Merkmale				
Ovariectomie (Ovx)	Intakte Eierstöcke (int)	Soja-freies Kontrollfutter (sf)	β -Ecdyson-enthaltendes Futter (Ecd)	Gruppe:
x		x		ovx, sf
	x	x		int, sf
x			x	ovx, Ecd
	x		x	int, Ecd

Kurz vor dem eigentlichen Versuchsbeginn und somit vor der Ovx und Futterumstellung wurden die Tiere im Alter von drei Monaten gewogen und einer peripheren quantitativen Computertomographie (pQCT) unterzogen.

Zum Zeitpunkt der Ovx waren die S.D.-Ratten etwa drei Monate alt. Die Ovx wurde von Priv.-Doz. Dr. med. Seidlová-Wuttke durchgeführt und erfolgte unter Vollnarkose durch das Inhalationsanästhetikum Forene® der Firma Abbott (Illinois, USA, Wirkstoff: Isofluranum). Für die Ovx wurde das Abdomen rasiert und desinfiziert. Nach der Eröffnung der Bauchhöhle wurden die Ovarien beidseitig abgeklemmt und entfernt. Die Muskulatur wurde mit dem Peritoneum vernäht (Naht Vicryl®, Firma Ethicon, Norderstedt). Die Haut wurde mithilfe von Michel-Klammern® (Firma Martin, Tuttlingen) verschlossen. Analgesie wurde durch den Einsatz von Rimadyl® (Pfizer GmbH, Karlsruhe, Wirkstoff: Carprofen) gewährleistet. Jene Tiere, die für die int Gruppen bestimmt waren, wurden einer Scheinoperation unterzogen, bei der das Abdomen mit derselben Vorgehensweise eröffnet und wieder verschlossen wurde. Nach der Operation wurden alle Tiere bis zum Erwachen aus der Narkose in einen zweiten Käfig gelegt. Nachdem kontrolliert worden war, dass die Wunden nicht nachbluteten, wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgebracht.

Die Applikation der Substanz β -Ecdyson erfolgte per os. Das Ecdyson-haltige Futter wurde von der Firma ssniff® (Spezialdiäten GmbH, Soest) für die Gruppen ovx, Ecd und int, Ecd in einer Konzentration von 3g/kg Futter angefordert. Das β -Ecdyson wurde von der Firma Changzhou Dahua Imp. und Exp. (Group) Corp. Ltd. (Changzhou, Jiangsu, China) bezogen (Reinheitsgrad 97.2%). Die Gruppen ovx, sf und int, sf erhielten weiterhin Soja-freies Kontrollfutter. Die Futterumstellung begann direkt nach der Ovx.

Bei den vorausgehenden Versuchen der Abteilung hatte sich gezeigt, dass die gemessenen Effekte von β -Ecdyson oft nicht Dosis-korreliert waren (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b). Aus den Kenntnissen der Vorversuche wurde die mittlere Dosierung von 3 g Ecd/kg Futter als die günstigste für diesen Versuch gewählt (Walliser 2009).

Der Zeitraum des Versuchs erstreckte sich über insgesamt 12 Monate. Dazwischen wurden regelmäßige Messungen des Gewichts und der Knochendichte durchgeführt. Letzteres geschah mithilfe eines peripheren quantitativen Computertomographen. Die Abbildungen 26 und 27 im Anhang zeigen die Messungen zur endostealen Dichte (in mg/cm^3), die als Dichte der Spongiosatrabekel definiert wurde. Der endosteale Raum beinhaltet hauptsächlich die trabekuläre Spongiosa, Fett und Knochenmark.

Gewogen wurden die Tiere insgesamt fünf Mal (Waage: Basic Lite 3, Sartorius, Göttingen). Tabelle 3 zeigt eine Zeitachse zum Versuchsverlauf in Bezug auf das Alter der S.D.-Ratten. Die Gewichts- und pQCT-Messungen sowie die Dekapitation der Ratten im Alter von 15 Monaten erfolgten durch die Medizinisch-technischen Assistentinnen sowie Priv.-Doz. Dr. med. Seidlová-Wuttke.

Tabelle 3: Ereignisse im Hinblick auf das Alter der Ratten in Monaten	
Alter der Ratten (in Monaten)	Ereignis
2	Ankunft der Tiere
3	CT 1 und Gewichtsmessung 1 Gruppeneinteilung: Ovx und Futterumstellung Versuchsstart
4	CT2 und Gewichtsmessung 2
7	CT 3
8	Gewichtsmessung 3
10	CT 4 und Gewichtsmessung 4
12	CT 5
15	Gewichtsmessung und CT 6 der Gruppen int, sf und int, Ecd Obduktion der Tiere

2.2 Herstellung der histologischen Präparate

2.2.1 Acrylat-Einbettung

Die durch die Obduktion gewonnenen Tibiaknochen der Sprague-Dawley-Ratten wurden mithilfe einer Zange und in ausreichendem Abstand zur Epiphysenfuge gekürzt. Es wurden die Tibiaknochen des linken Beines verwendet. Die nächsten Arbeitsschritte sahen die Fixation des Gewebes und seine anschließende Dehydrierung mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe vor. Danach wurden die Schnitte in ein Xylol-haltiges Intermedium gegeben. Anschließend wurde eine Einbettung der Gewebe in Technovit 9100 NEU® (Firma Heraeus Kulzer, Wehrheim) angestrebt. Es handelt sich dabei um ein Polymerisationssystem auf der Basis von Methylmethacrylat, das bei Minustemperaturen aushärtet. Hierfür erfolgten nacheinander die Präinfiltration und schließlich die finale Infiltration des Knochengewebes durch das Einbettungssystem. Für den genauen Ablauf soll an dieser Stelle auf Tabelle 4 „Vorbehandlung des Gewebes“ im Anhang verwiesen werden. Die Acrylat-Einbettung der Tibiaknochen wurde von den medizinisch technischen Assistentinnen vorgenommen.

2.2.2 Schneiden

Die Erstellung der Präparate begann nach der vollständigen Aushärtung der Polymerisate. Die folgenden Schritte zur Präparatherstellung wurden von mir unter Anleitung von Heidi Brueggemann-Meyer ausgeführt. Zum Schneiden der polymerisierten Technovit-Blöcke diente ein Leica Mikrotom (RM 2165). Die Schnitte wurden longitudinal zur Knochenachse und in einer Dicke von 5 µm hergestellt. Als Schneidflüssigkeit diente hierfür 30%iges Ethanol. Die geeigneten Schnitte wurden vorsichtig auf Objektträger (SuperFrost Ultra Plus®, Menzel-Gläser, Braunschweig) gelegt, mit 50%igem Ethanol gestreckt und mit Kisol-Folie (Firma Kettenbach, Eschenburg) abgedeckt. Bei der folgenden Auswahl der Präparate wurde darauf geachtet, dass benachbarte Schnitte aus dem mittleren Bereich verwendet wurden und dass die Strukturen nicht zerrissen oder anderweitig beschädigt waren. Anschließend wurden sie für einen halben Tag bei 57°C im Trockenschrank gepresst.

2.2.3 Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner

Vor Beginn der eigentlichen Färbeprozedur musste die Entplastung, das heißt die Entfernung des Acrylats, der in Technovit eingebetteten Gewebe erfolgen. Hierfür wurden die Objektträger mit den darauf positionierten Gewebeschnitten nacheinander in die folgenden Medien eingetaucht:

- drei Mal je 20 Minuten in Xylol
- zwei Mal je 15 Minuten in 2-Methoxyethylacetat
- zwei Mal je 5 Minuten in Aceton
- zwei Mal je 2 Minuten in destilliertes Wasser.

Zur Vorbereitung für die Trichromfärbung nach Masson-Goldner wurden die für den Färbeprozess benötigten Lösungen hergestellt (Tabelle 5 im Anhang).

Der eigentliche Färbeprozess begann danach mit dem zehnminütigen Eintauchen der Objektträger und der darauf befindlichen Tibiaschnitte in Weigerts Hämatoxylin-Lösung. Danach erfolgte das sogenannte „Bläuen“. Hierfür wurden die Präparate für zehn Minuten unter laufendes Leitungswasser gehalten. Der nächste Schritt sah das Einbringen der Objektträger in die Ponceau de Xylidine-Lösung für 45 Minuten vor. Anschließend wurden sie zuerst mit 1%iger Essigsäure für eine Minute und danach kurz mit destilliertem Wasser gespült. Für weitere sieben Minuten wurden sie in Wolframatophosphorsäure-Lösung

eingetaucht. Der nächste Schritt war ein erneutes einminütiges Abspülen mit 1%iger Essigsäure. Das letzte Lösungsbad erfolgte in der hergestellten Lichtgrün-Lösung für weitere zehn Minuten. Danach wurden die Objektträger vorsichtig mit 1%iger Essigsäure abgespült. Zur Entwässerung wurden die fast fertigen Präparate einmal in 96%igen und drei Mal in 100%igen Ethanol gegeben (jeweils für fünf Minuten). Danach wurden sie für fünf Minuten in Xylol eingebracht. Im letzten Schritt wurde mithilfe eines Tropfens Eukitt ein Deckglas über Tibiaschnitt und Objektträger geklebt. Insgesamt wurden auf diese Weise 36 Tibiapräparate für die lichtmikroskopische Untersuchung hergestellt (pro Tier zwei Präparate). Durch die Goldner-Färbung werden Knochen türkis, Muskulatur rot und Fett weiß angefärbt.

2.3 Gemessene Parameter

2.3.1 Allgemeines zu den Messungen

Die angefertigten Präparate wurden unter dem Photomikroskop Axiophot der Firma Carl Zeiss (Oberkochen) untersucht. Die Präparate waren auf dem Objektisch stets so ausgerichtet, dass rechts im Bild die proximalen und links die distalen Anteile des Tibiaknochens zu sehen sind. Je nach gemessenem Parameter wurde eine 3,125-, 12,5- oder 25-fache Vergrößerung gewählt. Mit einer im Mikroskop integrierten Kamera (Mikroskop-Kamera MC 80, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) konnten Aufnahmen gemacht werden, die auf den angeschlossenen Computer übertragen wurden. Die Computersoftware analySIS® 3.0 (Soft Imaging System GmbH, Münster) diente zur Auswertung der geschossenen Bilder. In allen Bildern wurden unten rechts Messbalken zur Kennzeichnung des Maßstabs eingefügt. Die verwendeten Methoden zur Messung der einzelnen Parameter wurden bereits in anderen Studien erprobt (Coors 2010, Dalle Carbonare et al. 2005, Garrahan et al. 1986, Kapur et al. 2010, Steinmark 2012, Walliser 2009, Yao et al. 2006).

Abbildung 2 gibt einen Überblick über die gemessenen Parameter der proximalen Tibia.

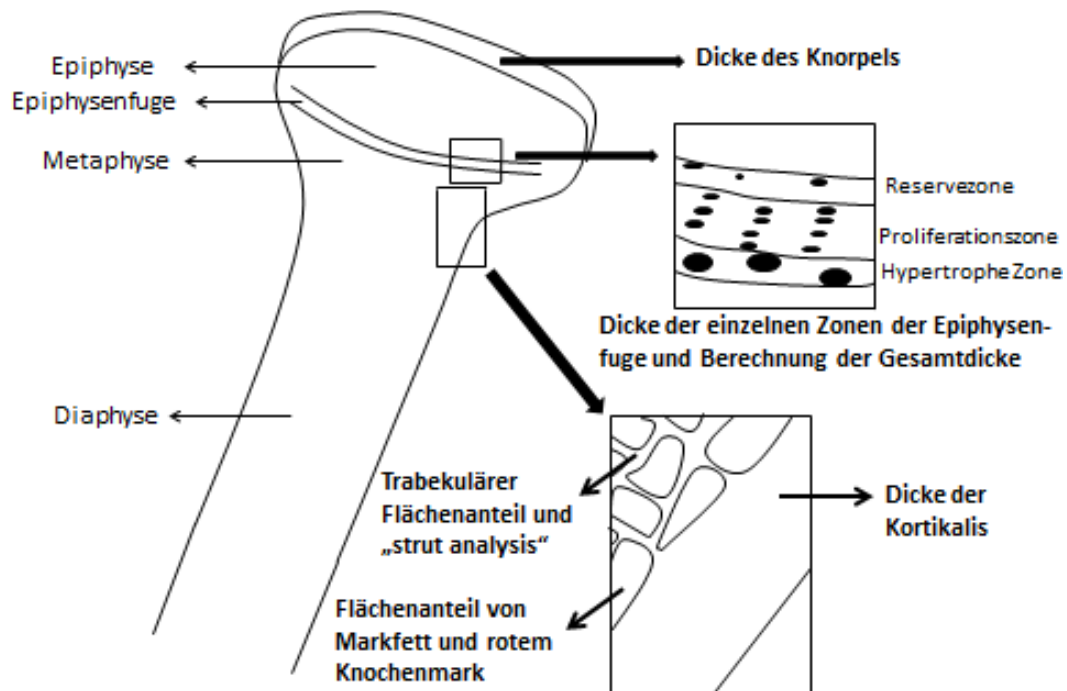


Abbildung 2: Histomorphometrische Parameter

Mittels histomorphometrischer Messungen werden Daten erhoben, die als zweidimensional verstanden werden müssen, wie zum Beispiel Breite, Umfang, und Fläche. Mit der Begründung, dass der Knochen nur als drei dimensionale Struktur vollkommen verstanden werden kann, favorisierte ein Komitee der American Society of Bone and Mineral Research 1987 die Präsentation von dreidimensionalen Ergebnissen (Parfitt et al. 1987). Dementsprechend wurde bei dieser Arbeit verfahren. Die Messungen zu Umfang, Fläche und Anzahl sind abhängig von der Menge des examinierten Gewebes und benötigen für Vergleichbarkeit und Auswertung ein Bezugssystem (Parfitt et al. 1987). In dieser Arbeit wurden die Breiten von Gelenkknorpel, Kortikalis und den einzelnen Zonen der Epiphysenfuge gemessen. Die Messung der Breite kann isoliert verstanden werden und benötigt kein Bezugssystem (Parfitt et al. 1987). Durch die hohe Anzahl der Einzelmessungen soll von der Breite auf die korrespondierend dreidimensionale Dicke geschlossen werden. Da beide in derselben Einheit angegeben werden, mussten keine Umrechnungen erfolgen. Zudem wurden Flächenmessungen durchgeführt. Da hier ein Bezugssystem benötigt wird, wurde die gemessene Trabekelfläche (B.Ar) mit der gesamten Fläche des untersuchten Areal (T.Ar) in Relation gesetzt. Das Ergebnis wird als Index mit der Einheit Prozent

angegeben. Die gewählte Methode der *strut analysis* liefert Rückschlüsse über die dreidimensionale Konnektivität der Trabekel.

2.3.2 Knorpelmessung

Die Messung diente zur Bestimmung der Dicke der hyalinen Gelenkknorpelschicht. Pro Tier gab es zwei Tibiapräparate. Pro Präparat wurden dann jeweils zwei Bilder der Knorpelschicht im Bereich des Tibia-Plateaus in 12,5-facher Vergrößerung gemacht. Die gemachten Aufnahmen der Tibiapräparate wurden mithilfe der *analySIS*-Software geöffnet und bearbeitet. Zur Messung der Dicke der Knorpelschicht wurden anschließend manuelle Abstandsmessungen durchgeführt. Mit jeweils einem Klick zur Markierung der Grenzlinien der Knorpelschicht wurden Linien durch diese gezogen (siehe Abbildung 3). Die Werte der Linienlängen (in μm) wurden anschließend in einer Excel-Tabelle gespeichert. Die Kriterien für das Ziehen der Linien waren folgende: Es wurde darauf geachtet, dass die Linien möglichst parallel zueinander verlaufen. Zudem sollten die Linien möglichst im 90° -Winkel zu den Grenzflächen der Knorpelschicht liegen. Falls die Grenzflächen der Knorpelschicht nicht annähernd parallel verliefen, wurde die Grenzfläche zum Knochen hin als maßgeblich gewertet.

Bei zehn Einzelmessungen pro Bild und vier Bildern pro Tier ergaben die Messungen insgesamt 40 Einzelwerte pro Tier. Für eine Gruppe kamen im Idealfall somit 200 Werte zusammen. Leider waren die Knorpelschichten in den Präparaten häufig auseinandergerissen, sodass oftmals eine geringere Anzahl verwertbarer Daten für die einzelnen Gruppen zusammenkam. Unter diesem Aspekt sind besonders die Präparate der Gruppe *int,Ecd* zu nennen, die in Bezug auf die Knorpelschicht schwierig auszuwerten waren.

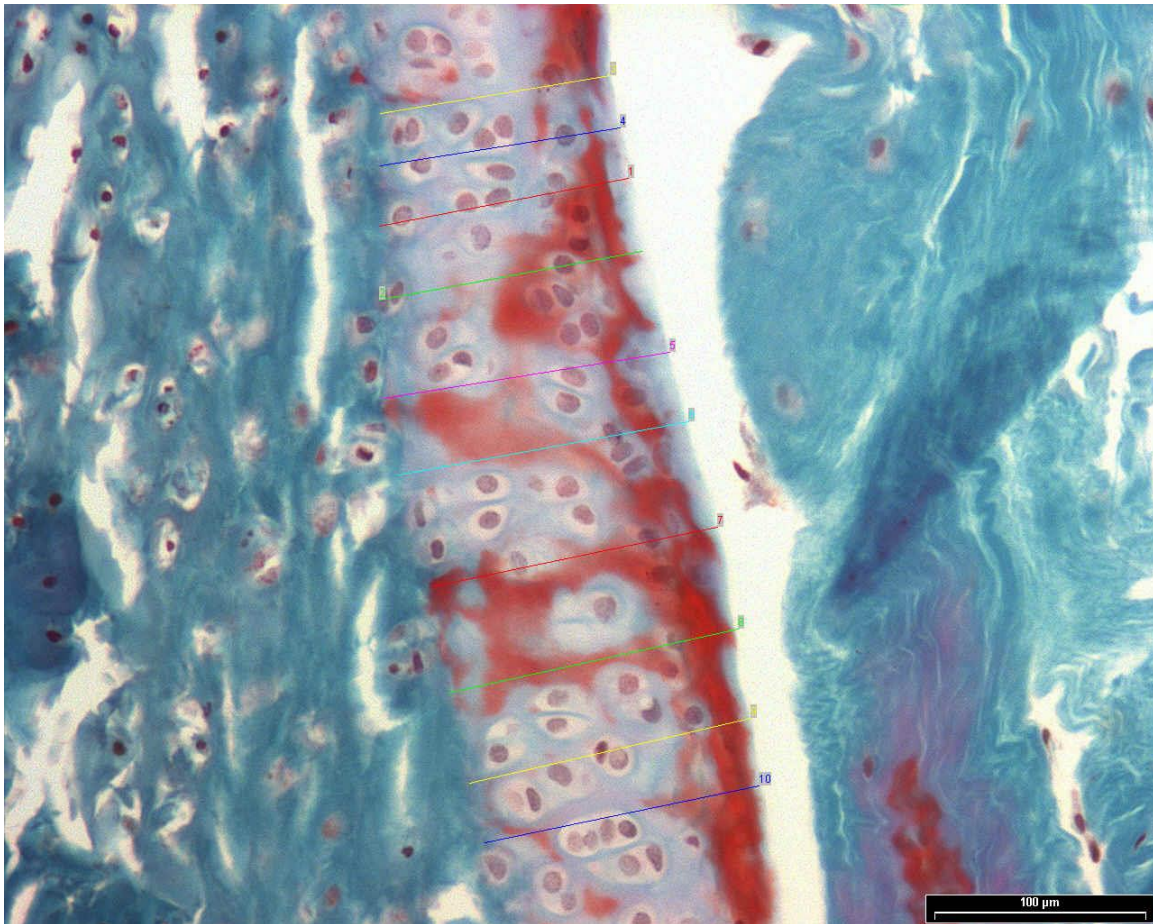


Abbildung 3: Manuelle Messung der Dicke des proximalen Tibia-Gelenkknorpels (Gruppe int, sf, 12,5-fache Vergrößerung)

2.3.3 Messungen zu den einzelnen Zonen der Epiphysenfuge

Die Epiphysenfuge oder auch Wachstumsfuge ist eine vom Mesoderm abgeleitete hyaline Knorpelschicht zwischen Epiphyse und Diaphyse (Burdan et al. 2009). Hier findet das Längenwachstum der Röhrenknochen statt. Die Dicke der Epiphysenfuge sowie die von Proliferations- und hypertropher Zone korrelieren positiv mit der Wachstumsrate (Villemure und Stokes 2009, Wilsman et al. 1996).

Die Bilder für diese Messung wurden in 25-facher Vergrößerung aufgenommen (siehe Abbildung 4). Eine Ausmessung der einzelnen Zonen der Epiphysenfuge wurde bereits in anderen Studien durchgeführt (siehe Yao et al. 2006, Kapur et al. 2010).

Pro Tier wurden vier Aufnahmen der Epiphysenfuge gemacht. Es wurde darauf geachtet, dass diese nicht in Kortikalis nahen Randbereichen aufgenommen wurden. In den einzelnen Bildern wurden stets mehr als zehn Messungen für jede Zone durchgeführt, so dass sich pro Tier weit mehr als 40 Einzelwerte für die jeweilige Zone ergaben.

Dafür mussten zuerst die Grenzen der Zonen erkannt und festgelegt werden. Zur Orientierung dienten hierfür die Zellen. In der Reservezone liegen kleine, kompakte Zellen, eingebettet in reichlich extrazellulärer Matrix (Burdan et al. 2009). Es handelt sich dabei um undifferenzierte Chondrozytenvorläufer, die sich selten teilen und „Nachschub für die folgende Zone“ liefern (Lüllmann-Rauch 2006). In der sich anschließenden Proliferationszone ist das charakteristische Merkmal die longitudinale Anordnung der Chondrozyten, die hier mitotisch aktiv und eher flach sind (Burdan et al. 2009). In der darauffolgenden hypertrophen Zone nimmt das Volumen der Zellen deutlich zu. Sie sind hier rund, ausdifferenziert und enthalten viel raues endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien (Welsch 2003). Zusätzlich wird manchmal eine vierte Zone, die Eröffnungszone, beschrieben, in welcher die Transversalsepten beseitigt werden und die Ossifikation anhand der Longitudinalsepten beginnt (Lüllmann-Rauch 2006). Aus Gründen der Darstellbarkeit wurde auf die Differenzierung zwischen dritter und vierter Zone verzichtet und zusammenfassend von der hypertrophen Zone gesprochen.

Mithilfe der analySIS Software war es möglich die Grenzen der einzelnen Zonen manuell einzuzeichnen (siehe Abbildung 5). Danach erfolgte die schon beschriebene Abstandsmessung innerhalb der jeweiligen Zonen. Die Linien wurden sowohl parallel zueinander als auch zu den in Säulen angeordneten Zellen in der Proliferationszone gezogen

(Yao et al. 2006). Die gewonnenen Werte wurden wiederum in einer Excel-Tabelle gespeichert.

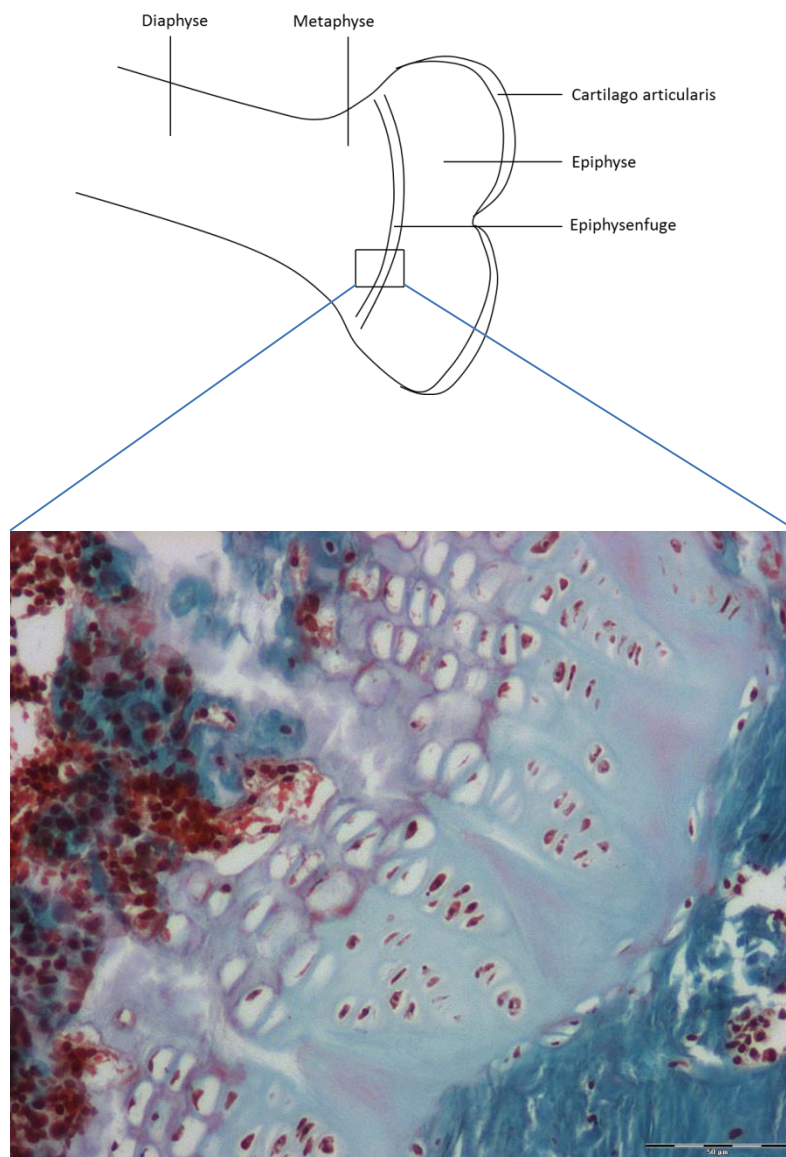


Abbildung 4: Lage und Ausschnitt der Epiphysenfuge. Rechts im Bild kommt die Epiphyse und links die Metaphyse zur Darstellung.

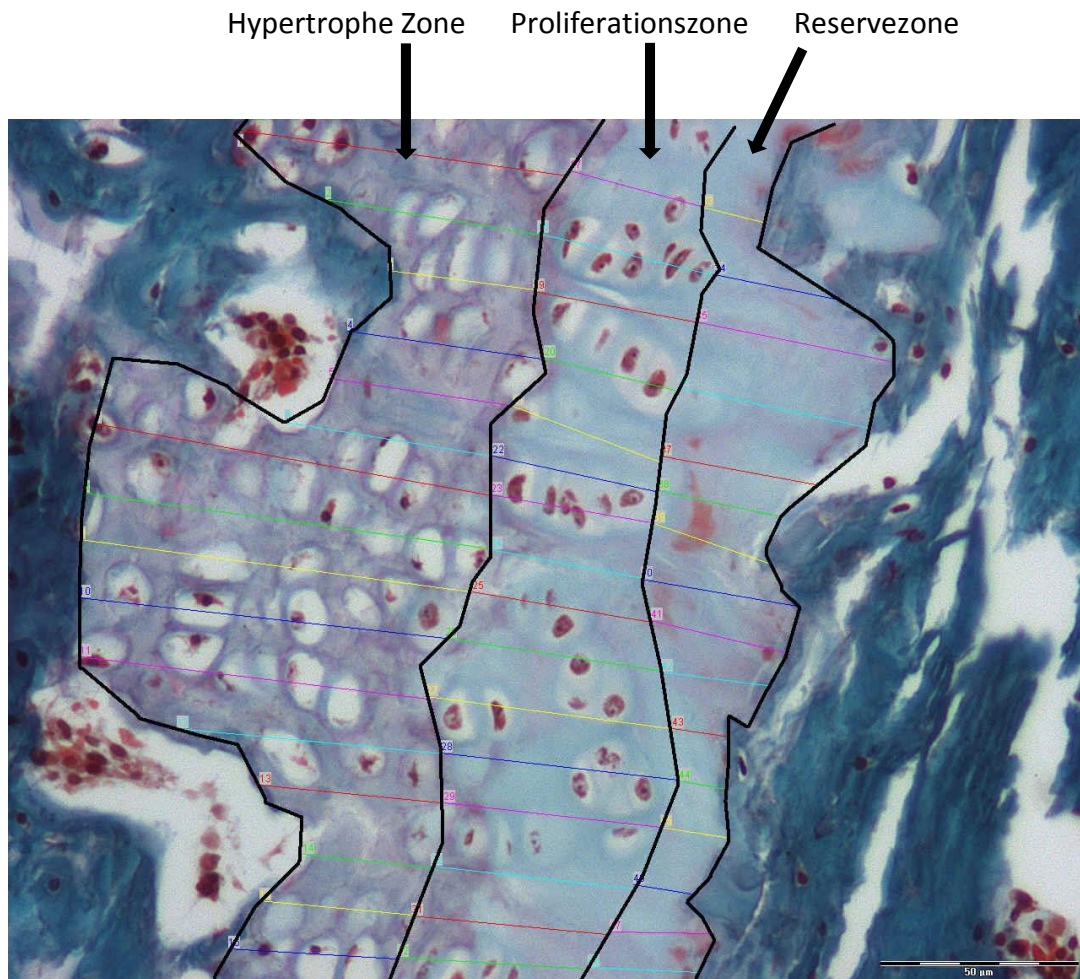


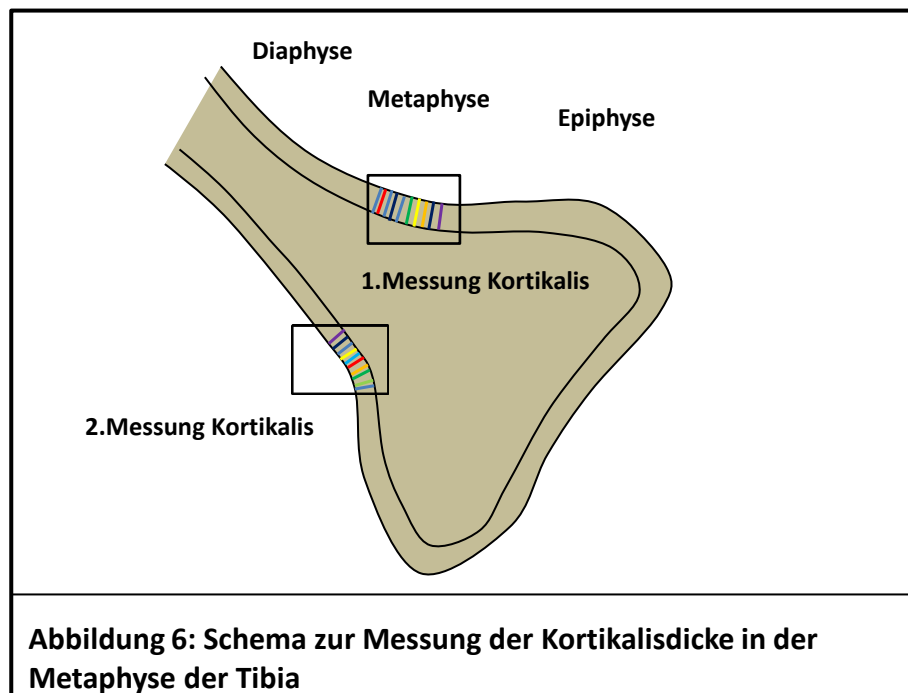
Abbildung 5: Manuelle Einzeichnung und Messung der einzelnen Zonen der Epiphysenfuge (Gruppe int, sf, 25-fache Vergrößerung). Rechts im Bild kommt die Epiphyse und links die Metaphyse zur Darstellung.

2.3.4 Berechnung der Gesamtdicke der Epiphysenfuge

Um Aussagen über die Gesamtdicke der Epiphysenfuge treffen zu können, wurden pro Präparat jeweils die Mittelwerte für die einzelnen Zonen mit Excel berechnet und anschließend zur Gesamtdicke aufaddiert (Microsoft Excel 2007, Microsoft Corporation, Redmond, USA). Die Berechnung der Mittelwerte erfolgte, indem die Einzelwerte einer Zone pro Präparat addiert und anschließend durch die Anzahl der Einzelwerte dividiert wurden. Pro Gruppe ergaben sich somit 8-10 ermittelte Werte.

2.3.5 Kortikalismessung

Im Review von Kulak und Dempster wird die Kortikalisdicke als ein möglicher Parameter der histomorphometrischen Auswertung genannt (Kulak und Dempster 2010). Die Bilder der Kortikalis wurden in 3,125-facher Vergrößerung im Bereich der Metaphyse aufgenommen. Bei jedem Präparat wurde jeweils ein Bild auf jeder Seite des Tibiaschnitts gemacht. Es wurde dabei darauf geachtet, dass nur histologisch intakte Bereiche der Kortikalisschicht abgebildet wurden. Anschließend konnten auch hier durch die manuelle Abstandsmessung der analySIS Software Werte ermittelt werden, die die Dicke der Kortikalisschicht beschreiben (siehe Abbildungen 6 und 7). Die Abstandslinien wurden nach Möglichkeit so gezogen, dass sie im 90°-Winkel zum Kortikalisverlauf und möglichst parallel zueinander liegen. Bei zehn Werten pro Bild, zwei Bildern pro Präparat und zwei Präparaten pro Tier ergab sich damit für jedes Tier eine Summe von 40 Einzelwerten.



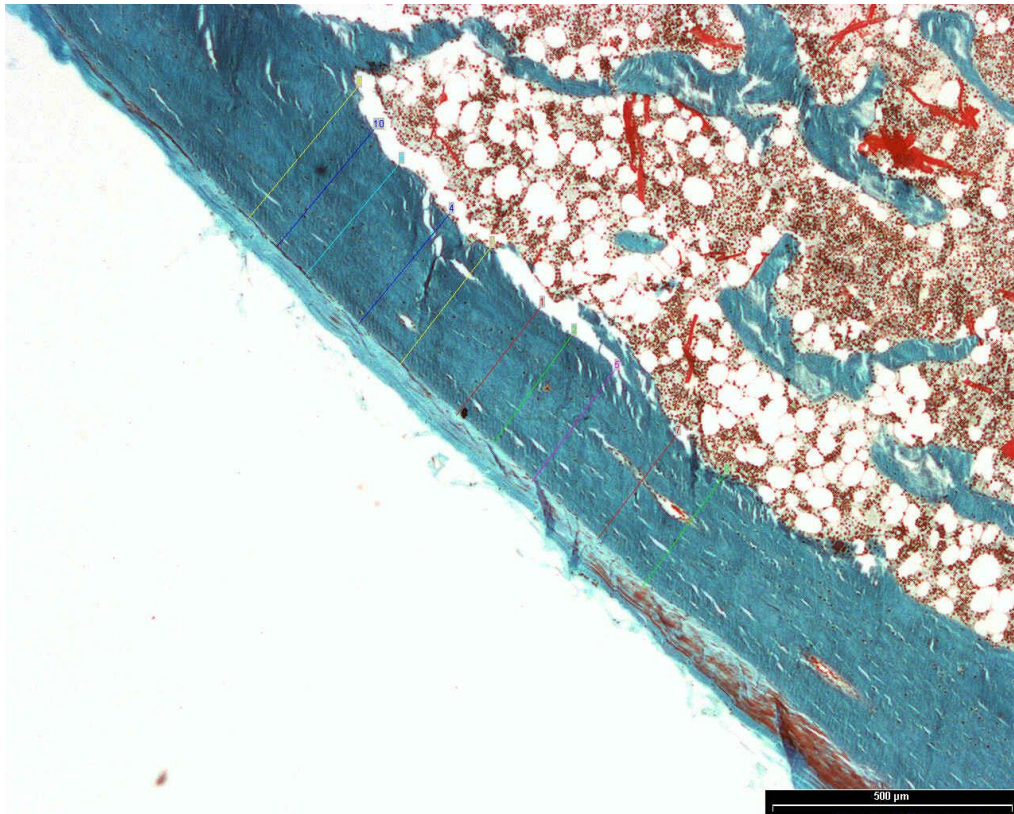


Abbildung 7: Kortikalismessung im Bereich der Metaphyse (Gruppe int, sf, 3,125-fache Vergrößerung)

2.3.6 Messung des Flächenanteils von Trabekeln, Fett und Knochenmark in der tibiären Metaphyse

Die Methodik dieser Messung wurde bereits in zwei Dissertationen unserer Abteilung beschrieben (Coors 2010, Walliser 2009). Für diese Messungen wurden pro Präparat drei Bilder (in 12,5-facher Vergrößerung) im Bereich der Metaphyse distal der Epiphysenfuge im endostealen Raum aufgenommen. Wichtig war, dass keine Überlappung der Bildinhalte stattfand und dass nur trabekuläre Strukturen und dementsprechend keine Anteile der Kortikalis abgebildet wurden. Die weitere Bearbeitung erfolgte mit der *analySIS* Software. Im ersten Schritt sollten aus den gemachten Echtfarb- oder Nativbildern sogenannte Graubilder entstehen. Dafür wurde zuerst die Farbintensität invertiert, es entstand ein Negativbild (Abbildung 8). Durch den anschließenden roten Farbauszug entstand das gewünschte Graubild. Die folgende Schwellenwertbestimmung diente dazu, die einzelnen Graustufen der unterschiedlichen Gewebe (Trabekel, Knochenmark, Fett) festzusetzen. Hierfür wurde das Ergebnis immer wieder mit dem Echtfarbbild verglichen, um möglichst genau die Grenzen

der Grautöne und somit die Areale der Gewebe festzulegen. Die sich anschließende Phasenanalyse konnte dann den flächenmäßigen Anteil einer Farbe und somit den Anteil eines bestimmten Gewebes an der Gesamtfläche des Bildes berechnen. Die ermittelten Werte, in absoluten (μm^2) und relativen (%) Zahlen, wurden danach in Excel gespeichert. In der Auswertung sind die Ergebnisse in Prozent angegeben.

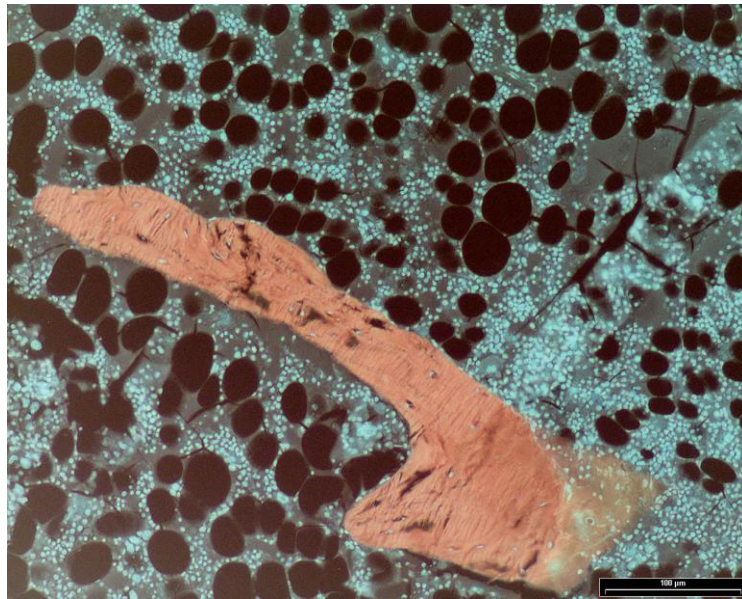


Abbildung 8: Negativbild vom endostealen Raum nach Inversion. Fett ist schwarz, Knochenmark hellblau und Knochen rot dargestellt (12,5-fache Vergrößerung).

2.3.7 Analyse der Trabekelvernetzung im metaphysären Bereich

Zur Einschätzung der Qualität der Trabekel ist nicht nur die Quantität von Bedeutung, sondern auch die Vernetzungsstruktur der Trabekel selbst. Um für zweidimensionale Knochenschnitte Aussagen treffen zu können, wurde die Methode der „strut analysis“ von Dalle Carbonare et al. (2005) und Garrahan et al. (1986) beschrieben. Hierfür wurden Aufnahmen der metaphysären Spongiosa in 3,125-facher Vergrößerung gemacht. Pro Tier wurden zwei Aufnahmen gemacht und ausgewertet. Die gewählte Methode sieht vor, die Trabekelverläufe durch Achsen zu kennzeichnen. Wenn sich zwei Achsen treffen, wird an der Stelle ein schwarzer Punkt (=Verbindungspunkt) gesetzt. Wenn 3 und mehr Achsen zusammenlaufen, entsteht ein roter Punkt (=Knotenpunkt). Freie Trabekelenden, sogenannte Termini, werden als grüner Punkt gekennzeichnet. Für das Bestimmen der

Achsen und das Setzen der Punkte wurden die Aufnahmen in Microsoft PowerPoint geöffnet und bearbeitet. Anschließend erfolgte die Zählung der jeweiligen Punkte. Die so erhaltenen Werte wurden in einer Excel Tabelle gespeichert.

Der Quotient Knotenpunkte/freie Endpunkte ist ein Index für die räumliche Konnektivität der Trabekel (Dalle Carbonare et al. 2005). Knochen mit gut vernetzten Trabekeln besitzen viele Knotenpunkte und in Relation dazu wenige freie Endpunkte, erzielen also einen hohen Indexwert. Gegenläufig verhält es sich mit schlechteren Trabekelstrukturen, bei denen relativ viele freie Endpunkte relativ wenigen Knotenpunkten gegenüberstehen und demzufolge einen niedrigeren Indexwert erzielen. Abbildung 9 und 10 zeigen die Unterschiede zwischen einem ovx und einem int Tier hinsichtlich ihrer Trabekelvernetzung.

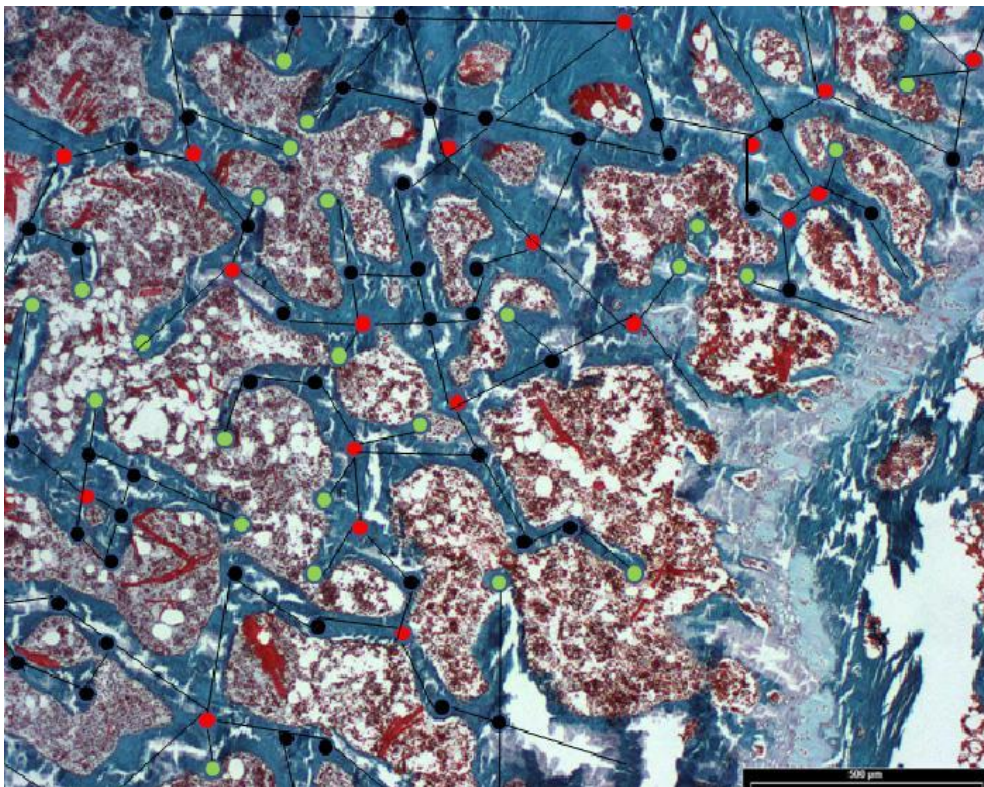


Abbildung 9: *Strut analysis* nach der Methode von Dalle Carbonare et al. (2005) und Garrahan et al. (1986) in der endostealen Metaphyse, Gruppe int, sf (3,125-fache Vergrößerung)

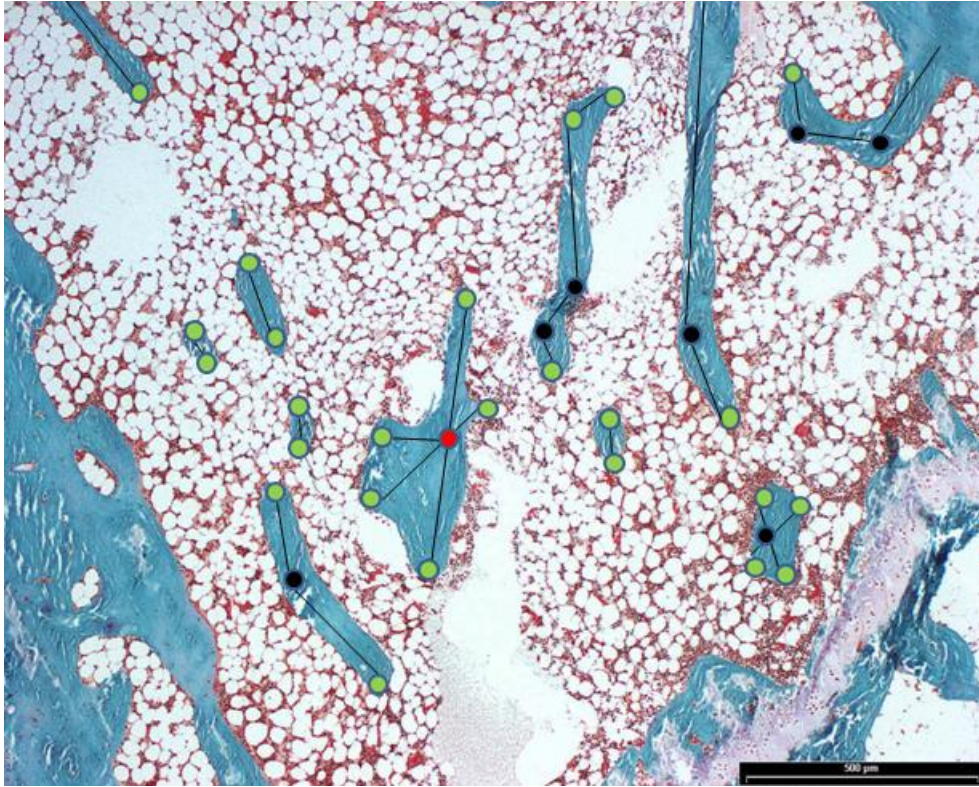


Abbildung 10: *Strut analysis* nach der Methode von Dalle Carbonare et al. (2005) und Garrahan et al. (1986) in der endostealen Metaphyse, Gruppe ovx, sf (3,125-fache Vergrößerung)

2.4 Statistik

Die durch die Messungen erhaltenen Werte wurden allesamt in Excel Tabellen abgespeichert (Microsoft Excel 2007, Microsoft Corporation, Redmond, USA). Zur weiteren Verarbeitung der Daten wurde das Computerprogramm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) verwendet. Es handelt sich dabei um eine Statistiksoftware, mit der die Erstellung der Graphen und die Berechnung statistischer Größen vorgenommen wurden. Zur Auswertung der gewonnenen Werte wurden jeweils eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem multiplem Vergleichstest nach Dunnett durchgeführt. Für die einzelnen Gruppen wurden jeweils die arithmetischen Mittelwerte und die dazugehörigen Standardfehler (SEM) errechnet.

Die Gruppe ovx, sf diente als Kontrollgruppe, da sie am ehesten die Verhältnisse im postmenopausalen Knochen der Frau darstellt. Das Signifikanzniveau wurde für $p < 0,05$ festgesetzt.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der jeweiligen Untersuchungen und Versuche vorgestellt. Zur Veranschaulichung werden hierfür, bis auf in Abbildung 11, Balkendiagramme verwendet. Die Anordnung der Balken (von links nach rechts) ist stets dieselbe:

- ovx, sf
- int, sf
- ovx, Ecd
- int, Ecd.

Signifikanzen wurden im Hinblick auf die Kontrollgruppe „ovx, sf“ errechnet und durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet.

3.1 Gewichtsentwicklung und Futteraufnahme der Tiere

Die S.D.- Ratten wurden regelmäßigen Gewichtskontrollen unterzogen. Abbildung 11 zeigt die Durchschnittsgewichte der jeweiligen Gruppen zu bestimmten Zeitpunkten. Die Ordinate stellt die Körpergewichte der Tiere in Gramm dar, während die Abszisse die Zeitpunkte der Gewichtsmessung anhand des Alters der Ratten beschreibt. Bei der ersten Messung waren die Tiere 3 Monate alt. Der Graph zeigt, dass die Tiere der einzelnen Gruppen ähnliche Ausgangsgewichte hatten, im Durchschnitt 262 g. Kurz darauf begann der eigentliche Versuch mit der Ovx einiger Tiere und der Verabreichung des neuen Futters. Innerhalb eines Monats zeichnete sich eine signifikante Gewichtszunahme der beiden ovx Gruppen ab, während die Tiere mit int Eierstöcken insgesamt weniger zunahmen.

Tendenziell nahmen die Tiere aller Gruppen fast kontinuierlich zu, wobei die ovx Tiere in allen Messungen, mit Ausnahme der letzten, deutlich schwerer waren als die Tiere mit belassenen Eierstöcken. Die jeweiligen Graphen der ovx Gruppen und der int Gruppen verliefen annähernd deckungsgleich. Die Werte vom achten und zehnten Monat blieben annähernd gleich. Die Tiere der Gruppe int, sf wogen mit zwölf Monaten im Durchschnitt weniger als vier Monate zuvor. Ihr durchschnittliches Gewicht nahm gegen Ende des Experiments erheblich zu.

Gewichtsentwicklung von ovx und int Tieren bei unterschiedlicher Futtergabe (sf oder Ecd enthaltend)

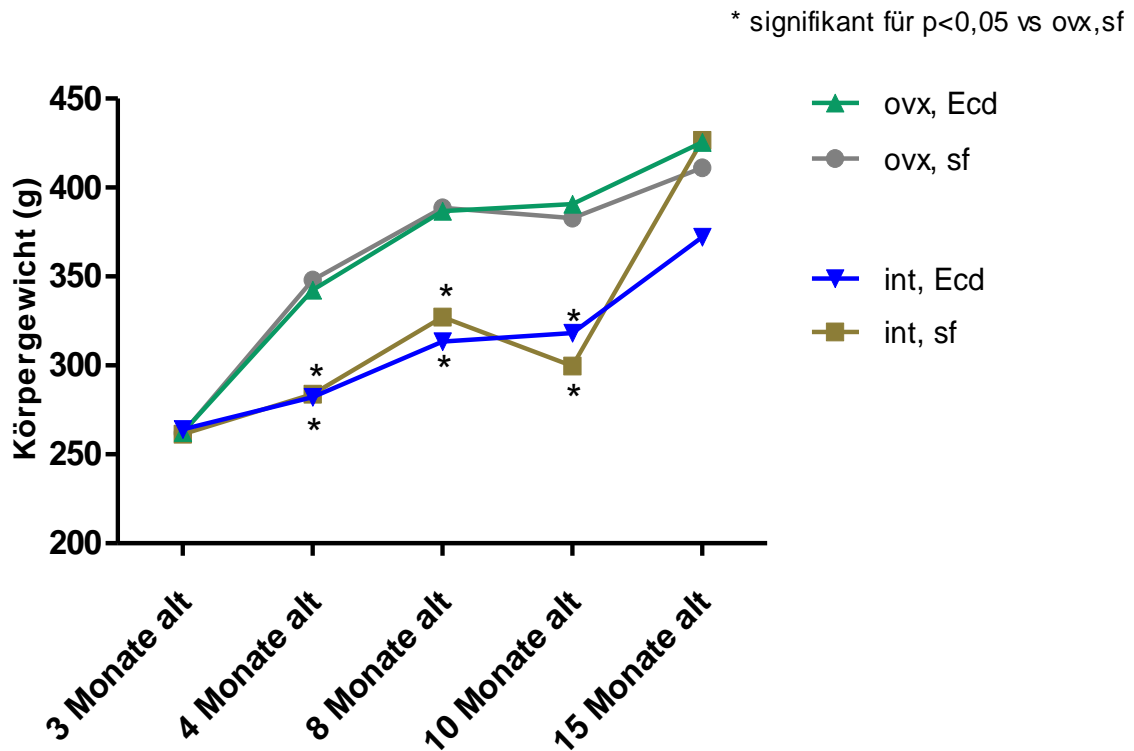


Abbildung 11: Gewichtsentwicklung der Ratten im Alter von 3 bis 15 Monaten, Durchschnittswerte der Gruppen im Vergleich. Die Tiere aller Gruppen nahmen kontinuierlich an Gewicht zu. Die ovx Ratten waren insgesamt schwerer als die int Ratten. Diese Gewichtsdiﬀerenz zeichnete sich bereits einen Monat nach Ovx deutlich ab.

Die Daten wurden von Priv.-Doz. Dr. med. D. Seidlová-Wuttke zur Verfügung gestellt.

Abbildung 12 zeigt die durchschnittliche Futteraufnahme in Gramm pro Tier pro Tag der jeweiligen Gruppe für bestimmte Zeiträume. Auf der Ordinate ist die Futteraufnahme in g pro Tier pro Tag angegeben. Die Abszisse stellt die Versuchsgruppen mit den jeweiligen Zeiträumen dar. Die Spanne reichte von minimal 15 bis maximal 21 g Futter pro Tier pro Tag. Von der zweiten bis achten Woche ist deutlich zu sehen, dass die ovx Tiere erheblich mehr Nahrung zu sich genommen haben als die int. Ab der neunten Woche fraßen die Tiere der Gruppe int, Ecd ähnlich viel wie die ovx Tiere. Int, sf Tiere hatten insgesamt, auch in der finalen Woche im Alter von 15 Monaten, den niedrigsten Futterbedarf. Da das Futter einmal

pro Woche abgewogen und den Tieren zur Verfügung gestellt wurde, wurden für die einwöchigen Zeiträume am Anfang und am Ende des Versuchs keine Standardabweichungen berechnet.

Bei einer Konzentration von 3 g Ecd/kg Futter nahmen die Ecd Gruppen in der finalen Woche durchschnittlich 0,0525 g Ecd pro Tier pro Tag ein.

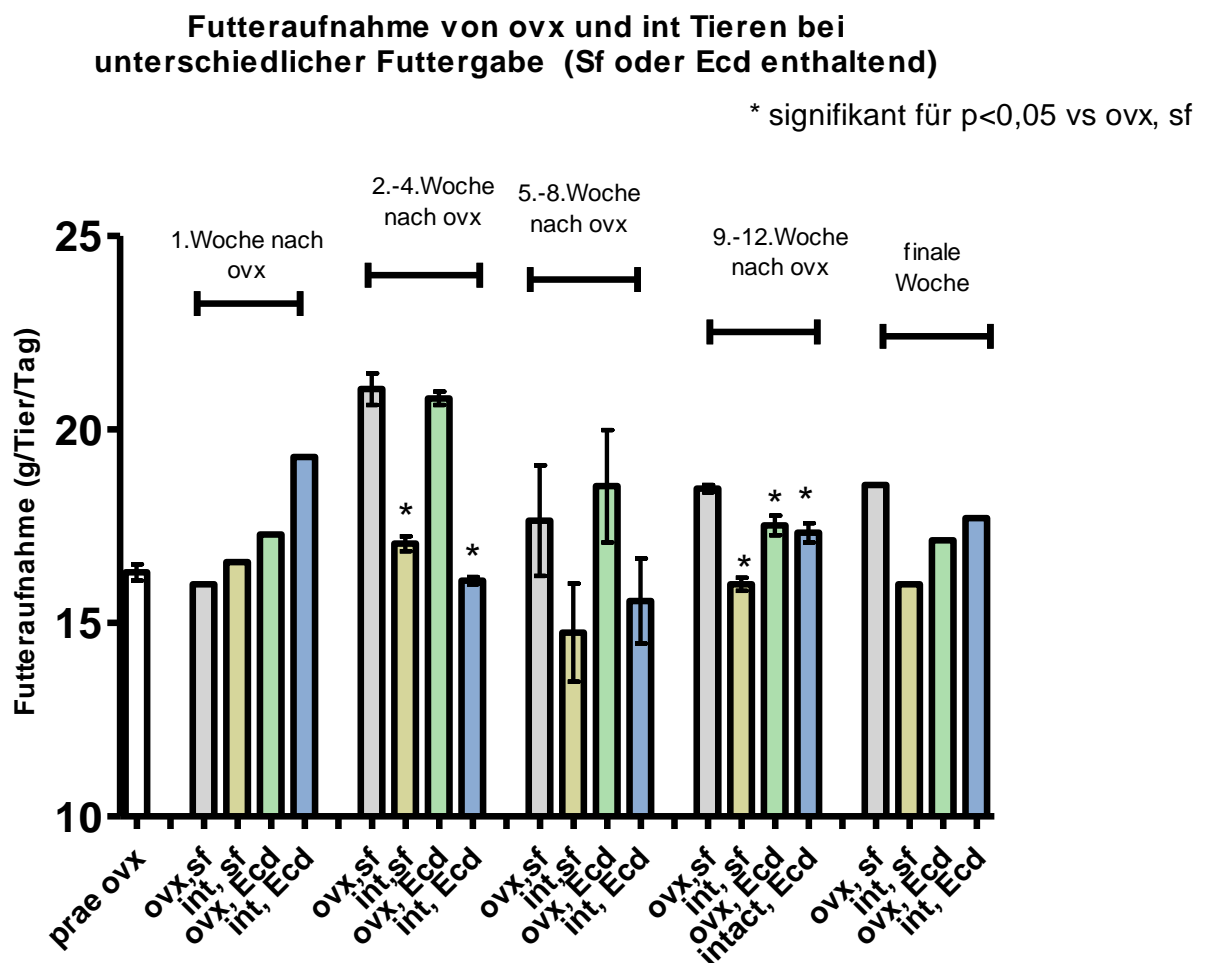


Abbildung 12: Futteraufnahme der Ratten (in g/Tier/Tag) für bestimmte Zeiträume. Die ovx Tiere hatten ab der zweiten Woche einen höheren Futterbedarf als int Ratten. Ab der neunten Woche war der durchschnittliche Futterverbrauch der Gruppe int, Ecd aber ähnlich hoch wie in den ovx Gruppen. Int, sf Tiere hatten insgesamt den niedrigsten Futterverbrauch. Die Daten wurden von Priv.-Doz. Dr. med. D. Seidlová-Wuttke zur Verfügung gestellt.

3.2 Ergebnisse der einzelnen Versuche

3.2.1 Untersuchung des Gelenkknorpels der proximalen Tibia

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse zur Dickenmessung des Gelenkknorpels. Die Ordinate stellt die Dicke in μm und die Abszisse die jeweiligen Gruppen dar. Die Messungen ergaben für alle drei Gruppen signifikant höhere Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe, die durchschnittlich $98,6 \pm 4,3 \mu\text{m}$ dick war. Die Gruppe int, sf besaß mit einem Mittelwert von $219 \pm 10,4 \mu\text{m}$ insgesamt die dickste Knorpelschicht der proximalen Tibia. Die beiden Ecdyson-Futtergruppen erzielten ähnliche Ergebnisse, wobei die Mittelwerte der ovx, Ecd- Gruppe $147,9 \pm 5,5 \mu\text{m}$ und der int, Ecd- Gruppe $141,8 \pm 3,5 \mu\text{m}$ betragen.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe hatten die ovx, Ecd Tiere eine um etwa 50% dickere Gelenkknorpelschicht. Int Tiere besaßen dickere Gelenkknorpel als die Tiere der Kontrollgruppe. Int, Ecd Tiere hatten im Vergleich zu int, sf Tieren eine dünnere Knorpelschicht.

Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Dicke des Gelenkknorpels (proximale Tibia)

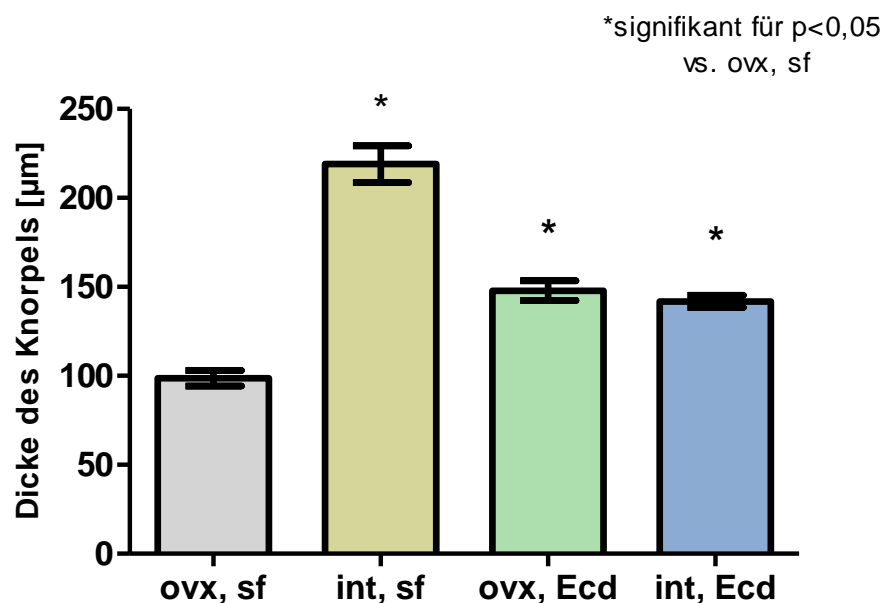


Abbildung 13: Dicke des Gelenkknorpels der proximalen Tibia. Alle Gruppen zeigten eine signifikant dickere Gelenkknorpelschicht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei besaßen die int, sf Tiere die dicksten Knorpel. Ov, Ecd und int, Ecd Tiere hatten ähnlich dicke Knorpelschichten.

3.2.2 Gesamtdicke der Epiphysenfuge

Abbildung 14 zeigt die errechneten Schichtdicken der Epiphysenfugen der einzelnen Gruppen. Die Ordinate stellt die Dicke der Epiphysenfuge in μm und die Abszisse die einzelnen Gruppen dar. Die Kontrollgruppe erreichte einen Mittelwert von $114,2 \pm 4,1 \mu\text{m}$. Die Mittelwerte der anderen Gruppen lagen für int, sf bei $113,6 \pm 8,9 \mu\text{m}$, für ovx, Ecd bei $121,9 \pm 3,1 \mu\text{m}$ und für int, Ecd bei $118,8 \pm 7,2 \mu\text{m}$. Die Abweichungen waren statistisch nicht signifikant.

Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Dicke der Epiphysenfuge (proximale Tibia)

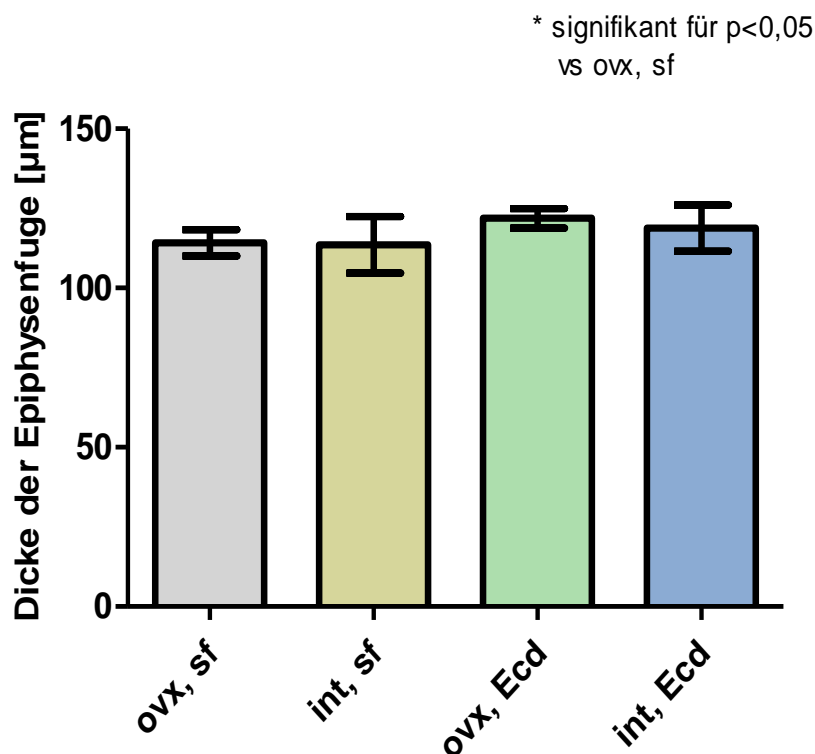


Abbildung 14: Dicke der gesamten Epiphysenfuge (proximale Tibia). Die Gruppen zeigten keine signifikanten Abweichungen im Vergleich zur Kontrollgruppe ovx, sf.

3.2.3 Untersuchung der einzelnen Zonen der Epiphysenfuge

3.2.3.1 Dicke der Reservezone

Die Epiphysenfuge ist in drei unterschiedliche Zonen eingeteilt worden. Der folgende Graph stellt die Dicke der Reservezone dar. Auf der Ordinate ist die Dicke der Reservezone in μm angegeben und auf der Abszisse sind die einzelnen Gruppen abgebildet. Die int, Ecd Tiere hatten eine signifikant dickere Reservezone bei einem Mittelwert von $27 \pm 1,5 \mu\text{m}$. Int, sf und ovx, Ecd Ratten hatten Mittelwerte von $26,3 \pm 1,4 \mu\text{m}$ und $25,8 \pm 1,5 \mu\text{m}$ und waren tendenziell, aber statistisch nicht signifikant, dicker als die Kontrollgruppe, die einen Mittelwert von $21,9 \pm 0,9 \mu\text{m}$ erzielte.

Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Dicke der Reservezone der Epiphysenfuge (proximale Tibia)

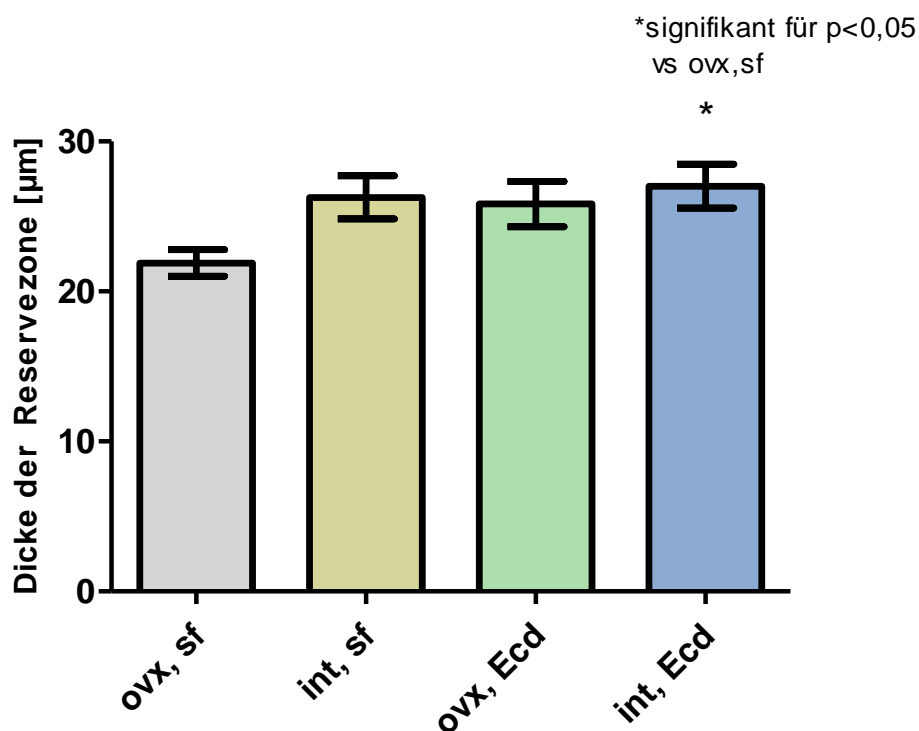


Abbildung 15: Dicke der Reservezone der proximalen Tibia. Die Dicke der Reservezone von int, Ecd war signifikant größer; int,sf und ovx, Ecd nur tendenziell.

3.2.3.2 Dicke der Proliferationszone

Der Reservezone schließt sich nach distal die Proliferationszone an. Die durchschnittliche Dicke der Proliferationszone für die jeweilige Gruppe wird in Abbildung 16 dargestellt, wobei die Ordinate die Dicke der Proliferationszone in μm und die Abszisse die einzelnen Versuchsgruppen abbildet. Die Proliferationszone der Kontrollgruppe hatte einen Mittelwert von $62,2 \pm 1,7 \mu\text{m}$. Die ebenfalls ovx, aber mit Ecd gefütterten Tiere hatten mit $59,8 \pm 2,2 \mu\text{m}$ ähnlich hohe Werte. Statistisch signifikant waren die Ergebnisse der int Tiergruppen: Die Gruppe int, sf hatte mit $51,8 \pm 1,7 \mu\text{m}$ eine dünnere und die Tiere der int, Ecd mit $69,5 \pm 2,4 \mu\text{m}$ eine im Durchschnitt dickere Proliferationszone als die Kontrollgruppe.

Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Dicke der Proliferationszone der Epiphysenfuge (proximale Tibia)

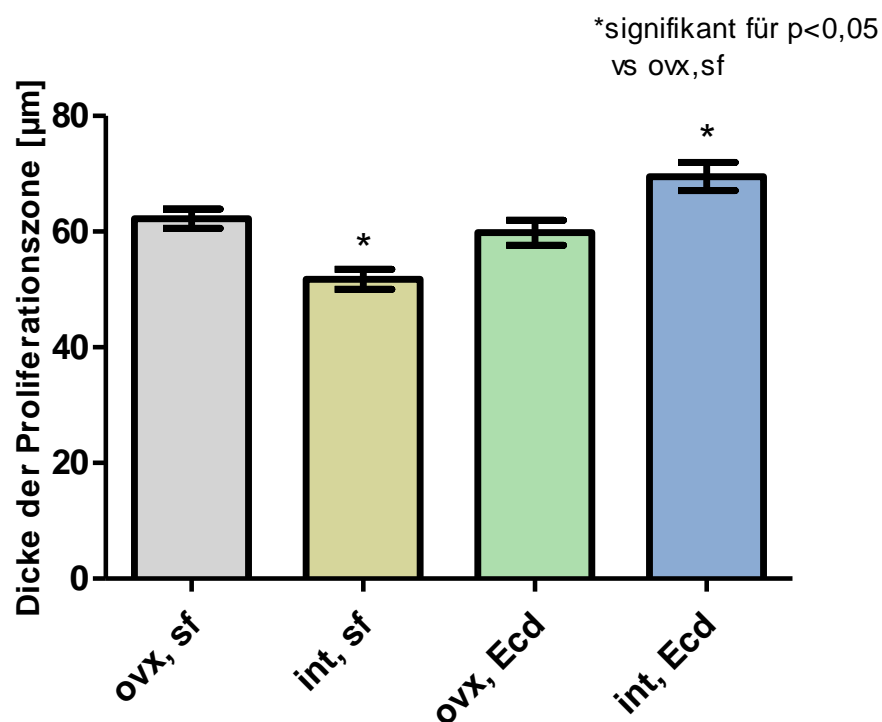


Abbildung 16: Dicke der Proliferationszone der Epiphysenfuge (proximale Tibia). Die ovx Tiere hatten eine ähnlich dicke Proliferationszone. Int, sf hatten eine signifikant dünnere, während int, Ecd eine signifikant dickere Zone aufwiesen.

3.2.3.3 Dicke der hypertrophen Zone

Abbildung 17 zeigt die durchschnittliche Dicke der hypertrophen Zone für die einzelnen Gruppen. Auf der Ordinate ist die Dicke der hypertrophen Zone in μm angegeben und auf der Abszisse sind die einzelnen Gruppen abgebildet. Die Ergebnisse für alle drei Gruppen sind in Bezug auf die Kontrollgruppe ($28,9 \pm 1,6 \mu\text{m}$) statistisch signifikant. Die Gruppen int, sf und ovx, Ecd hatten eine signifikant dickere hypertrophe Zone und Mittelwerte von $36,0 \pm 2,1 \mu\text{m}$ und $34,8 \pm 1,9 \mu\text{m}$. Die hypertrophe Zone von int, Ecd war signifikant dünner und hatte einen Mittelwert von $18,4 \pm 1,1 \mu\text{m}$.

Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Dicke der hypertrophen Zone der Epiphysenfuge (proximale Tibia)

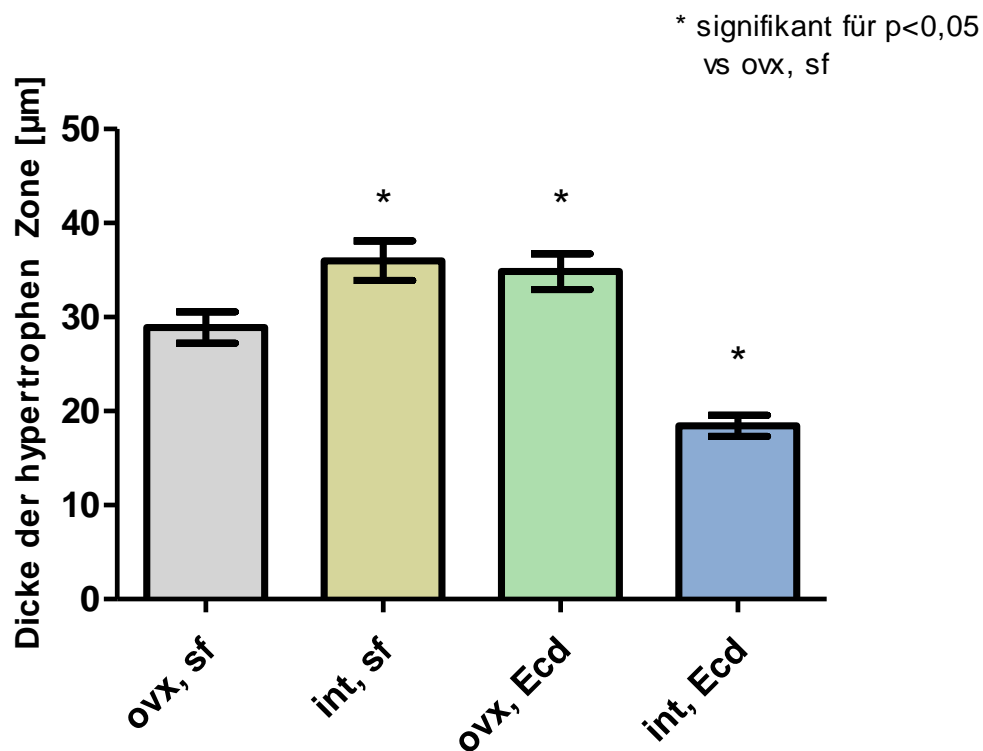


Abbildung 17: Dicke der hypertrophen Zone der Epiphysenfuge (proximale Tibia). Die Gruppen int, sf und ovx, Ecd wiesen eine signifikant dickere hypertrophe Zone auf. Bei den int, Ecd Tieren war diese signifikant dünner im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.2.4 Untersuchung der Kortikalis

Abbildung 18 zeigt die Dicke der Kortikalis im Bereich der Metaphyse der proximalen Tibia. Auf der Ordinate ist die Dicke der Kortikalis in μm angegeben und auf der Abszisse sind die einzelnen Gruppen abgebildet. Die dickste Kortikalis konnte bei den Tieren der Kontrollgruppe mit einem Durchschnittswert von $442,6 \pm 11,5 \mu\text{m}$ festgestellt werden. Die anderen Gruppen erzielten niedrigere Werte. Int, sf mit $406,1 \pm 17,2 \mu\text{m}$ und ovx, Ecd mit $411,3 \pm 9,3 \mu\text{m}$ zeigten keine signifikanten Abweichungen. Das Ergebnis der int, Ecd Ratten war bei einem Mittelwert von $336,2 \pm 8,5 \mu\text{m}$ signifikant niedriger.

Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Dicke der Kortikalis (proximale Tibia)

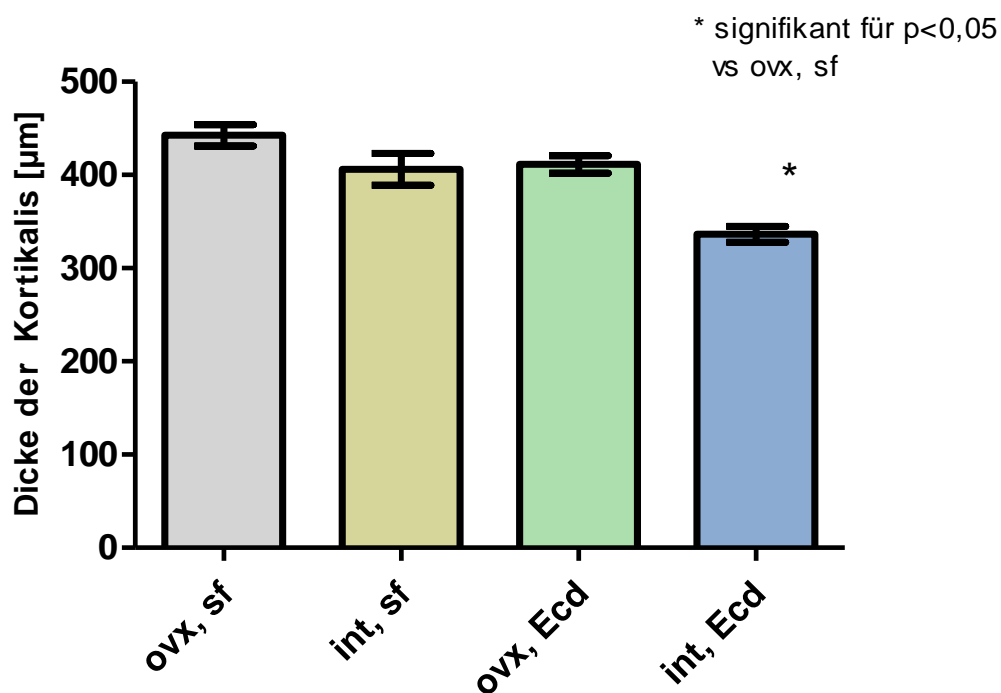


Abbildung 18: Dicke der metaphysären Kortikalis (proximale Tibia). Die Gruppe int, Ecd besaß eine signifikant dünnere Kortikalis. Int, sf und ovx, Ecd hatten tendenziell kleinere Durchschnittswerte.

3.2.5 Bestimmung des Trabekelanteils in der Metaphyse

In Abbildung 19 gibt die Ordinate den Flächenanteil der Trabekel in der Metaphyse der proximalen Tibia in % an, während die Abszisse die einzelnen Gruppen abbildet. Der Graph zeigt, dass die ovx Tiere einen deutlichen Trabekelverlust gegenüber den int Tieren erlitten haben. Die Ergebnisse von ovx, Ecd mit $17,4 \pm 1,6$ % im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $19,1 \pm 2,2$ % waren statistisch nicht signifikant verschieden. Zur Prüfung der Ecdyson-Wirkung innerhalb der int Gruppen wurden hier zusätzlich signifikante Abweichungen im Vergleich zu int, sf berechnet. Die int, Ecd-Tiere besaßen mit $37,5 \pm 1,7$ % einen signifikant höheren Trabekelanteil als die int, sf Tiere mit $28,1 \pm 1,7$ %. Die ovx Tiere zeigten erwartungsgemäß einen signifikant niedrigeren Trabekelanteil im Vergleich zu int, sf.

Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf den Flächenanteil der Trabekel (proximale Tibia)

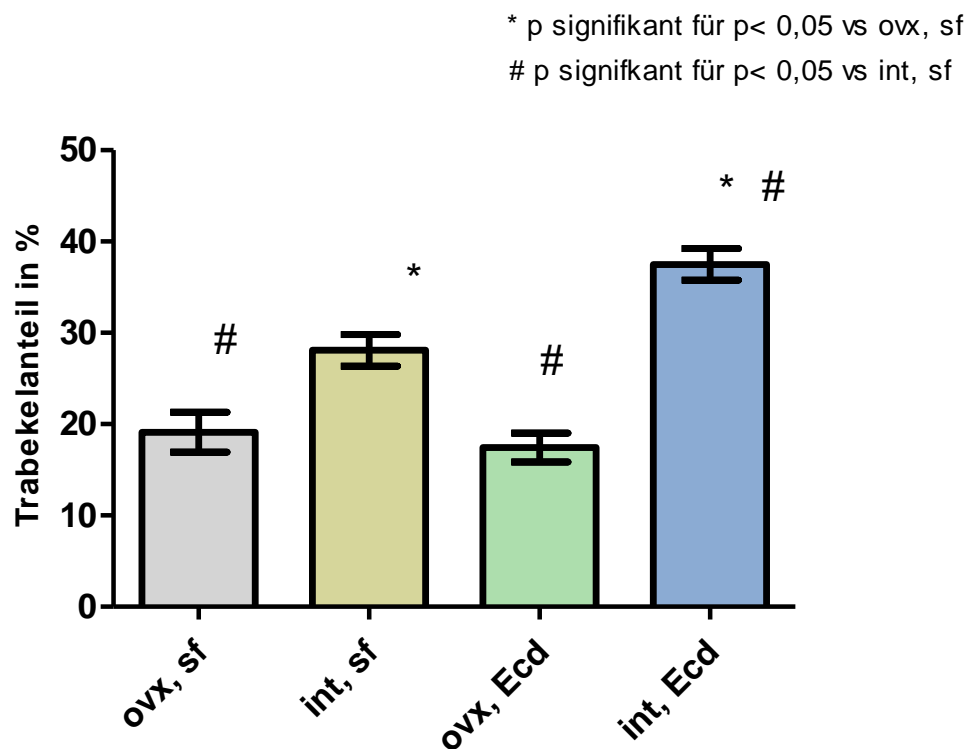


Abbildung 19: Flächenanteil der Trabekel im endostealen Raum der Metaphyse (proximale Tibia). Die int Tiere besaßen einen signifikant höheren Trabekelanteil im Vergleich zur Kontrollgruppe. Int, Ecd-Tiere hatten signifikant mehr Trabekel als int, sf Ratten.

3.2.6 Bestimmung des Fettanteils in der Metaphyse

Abbildung 20 zeigt die Ordinate den endostealen Fettanteil in der Metaphyse der proximalen Tibia in % an, während die Abszisse die einzelnen Gruppen abbildet. Der Fettanteil ist bei den int Tieren im Vergleich mit den ovx Tieren signifikant niedriger. Ovx Ratten hatten Mittelwerte von $42,8 \pm 2,1$ % bei sf Fütterung und von $41,8 \pm 2$ % bei Ecd-Gabe. Hingegen betrug der Flächenanteil des Markfetts bei int, sf durchschnittlich $13,6 \pm 1,9$ % und bei int, Ecd durchschnittlich $16,9 \pm 1,4$ %. Damit hatten ovx Ratten einen mehr als zweieinhalb Mal höheren Fettanteil. Die Ecdyson-Fütterung erzielte keine signifikanten Unterschiede.

Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf den Flächenanteil des Markfetts (proximale Tibia)

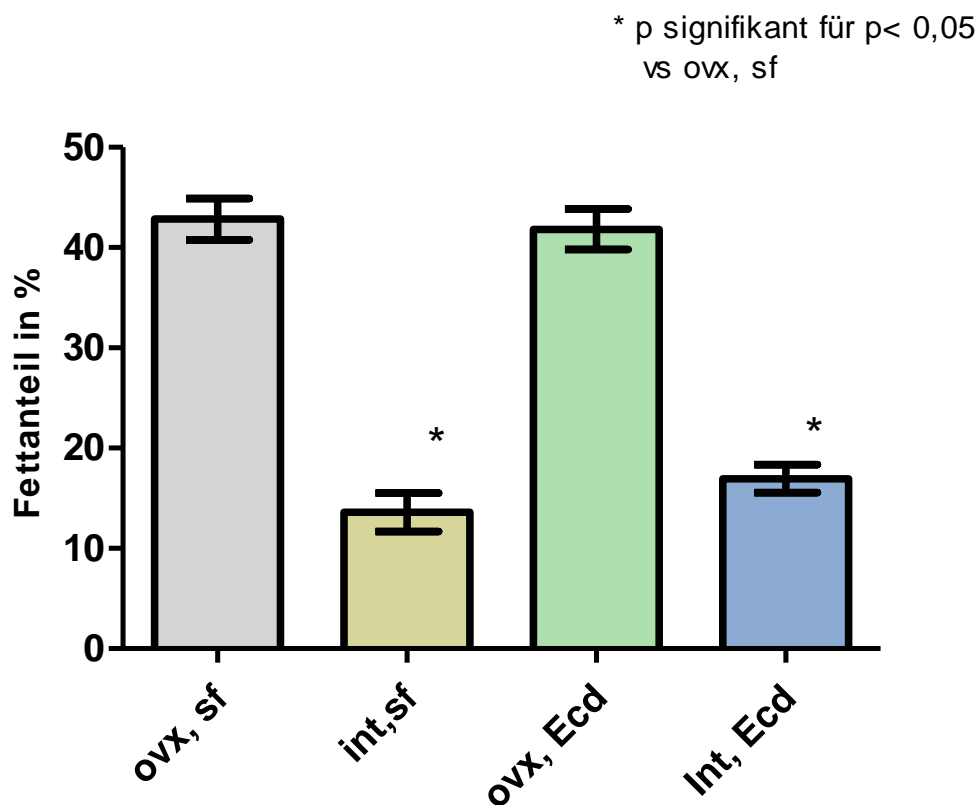


Abbildung 20: Flächenanteil des Markfetts im endostealen Raum der Metaphyse (proximale Tibia). Intakte Tiere wiesen signifikant weniger Fett auf. Die Ecdyson-Fütterung zeigte keinen Einfluss.

3.2.7 Bestimmung des Knochenmarkanteils in der Metaphyse

In Abbildung 21 stellt die Ordinate den endostealen Knochenmarksanteil in % dar, während auf der Abszisse die einzelnen Gruppen dargestellt sind. Die ovx, Ecd-Tiere zeigten signifikant weniger Knochenmark bei einem Mittelwert von $12,1 \pm 1,1$ %. Bei den Gruppen int, sf ($16,2 \pm 0,6$ %) und int, Ecd ($15,4 \pm 0,6$ %) wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen. Der Knochenmarksanteil der Kontrollgruppe lag bei $15,5 \pm 0,8$ %.

Der Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf: den Flächenanteil des Knochenmarks (proximale Tibia)

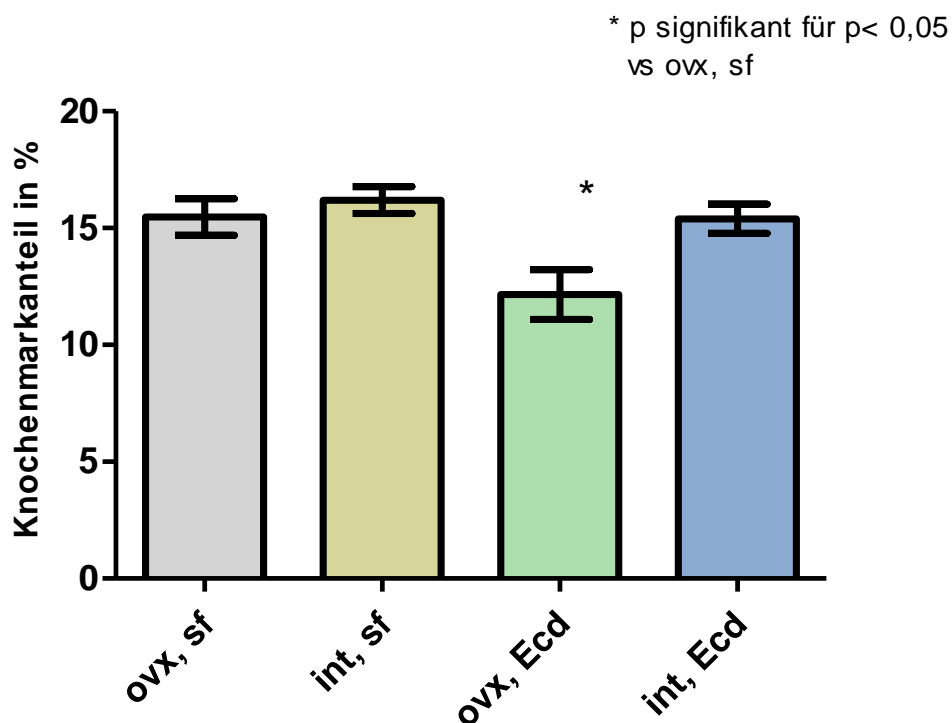


Abbildung 21: Flächenanteil des Knochenmarks im endostealen Raum der Metaphyse (proximale Tibia). Lediglich ovx, Ecd-Tiere wiesen signifikant weniger Knochenmark auf.

3.2.8 Vernetzungsanalyse

3.2.8.1 Anzahl der freien Enden

Der folgende Versuch wurde nach der Methode der *strut analysis* von Carbonare et. al. 2005 und Garrahan et al. 1986 vorgenommen. Durch sie ist es möglich, Aussagen über die Qualität der Trabekelvernetzung zu treffen.

Abbildung 22 zeigt die Anzahl der freien Trabekelenden in der Metaphyse der Tibia. Auf der Ordinate ist die Anzahl der freien Trabekelenden dargestellt, während die Abszisse die einzelnen Gruppen zeigt. Es ist deutlich zu sehen, dass die int Tiere signifikant mehr freie Trabekelenden präsentierten als ovx Tiere. Die Mittelwerte lagen für ovx, sf bei $20,3 \pm 1,4$ und für ovx, Ecd bei $18,5 \pm 2,8$ freien Endpunkten. Die int Gruppen erzielten Mittelwerte von $42 \pm 5,4$ bei sf Fütterung und $34,3 \pm 3,2$ bei Ecd Gabe.

Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Trabekelkonnektivität (proximale Tibia)

Anzahl der freien Enden

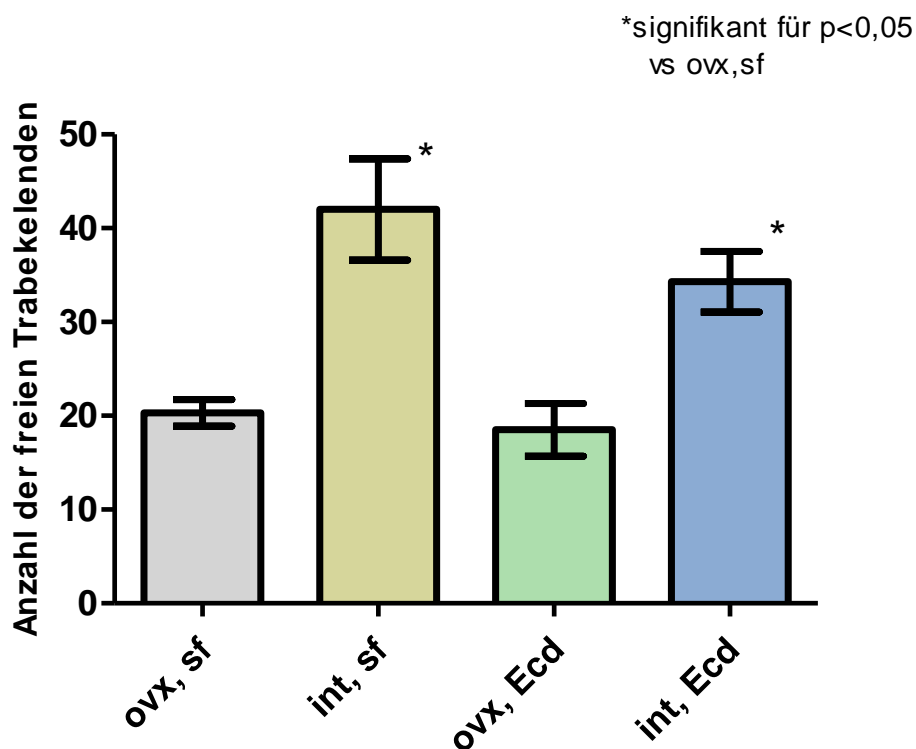


Abbildung 22: Vernetzungsanalyse- Anzahl der freien Enden. Int, sf und int, Ecd besaßen signifikant mehr freie Enden. OvX, Ecd wies keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

3.2.8.2 Anzahl der Trabekelverbindungspunkte

Trabekelverbindungspunkte entstehen durch das Aufeinandertreffen von zwei Trabekelachsen. In Abbildung 23 stellt die Ordinate die Anzahl der Trabekelverbindungspunkte und die Abszisse die einzelnen Gruppen dar. Hier sieht man ebenfalls, dass die int Tiere signifikant mehr Trabekelverbindungspunkte aufwiesen als die ovariectomierten. Ovx, Ecd Tiere hatten tendenziell mehr Verbindungspunkte (Mittelwert $8,4 \pm 1,5$) als die Kontrollgruppe (Mittelwert $3,9 \pm 0,5$), das Ergebnis war jedoch nicht statistisch signifikant. Int, sf Tiere hatten durchschnittlich $33,2 \pm 3,3$ und int, Ecd im Durchschnitt $35,2 \pm 2,3$ Trabekelverbindungspunkte.

Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Trabekelkonnektivität (proximale Tibia)

Anzahl der Trabekelverbindungspunkte

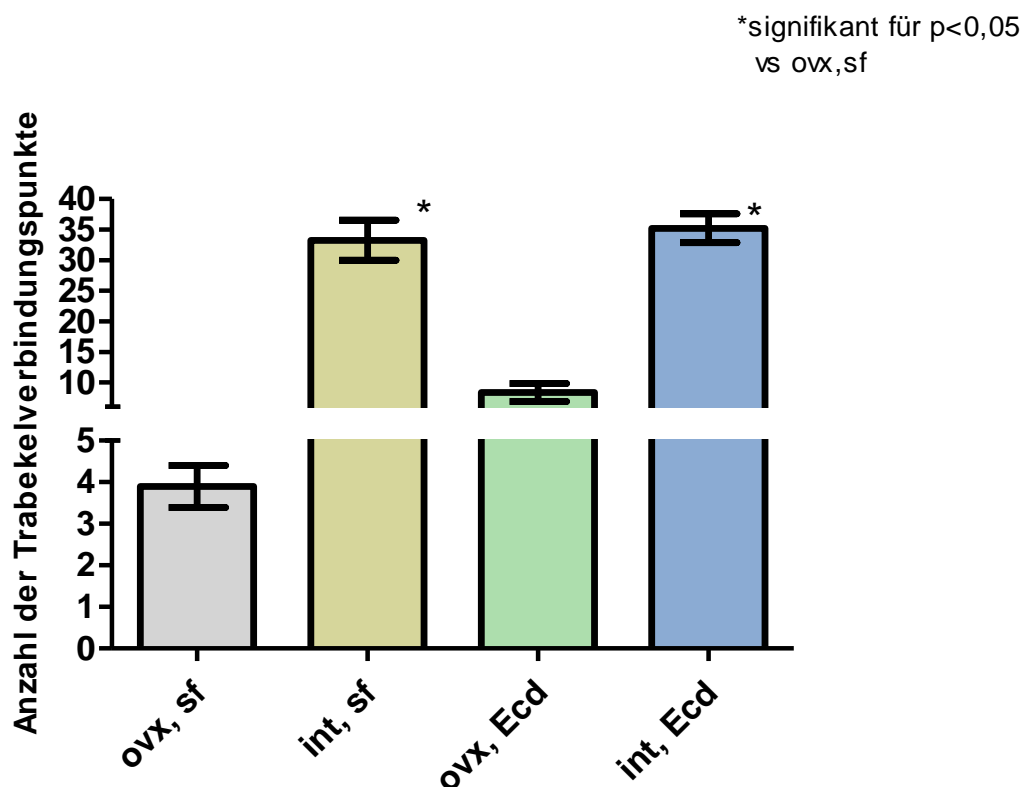


Abbildung 23: Vernetzungsanalyse- Anzahl der Trabekelverbindungspunkte. Int, sf und int, Ecd wiesen signifikant mehr Trabekelverbindungspunkte auf. Ovx, Ecd war im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht.

3.2.8.3 Anzahl der Trabekelknotenpunkte

Knotenpunkte werden von drei und mehr Trabekelachsen durchlaufen. In Abbildung 24 werden auf der Ordinate die Anzahl der Trabekelknotenpunkte und auf der Abszisse die Versuchsgruppen dargestellt.

Die ovx Tiere besaßen bei sf Futter durchschnittlich $1,6 \pm 0,4$ und bei Ecd Gabe im Durchschnitt $0,9 \pm 0,4$ Knotenpunkte pro Bild. Signifikant erhöht war die Anzahl bei den int Tieren mit Mittelwerten von $15,1 \pm 2,5$ bei sf und $13,9 \pm 1,4$ Knotenpunkten bei Ecd. Die Fütterung mit Ecdyson zeigte für beide Gruppen (ovx und int) keinen Vorteil gegenüber den jeweiligen Kontrollfuttermitteln.

Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Trabekelkonnektivität (proximale Tibia)

Anzahl der Trabekelknotenpunkte

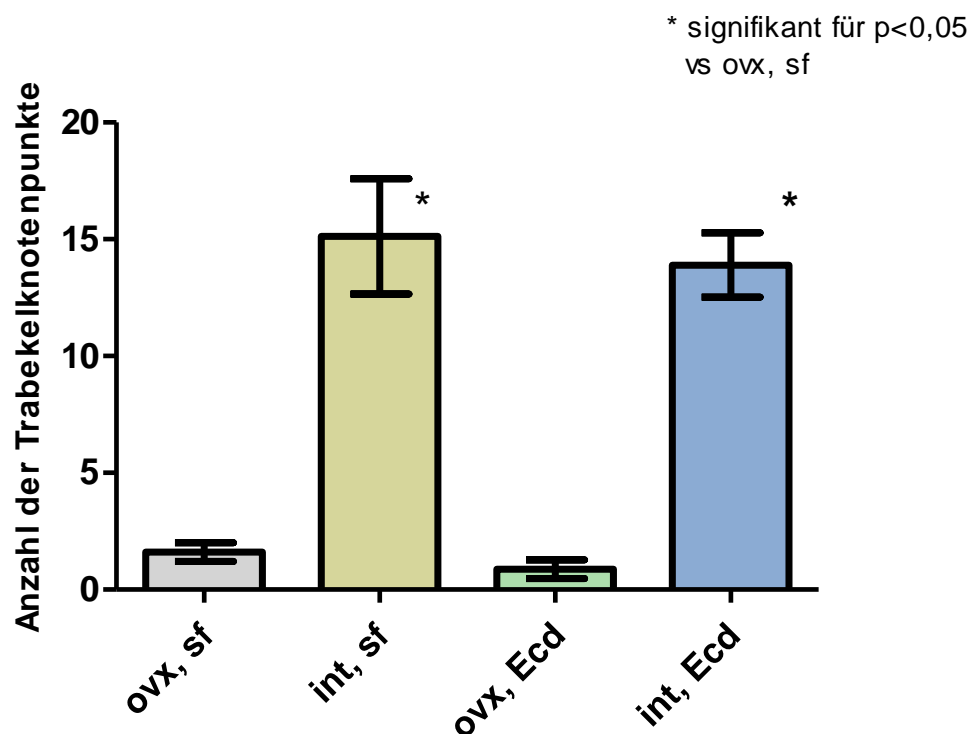


Abbildung 24: Vernetzungsanalyse- Anzahl der Trabekelknotenpunkte. Int, sf und int, Ecd wiesen signifikant mehr Trabekelknotenpunkte auf. OvX, Ecd zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.2.8.4 Index Knoten/freie Enden

Der Graph in Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse für die Indices Knoten/freie Enden der einzelnen Gruppen an. Die Ordinate stellt den Index Knoten/freie Enden dar, während auf der Abszisse die einzelnen Versuchsgruppen zur Darstellung kommen. Die int Tiere erreichten im Vergleich zu ovx Tieren hohe Indexwerte mit Mittelwerten von $0,42 \pm 0,1$ bei sf und $0,46 \pm 0,1$ bei Ecd Fütterung. Die ovx Ratten erzielten niedrige Werte mit Mittelwerten von $0,11 \pm 0,01$ bei sf und $0,08 \pm 0,02$ bei Ecd. Nur die int Gruppen waren signifikant verschieden zur Kontrollgruppe.

Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Trabekelkonnektivität (proximale Tibia)

Index Knoten/freie Enden

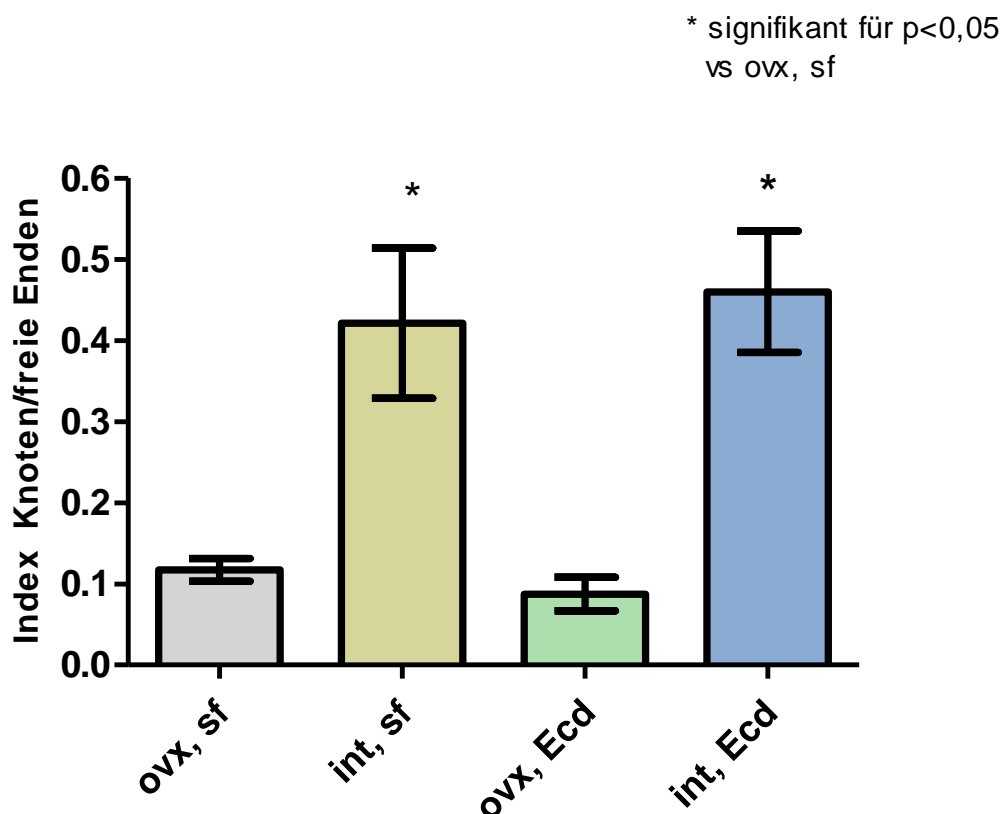


Abbildung 25: Vernetzungsanalyse- Index Knoten/freie Enden. Int, sf und int, Ecd wiesen jeweils einen signifikant höheren Index auf. Zwischen ovx, Ecd und der Kontrollgruppe wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen.

4. Diskussion

4.1 Allgemeines zur Studie und zur Testsubstanz

Die vorliegende Studie wurde unter der Fragestellung konzipiert, ob durch eine langfristige orale Applikation von β -Ecdyson Auswirkungen auf Knochen, Knorpel, Knochenmark und Markfett nachzuweisen sind. Hierfür wurden die Tibiaknochen von 20 Sprague-Dawley-Ratten nach einjähriger Versuchsdauer histomorphometrisch untersucht. Vorhergehende Versuche konnten stimulierende bzw. protektive Effekte von β -Ecdyson auf Knochen- und Knorpelgewebe im Kurzzeitversuch feststellen (Gao et al. 2008, Kapur et al. 2010, Seidlová-Wuttke et al. 2010 a, Seidlová-Wuttke et al. 2010 b, Walliser 2009, Wu et al. 2010). Dadurch ist das β -Ecdyson als potenzieller Wirkstoff für die Osteoporose-Therapie weiter ins Interesse der Forschung gerückt. Einleitend wurde bereits auf die immensen Gesundheitsschäden sowie die volkswirtschaftliche Belastung der Osteoporose eingegangen. Sowohl bei der Frau in der Postmenopause als auch bei der ovx Ratte ist der Wegfall hoher Östrogenkonzentrationen nachweislich für den enormen Knochenverlust bis hin zur Osteoporose verantwortlich (Kalu 1991, Riggs et al. 1998, Wronski et al. 1986). Wie in der Einleitung bereits näher belegt, stellt die ovx Ratte ein adäquates Tiermodell zur Untersuchung osteoporotischer Verhältnisse in der postmenopausalen Frau dar. Aufgrund der hohen Sensibilität für Östrogenmangelsituationen (Jee und Yao 2001) wurde die Studie an der proximalen Tibiametaphyse durchgeführt.

Neu an dieser Studie ist die besonders lange Dauer der Substanzapplikation. Es soll analysiert und diskutiert werden, ob die in Kurzversuchen dokumentierten positiven Effekte von β -Ecdyson auch im Langzeitversuch nachweisbar sind und ob β -Ecdyson eine mögliche Therapieoption bei postmenopausaler Osteoporose darstellt.

4.2 Analyse der Untersuchungsergebnisse

4.2.1 Gewichtsentwicklung und Futteraufnahme der Tiere

Die regelmäßigen Gewichtsmessungen zeigten einen relativ kontinuierlichen Anstieg des Körpergewichts bei allen Gruppen. Der Anstieg von Gewicht kann durch Körperwachstum, vermehrte Futteraufnahme, verminderter körperlicher Aktivität und/oder durch Stoffwechsellumstellungen verursacht sein. Da die Epiphysenfugen bei der Ratte zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihre Aktivität einstellen, ist es schwierig ab einem bestimmten Zeitpunkt von einem ausgewachsenen Tier zu sprechen (Jee und Yao 2001). Die normale Gewichtsentwicklung der Ratte wird am ehesten durch die Gruppe int, sf abgebildet, da diese Kontrollfutter erhielt und keiner hormonellen Manipulation durch Ovx unterworfen war.

Insgesamt verliefen die Gewichtskurven der jeweils ovx Gruppen und der jeweils int Gruppen annähernd deckungsgleich. Bei der ersten Messung, die vor der Ovx und im Alter von drei Monaten stattfand, waren die Ausgangsgewichte der einzelnen Gruppen in etwa gleich. Die im Anschluss folgende Eierstockentfernung hatte zur Folge, dass die int Ratten in den folgenden Messungen signifikant niedrigere Gewichte erzielten als die ovx Tiere. Dieser erwartungsgemäß eingetretene Effekt wurde bereits in vielen anderen Studien dokumentiert (Melton et al. 2000, Walliser 2009, Zhang et al. 2007). Bekannt ist auch der hier beobachtete Effekt, dass der Gewichtsunterschied zwischen ovx und int Gruppen sich schon in den ersten vier Wochen nach Ovx ausgeprägt manifestiert (Wade und Gray 1979).

Von der zweiten bis vierten Messung hingegen blieb die Gewichtsdivergenz zwischen ovx und int Gruppen relativ konstant bzw. zeigte eine leicht steigende Tendenz. Im Alter von acht und zehn Monaten blieben die Körpergewichte der Ratten annähernd gleich, so dass hier vermutlich ein vorläufiges Gewichtsplateau erreicht wurde. Bei einem Alter der Ratten von 15 Monaten war das mittlere Gewicht der Gruppe int, sf auf das Gewichtsniveau der ovx Gruppen angestiegen. Die Körpergewichte der Ratten waren bei dieser letzten Messung nicht signifikant verschieden, was eventuell mit dem hohen Alter der Tiere zusammenhängt.

Bei Vergleich von Gewichtsentwicklung und Nahrungsaufnahme der einzelnen Gruppen fällt auf, dass die ovx Ratten zwischen zweiter und achter Woche nach Ovx deutlich mehr als die int Ratten fraßen und dementsprechend einen deutlich steileren Anstieg des Körpergewichts hatten. Die Tiere der Gruppe int, sf fraßen von der fünften bis 12. Woche nach Versuchsbeginn sowie in der finalen Woche durchschnittlich am wenigsten. Gegen Ende des

Versuchs erreichten sie allerdings das Gewichtsniveau der ovx Ratten. Im Gegensatz dazu nahmen die int, Ecd Tiere in der neunten bis 12. Woche nach Ovx sowie in der finalen Woche ähnlich viel Nahrung zu sich wie die ovx Gruppen. Sie wogen aber zu jedem Messzeitpunkt weniger als diese, wenn auch der Unterschied in der letzten Gewichtsmessung nicht mehr signifikant war. Möglicherweise hängt dieses beobachtete Phänomen mit den in der Literatur beschriebenen Muskel-anabolen, Fett-reduzierenden und antidiabetischen Wirkungen von Ecdyson zusammenhängen kann (Báthori et al. 2008, Kizelsztein et al. 2009, Seidlová-Wuttke et al. 2010 b). Zudem war während des Versuchs beobachtet worden, dass Ecd Tieren insgesamt aktiver und neugieriger wirkten als jene Tiere mit Kontrollfutter.

Insgesamt gab es zwischen Ecd und sf Tieren keine bedeutenden Gewichtsunterschiede. Auch in anderen Versuchen der Abteilung Endokrinologie der UMG wogen ovx, sf und ovx, Ecd Tiere etwa gleich viel. Es wurde allerdings gezeigt, dass ovx, Ecd Tiere weniger Fett prätibial und abdominell, dafür aber mehr Muskelmasse besaßen als Tiere der Kontrollgruppe (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b).

Bei der Frau findet in den perimenopausalen Jahren ebenfalls eine Gewichtszunahme, vor allem eine vermehrt abdominelle Fetteinlagerung, statt (Keller et al. 2010, Lovejoy et al. 2008). Möglicherweise profitieren Frauen von β -Ecdyson ebenfalls mit einer verminderten abdominellen Fattanreicherung zugunsten eines vermehrten Muskelaufbaus (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b).

4.2.2 Gelenkknorpel

Der Alterungsprozess geht mit einem Ausdünnen der Gelenkknorpelschicht sowie wachsender Prävalenz und Schwere von Knorpeldefekten im Kniegelenk einher (Ding et al. 2005). Die nukleären Östrogenrezeptoren α und β sind sowohl beim Menschen als auch bei Ratten in den Chondrozyten des Gelenkknorpels nachzuweisen (Tankó et al. 2008, Ushiyama et al. 1999). Die Literatur zur Wirkung von Östrogenen auf den Gelenkknorpel ist sehr heterogen. In einer Übersicht von 2008 geben Tankó et al. einen Überblick über bisherige Studien zu Östrogenwirkungen am Knorpel, auch über solche, die via Mediatoren vermittelt werden. Sie fassen zusammen, dass es ein weites Aufgebot an Belegen gibt, die auf Gelenk- und chondroprotektive Eigenschaften hinweisen. Zudem betonen sie die Bedeutung der Dosierung bzw. Konzentration von Östrogenen im Hinblick auf die Dualität der

Östrogenwirkungen am Knorpel. Möglicherweise hängen damit auch die unterschiedlichen, teils konträren Studienergebnisse zusammen. Ab dem Alter von 50 Jahren, also ungefähr zum Zeitpunkt der Menopause, ist bei Frauen ein dramatischer Anstieg der Prävalenz von Arthrose zu verzeichnen, der die Arthrose-Prävalenz des Mannes übertrifft (Sniekers et al. 2010). Des Weiteren konnten mehrere Studien belegen, dass Frauen mit Östrogeneinnahme in der Anamnese ein niedrigeres Risiko für Arthrose in Hüft- und Kniegelenken haben (Felson und Nevitt 1998). Auch bei Tieren spricht vieles für eine chondroprotektive Eigenschaft von Östrogenen. So konnten in verschiedenen Tierexperimenten, unter anderem mit Ratten, gezeigt werden, dass ein Östrogenmangel nach Ovx zu Schäden des Knorpels, wie zum Beispiel oberflächlichen Erosionen oder Ausdünnen der Knorpelschicht, führt (Høegh-Andersen et al. 2004, Kapur et al. 2010, Sniekers et al. 2008, Sniekers et al. 2010).

Auch in dieser Studie wurde gezeigt, dass innerhalb der Gruppen mit dem Kontrollfutter die int Tiere eine wesentlich dickere Schicht des Gelenkknorpels aufwiesen als die ovx Tiere, was die Annahme eines chondroprotektiven Effekts der Östrogene unterstützt. Insgesamt verfügten alle Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe über eine signifikant dickere Knorpelschicht. Kapur et al. (2010) und Steinmark (2012) demonstrierten jeweils in Kurzversuchen, eine chondroprotektive Wirkung von β -Ecdyson bei Ovx in Bezug auf die Dicke des tibialen Gelenkknorpels. Auch in dieser Arbeit war die β -Ecdyson Gabe innerhalb der ovx Tiere mit dem Ergebnis eines signifikant dickeren Gelenkknorpels verknüpft. Somit lässt sich die chondroprotektive Eigenschaft von β -Ecdyson bei ovx Tieren auch im Langzeitversuch bestätigen.

Bei den int Tieren bewirkte die Applikation von β -Ecdyson allerdings einen konträren Effekt: Zwar war der Knorpel im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant dicker, aber im Vergleich zu den int, sf Tieren waren ihre Knorpelschichten dünner. Offensichtlich führten die Verabreichung von β -Ecdyson und die Östrogenspiegel bei int Eierstöcken nicht zu einem additiven Effekt. Da gezeigt worden war, dass β -Ecdyson nicht an Östrogenrezeptoren bindet (Seidlová-Wuttke et al. 2010 a, Báthori et al. 2008), ist somit auch ausgeschlossen, dass beide Substanzen kompetitiv um die Östrogenrezeptorstelle konkurrieren.

Letztendlich bleibt unklar, weshalb innerhalb der int Gruppen die Tiere nicht von einer β -Ecdyson-Gabe profitierten. Da unseres Wissens keine weiteren Studien über die Wirkung von β -Ecdyson auf Knorpelgewebe bei int Tieren in der Fachliteratur verfügbar sind, bestehen keine weiteren Vergleichsmöglichkeiten.

Insgesamt ist die Wirkung von Östrogenen, bzw. deren Mangel nach Ovx, auf das Knorpelgewebe umstritten. Es wird allerdings vermehrt von einer chondroprotektiven Wirkung der Östrogene innerhalb eines multifaktoriellen Geschehens ausgegangen. Auch in dieser Studie war der Knorpel von ovx, sf wesentlich dünner als von int, sf. Die β -Ecdyson Gabe wirkte sich innerhalb der ovx Tiere positiv aus, sodass ein weiterer Hinweis vorliegt, dass Frauen in der Postmenopause von einer β -Ecdyson Einnahme profitieren.

4.2.3 Epiphysenfuge

Bei der Epiphysenfuge oder auch Wachstumsplatte handelt es sich um eine hyaline Knorpelschicht, die zwischen Metaphyse und Epiphyse an den Enden der langen Röhrenknochen lokalisiert ist. Das Prinzip des longitudinalen Wachstums beruht darauf, dass in der Epiphysenfuge Zellproliferation stattfindet, diese gebildete Substanz von der Metaphyse her abgebaut und letztlich durch Knochengewebe ersetzt wird.

Östrogene initiieren sowohl bei Mädchen als auch bei Jungen einerseits den pubertären Wachstumsschub und bewirken andererseits das Ende des longitudinalen Wachstums, indem sie den Schluss der Epiphysenfugen und somit deren Ossifizierung bewirken (Chagin und Sävendahl 2007, Morishima et al. 1995).

Im Unterschied zum Menschen erfolgt bei Ratten keine Verknöcherung der Epiphysenfugen (Roach et al. 2003). Allerdings ist auch hier das longitudinale Knochenwachstum von Östrogenen abhängig: Phasen schnellen Knochenwachstums treten bei niedrigen Östrogenspiegeln auf und Phasen langsamen Knochenwachstums bei hohen Östrogenspiegeln (Turner et al. 1994). Die Dicke der Epiphysenfuge ist positiv mit der Wachstumsrate korreliert (Villemure und Stokes 2009, Wilsman et al. 1996). Dementsprechend konnte in verschiedenen Beiträgen gezeigt werden, dass ein Östrogenmangel, verursacht durch eine Ovx, eine Dickenzunahme der Epiphysenfuge zur Folge hat (Yao et al. 2006, Yamashiro und Takano-Yamamoto 1998, Ornoy et al. 1994).

In Experimenten mit jungen Ratten zeigten Kapur et al. (2010) und Steinmark (2012), dass ovx Tiere mit Östrogen im Futter eine dünnere Epiphysenfuge hatten und dass β -Ecdyson-haltiges Futter bei ovx Tieren zu einer dickeren Epiphysenfuge führte.

Dieser Effekt konnte im Langzeitversuch nicht beobachtet werden. Die errechnete Gesamtdicke der Epiphysenfuge zeigte innerhalb der Gruppen keine signifikanten Abweichungen, sodass weder Ovx noch β -Ecdyson einen messbaren Effekt erzielten.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Östrogene bzw. Östrogenmangel und β -Ecdyson bei alten Tieren mit inaktiver Epiphysenfuge keinen Effekt mehr auf die Dicke jener haben.

Desweiteren ergaben die Messungen der Reservezone, dass die Vergleichsgruppen tendenziell dicker waren als die Kontrollgruppe; signifikant war das Ergebnis nur bei den int, Ecd Tieren. Ein Östrogenmangel scheint demnach keine Auswirkungen auf die Dicke der Reservezone zu haben. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Studien, wo nur über Auswirkungen durch Ovx auf die beiden anderen Zonen berichtet wurde. Int Ratten profitieren durch β -Ecdysongabe mit einer signifikant dickeren Reservezone. Allerdings lieferte die Literaturrecherche zur Frage, ob die Dicke der Reservezone positiv mit dem Knochenwachstum korreliert sei, keine Aussagen.

In Bezug auf die Proliferations- und hypertrophe Zone ist hingegen bekannt, dass beide Schichtdicken positiv mit der Wachstumsrate korreliert sind (Villemure und Stokes 2009, Wilsman et al. 1996). Besonders Veränderungen in der hypertrophen Zone, wie beispielsweise die Zellschwellung, beeinflussen die Elongation; Auswirkungen auf die Elongation durch Veränderungen in der Proliferationszone fallen geringfügiger aus (Wilsman et al. 1996). Genau wie eine Ovx zur Dickenzunahme der gesamten Epiphysenfuge führt, bewirkt Ovx dementsprechend eine Verdickung der hypertrophen Zone (Yao et al. 2006). Kapur et al. veröffentlichten im Jahr 2010 Ergebnisse, wonach ovx Tiere mit β -Ecdysonhaltigem Futter eine dickere Proliferations- und hypertrophe Zone besaßen.

Im Langzeitversuch war die Proliferationszone innerhalb der sf Gruppen bei int Tieren erwartungsgemäß dünner als bei ovx. Unter β -Ecdyson Gabe war die Proliferationszone der int Tiere signifikant dicker im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei ovx Ratten hatte β -Ecdyson keinen Effekt.

Bei den Messungen zur Hypertrophen Zone dieser Studie waren int, sf und ovx, Ecd signifikant dicker, wohingegen int, Ecd signifikant dünner im Vergleich zur Kontrollgruppe war. Die Ergebnisse waren hier uneinheitlich, sodass weder durch Ovx noch durch β -Ecdyson-Gabe ein eindeutiger Effekt festgestellt werden konnte.

In den genannten Vergleichsstudien wurden Mäuse und Ratten untersucht, die jünger als vier Monate waren. Im Gegensatz dazu wurden die Ratten im Rahmen dieser Studie 15 Monate alt. Ältere Tiere haben verglichen mit Jüngeren eine verminderte Wachstumsrate, eine generell verminderte Epiphysenfugendicke sowie erhöhte Apoptoseraten (Chrysis et al. 2002). Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der Ergebnisse wäre somit, dass der Effekt von der Dickenzunahme der Epiphysenfuge, sowie der Proliferations- und hypertrophen Zone, nach Ovx zeitlich befristet auftritt und in älteren Tieren nicht mehr nachweisbar ist. Ebenso war der bei Kapur et al. (2010) nachgewiesene stimulierende Effekt von β -Ecdyson auf die Epiphysenfuge und die einzelnen Zonen bei älteren Tieren nicht mehr bzw. nur noch teilweise, bei int Tieren für die Reserve- und Proliferationszone, vorhanden.

Insgesamt erbrachten die Messungen zur Evaluierung der Epiphysenfugendicke und ihrer einzelnen Zonen nicht die erwarteten Resultate. Die Tiere waren mit 15 Monaten anscheinend zu alt für eine Untersuchung der Epiphysenfugendicke, da Studien zufolge bei Ratten im Alter von 15 Monaten das longitudinale Knochenwachstum der proximalen Tibia-Epiphysenfuge eingestellt ist (Jee und Yao 2001, Horton et al. 2008). Bei Ratten mit inaktiver Epiphysenfuge scheinen die bisher in der Literatur beschriebenen Wirkungen von Ovx bzw. β -Ecdyson nicht mehr vorhanden zu sein, sodass weder durch Ovx noch durch Ecdyson-Gabe eindeutige Effekte erzielt werden konnten.

4.2.4 Kortikalis

Die Dicke und die Porosität sind die entscheidenden Einflussgrößen der Kortikalis auf die Knochenfestigkeit (Dalle Carbonare und Giannini 2004). Ein großer Unterschied zwischen der Kortikalis von Menschen und der von Ratten bezieht sich auf die Havers-Kanäle. Beim Menschen sind sie als Zeichen des Remodeling in der Kortikalis vorhanden. Bei der Ratte sind Havers-Kanäle hingegen nur in geringem Ausmaß und hauptsächlich bei älteren Tieren zu finden (Kalu 1991), was vermuten lässt, dass Remodeling-Kapazitäten der Kortikalis bei Ratten nur geringfügig existieren. Dennoch wird von Jee und Yao, 2001, die Kortikalis der Ratte als suffizientes Modell angesehen, da das Muster und die Lokalisation des kortikalen Knochenverlusts bei Ratten und Säugetieren identisch sind (Jee und Yao 2001).

Sowohl bei Frauen als auch bei Ratten betreffen die ossären Veränderungen bedingt durch Postmenopause bzw. Ovx hauptsächlich die Spongiosa (Kalu 1991). Die Kortikalis wird durch die Ovx nicht bzw. kaum vermindert (Kalu 1991). Dies konnte auch hier beobachtet werden,

da die Kortikalisdicke der ovx Tiere im Vergleich mit den int Tieren nicht vermindert war. Die Messungen im Bereich der Metaphyse ergaben vielmehr, dass nur die Gruppe int, Ecd eine signifikant verminderte Kortikalisdicke besaß. Die Kortikalis der Gruppen int, sf und ovx, Ecd waren nur tendenziell dünner im Vergleich zur Kontrollgruppe. Faktoren, die kortikale Veränderungen herbeiführen, scheinen vielmehr Inaktivität und Alterungsprozesse zu sein (Gabet und Bab 2011, Miyagawa et al. 2011). Die Hauptveränderungen durch Alter sind eine Verminderung von BMD und kortikaler Dicke, sowie erhöhte Porosität und vergrößerter Durchmesser der Markhöhle (Gabet und Bab 2011). Sowohl bei Menschen als auch bei Ratten tritt der Hauptverlust von kortikalem Knochen peri-endokortikal, also nahe der Markhöhle, auf (Jee und Yao 2001). Ein Nettoverlust an Kortikalis wird initial dadurch verhindert, dass periostale Apposition von Knochengewebe die endokortikale Resorption aufwiegt (Jee und Yao 2001).

Das Utah Paradigma unterstreicht die Bedeutung der mechanischen Kräfte, die auf den Knochen wirken und ihn beeinflussen. Demzufolge führt eine ausreichend starke Beanspruchung zu einer positiv adaptiven Antwort im Sinne einer Knochensubstanzvermehrung (Jee 2000). In dieser Studie wurde das Muskelgewebe der Ratten nicht untersucht. Allerdings ist aus anderen Versuchen bekannt, dass Ecdyson eine Muskel- anabole Wirkung besitzt (Dinan 2009, Gorelick-Feldman et al. 2008, Tóth et al. 2008). Unter diesem Aspekt ist es besonders verwunderlich, weshalb die int, Ecd Tiere eine signifikant dünnere Kortikalis im Metaphysenbereich besaßen. Allerdings ist auch bekannt, dass das Körpergewicht positiv mit Knochenmasse und -dichte korreliert ist (Hamrick et al. 2008). Die int, Ecd Tiere waren am Ende der Studie die Gruppe mit dem geringsten Körpergewicht. Dem entsprechen die Ergebnisse einer Studie mit Mäusen, wonach bei niedrigem Körpergewicht die kortikale Dicke bei Femur und Wirbelkörper signifikant geringer war als bei Tieren mit höherem Gewicht (Hamrick et al. 2008).

Die Dicke der Kortikalis hängt im Weiteren auch mit dem endostealen Spongiosaknochen zusammen. Kommt es zum Verlust von endostealem Knochen, findet periosteale Apposition im Sinne eines Kompensationsmechanismus statt (Seeman 2002). Dies hat den Sinn, dass es zu einer vorteilhaften Verteilung der Last auf eine vergrößerte Querschnittsfläche des Knochens kommt. Die Tatsache, dass die Gruppe int, Ecd eine signifikant dünnere Kortikalis im Bereich der Metaphyse aufweist, könnte im Umkehrschluss als indirekter Hinweis darauf

gewertet werden, dass diese Tiere noch vermehrt endosteale Knochenmasse besitzen. Dies entspricht den Beobachtungen, die unter 4.2.5 diskutiert werden.

4.2.5 Trabekulärer Flächenanteil in der Metaphyse

Die Spongiosa der Ratte unterliegt regelmäßigen Remodeling- Prozessen, die denen des Menschen ähnlich sind. Sowohl Ratten als auch Frauen reagieren auf einen Östrogenmangel mit einem Verlust von Knochensubstanz (Kalu 1991). Dieser Prozess findet bei beiden Spezies zweiphasig statt. Er beginnt mit einer Phase rapiden Knochenverlusts, der hauptsächlich die Spongiosa betrifft (Wronski et al. 1989). Unterschiede zwischen der postmenopausalen Frau und dem Modell der ovx Ratte bestehen im Hinblick auf das Vorkommen von Frakturen: postmenopausale Frauen mit Osteoporose sind hochgradig gefährdet, Frakturen zu erleiden. Obwohl der Spongiosaverlust der ovx Ratte massiv ist (siehe Abb. 9 und 10 sowie Abb. 26 und 27), sind keine Osteoporose-bedingten Frakturen bei der Ratte bekannt (Kalu 1991). Aufgrund ihrer dem Menschen ähnlichen Spongiosa-Eigenschaften stellt die Ratte dennoch insgesamt ein viel verwendetes Modell dar.

Die Bestimmung der Trabekelfläche sollte der Abschätzung des Spongiosavolumenanteils im endokortikalen Raum dienen und erfolgte an drei metaphysären Ausschnitten pro Tibiapräparat. Die Messungen zeigten, dass die int Tiere wie erwartet deutlich mehr Trabekelfläche besaßen als die ovariektomierten. Der hier beobachtete Effekt der Spongiosararefizierung ist auf das Ausdünnen der Trabekel, die verminderte Anzahl an Trabekeln sowie einen Rückgang der inter-trabekulären Konnektivität zurückzuführen (Marcu et al. 2011).

Die β -Ecdyson-Gabe zeigte innerhalb der ovx Gruppen keinen protektiven Effekt. In Kurzzeitversuchen, die in der Abteilung Endokrinologie der UMG durchgeführt worden waren (Kapur et al. 2010, Steinmark 2012, Walliser 2009), hatten die Messungen bei gleicher Methodik ergeben, dass ovx Tiere mit β -Ecdyson im Futter einen signifikant höheren Trabekelanteil hatten als die Kontrollgruppe (ovx, sf). Dieser Effekt ließ sich im Langzeitversuch nicht reproduzieren. Allerdings zeigte die β -Ecdyson-Gabe für int Tiere eine signifikante Wirkung: Die Tiere der Gruppe int, Ecd hatten etwa 6 % mehr Trabekelfläche als die int, sf Tiere. Dieses Resultat spiegelt sich in den pQCT-Ergebnissen wider. Die letzte

pQCT-Messung zeigte bei den int Tieren eine positive Wirkung von β -Ecdyson auf die Trabekeldichte (siehe Abbildung 26).

Aus den Resultaten der Kurzversuche und dieses Langzeitversuchs lässt sich ableiten, dass β -Ecdyson einen messbar osteoprotektiven Effekt bietet; im Langzeitversuch nur für die int Ratten, im Kurzversuch auch für die ovx Tiere (Walliser 2009). Die β -Ecdyson-Einnahme konnte für die ovx Tiere bei einjähriger Versuchsdauer keine Knochen-schützende, das heißt keine Spongiosa-erhaltende Wirkung erzielen. Ursächlich sind wahrscheinlich Knochenalterung und lang andauernder Östrogenmangel, der durch β -Ecdyson nicht mehr aufgewogen werden konnte.

4.2.6 Flächenanteil des Fettgewebes in der Metaphyse

Die Ergebnisse zeigen, dass die int Gruppen signifikant weniger Fettgewebe im Bereich der Metaphyse aufwiesen. Die ovx Gruppen besaßen gegenüber den int Tieren einen annähernd dreimal so hohen Fettanteil. Auswirkungen aufgrund der unterschiedlichen Fütterung waren nicht messbar.

Der Alterungsprozess spielt bei Menschen und Tieren eine Rolle bei der Knochenmarksinfiltration durch Fettgewebe (Duque 2008). Der Übergang in die Postmenopause ist bei Frauen mit einer Gewichtszunahme assoziiert. Ratten erfahren nach einer Ovx ebenfalls eine Zunahme des Körpergewichts (siehe Abb. 11). Eine Studie an postmenopausalen Frauen konnte demonstrieren, dass Östrogenmangel die Infiltration des Knochenmarks durch Fett steigert und eine Östrogensubstitution dies verhindert (Syed et al. 2008). Elbaz et al. zeigten 2009, dass Östrogensubstitution bei alten Mäusen eine signifikante Reduktion der Adipozytenanzahl bewirkt. Dementsprechend zeigten die ovx Ratten hier höhere und die int Gruppen signifikant niedrigere Markfettanteile im endostealen Raum.

Sowohl Osteoblasten als auch Adipozyten gehen aus mesenchymalen Stammzellen hervor. Es scheint, dass sich die Differenzierung der Zellen durch altersbedingte Veränderungen, beispielsweise im Hinblick auf Transkriptionsfaktoren, zugunsten der Adipozyten und auf Kosten der Osteoblasten verschiebt (Duque 2008, Sadie-Van Gijsen et al. 2012). So zeigten beispielsweise Shen et al. 2007, dass das Knochenmarkfettgewebe und die BMD invers miteinander korreliert sind. Die Ergebnisse verschiedener Studien lassen Vermutungen über

eine toxische Wirkung des Fettgewebes auf das Knochengewebe zu. So demonstrierte zum Beispiel eine *in-vitro*-Studie, dass in Anwesenheit von reifen Adipozyten des weißen Fettgewebes die Proliferation von menschlichen Osteoblasten gehemmt wurde (Maurin et al. 2000). Gasparrini et al. (2009) gehen davon aus, dass eine vermehrte Zytokinausschüttung der Adipozyten zu einem toxischen Effekt auf den alternden Knochen führt. Auch in dieser Studie besaßen die Tiere mit der wenigsten spongiösen Knochensubstanz den höchsten Gehalt an Markfett.

Andere Studien haben Hinweise geliefert, dass β -Ecdyson neben der Muskel-anabolen Potenz eine günstige Auswirkung auf den Fettstoffwechsel haben kann. Beispielsweise hatten Ratten mit β -Ecdyson im Futter signifikant weniger Fettgewebe im Abdomen als die Kontrollgruppe (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b).

Die Fütterung mit β -Ecdyson brachte in dieser Studie jedoch keine Vorteile im Sinne einer Markfettreduzierung. Es gibt viele Hinweise darauf, dass Fett im Knochenmark nicht den üblichen hormonellen und metabolischen Regulationsmechanismen für Fettgewebe unterliegt (Duque 2008). An Nagetieren durchgeführte Studien zeigten erwartungsgemäß, dass eine niedrigkalorische Diät unter anderem mit folgenden Symptomen einhergeht: Verlust von Körpergewicht, Körperfett und Knochenmasse, verminderte BMD, verminderten Knochenformations-Indices und erhöhten Knochenresorptionsindices. Allerdings wurde dabei auch festgestellt, dass die kalorische Restriktion zu keiner Veränderung oder sogar zu einer Erhöhung des Knochenmarkfetts führte (Devlin et al. 2010, Duque 2008). Demnach scheint es durchaus unterschiedliche Regulationsmechanismen für normales Fettgewebe und Markfett zu geben.

Bei einem Östrogenmangel durch Ovx findet sowohl für normales Fettgewebe als auch für Markfett eine Volumenzunahme statt. Im Kurzversuch wurde demonstriert, dass β -Ecdyson in der Lage ist, das Markfett bei ovx Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe zu reduzieren (Walliser 2009). Im Langzeitversuch spielt β -Ecdyson im Stoffwechsel des Markfetts nach den Ergebnissen dieser Studie keine entscheidende Rolle mehr.

4.2.7 Flächenanteil des Knochenmarks in der Metaphyse

Ort der Hämatopoese ist das rote Knochenmark. Aus hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) entstehen die Vorstufen und schließlich die reifen Formen von Leuko-, Erythro- und

Thrombozyten. Im Kurzzeitversuch der Abteilung wurde gezeigt, dass int im Gegensatz zu ovx Tieren mehr rotes Knochenmark besitzen und dass der Nachteil der ovx Tiere durch β -Ecdyson ausgeglichen werden konnte (Walliser 2009). Im Langzeitversuch ließen sich diese Ergebnisse nicht reproduzieren. Hier besaßen die ovx, Ecd-Tiere signifikant weniger rotes Knochenmark als die Kontrollgruppe. Die int Tiere zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

Die HSZ sind in den sogenannten Knochenmarksnischen lokalisiert, die von ausdifferenzierten Zellen wie Osteoblasten, Adipozyten oder Endothelzellen aus der mesenchymalen Zellreihe gebildet werden. Diese Nischen und das Mikro-Umfeld, das sie schaffen, sind von essenzieller Bedeutung für die Regulation der Hämatopoese (Shen und Nilsson 2012). Osteoblasten scheinen auf Wachstum und Funktion der HSZ eine unterstützende Wirkung zu haben, wohingegen Studien dafür sprechen, dass Adipozyten die hämatopoetische Aktivität supprimieren (Wang und Wagers 2011). Diese Studienergebnisse bieten eine mögliche Erklärung für das Phänomen, dass mit fortgeschrittenem Alter sowohl Knochenmasse als auch Hämatopoese abnehmen, wohingegen die Masse an Markfett zunimmt.

Eine indirekte Wirkungsweise der Östrogene über die gesteigerte Aktivität von Osteoblasten, die wiederum ihrerseits die Hämatopoese stimulieren, gilt als wahrscheinlich (Kim et al. 2011). So wurde bei postmenopausalen Frauen eine signifikante positive Beziehung zwischen BMD und Anzahl der peripheren Blutzellen demonstriert (Kim et al. 2011).

In dieser Studie nahmen die ovx Tiere zwar an Knochenmasse ab und an Markfett zu, eine Abnahme der Hämatopoese wurde allerdings nur zum Teil beobachtet.

Die Literatur zu den direkten Wirkungen der Östrogene auf Knochenmark und Hämatopoese ist heterogen in ihren Ergebnissen. Illing et al. demonstrierten 2012, dass Östrogene zu einer Erhöhung der Zellzahl von HSZ in der vaskulären Nische, aber nicht in der endostealen Knochenmarksnische führen. Dieser Effekt trat bei ER α -Knockout-Mäusen auf, die keine Östrogen-bedingte Erhöhung der Knochenmasse entwickelten. Demzufolge scheint es auch vom Knochengewebe unabhängige, eventuell direkte Wirkungen von Östrogenen auf HSZ zu geben (Illing et al. 2012).

Hingegen fanden Benayahu et al. zwischen ovx und int Tieren keine Veränderungen in der Häufigkeit von myeloischen Zellen (Benayahu et al. 2000).

Als sicher gilt, dass Östrogene das Immunsystem modulieren. So wirkt Östrogen als negativer Regulator der B Lymphopoese, der Granulozyten-induzierten Entzündung sowie der Aktivität der NK-Zellen und als positiver Regulator der Antikörper Bildung (Benayahu et al. 2000, Carlsten 2005).

Von β -Ecdyson wurde angenommen, dass es einen positiven Einfluss auf die Hämatopoese ausübt. Syrov et al. demonstrierten, dass Ecdysterioide die Erythropoese stimulieren (1997). Im Kurzzeitversuch der Abteilung erhöhte β -Ecdyson bei ovx und int Tieren signifikant die Menge an Knochenmark (Walliser 2009). Im Langzeitversuch profitieren die Tiere nicht von β -Ecdyson. Vielmehr hatten die ovx Tiere signifikant weniger Knochenmark. Denkbar wäre, dass β -Ecdyson nur für einen begrenzten Zeitraum einen stimulierenden Effekt auf das Knochenmark ausübt.

Bei Vergleich der Ergebnisse zwischen Kurz- und Langzeitversuch fällt auf, dass der Knochenmarksanteil der ovx, sf-Tiere sowohl bei den jungen als auch bei den alten Tieren sich nicht veränderte und bei etwa 15 % lag. Die anderen Gruppen, vor allem die Ecd-Tiere, verloren hingegen massiv an Knochenmark (zum Vergleich siehe Abb. 29). Es scheint im Alter zu einer hämatopoetischen Erschöpfung von int und Ecd-Tieren zu kommen. Nach initialer Stimulation durch β -Ecdyson auf das Knochenmark, scheint der altersbedingte Rückgang von Knochenmark bei Langzeit-Ecd-Fütterung letztendlich verstärkt zu werden. Die Fütterung von β -Ecdyson an alte ovx Ratten bewirkte, dass der Knochenmarksanteil unter das Niveau der Kontrolltiere fiel.

4.2.8 Vernetzungsanalyse

Die Vernetzungsanalyse nach der Methode von Dalle Carbonare et al. (2005) und Garrahan et al. (1986) diente der Evaluierung der trabekulären Konnektivität. Diese stellt einen entscheidenden Einflussfaktor auf die mechanische Festigkeit des Knochens dar (Dalle Carbonare und Giannini 2004). Es ist bekannt, dass sowohl Alter als auch Ovx sich negativ auf die Trabekelvernetzung auswirken und zu einer fortschreitenden Trabekelrarefizierung führen (Bagi und Miller 1994, Gabet und Bab 2011, Marcu et al. 2011).

In dem Kurzversuch unserer Abteilung (Walliser 2009) war ebenfalls die Methode nach Dalle Carbonare et al. (2005) und Garrahan et al. (1986) angewendet worden. Dort war gezeigt worden, dass die Tiere nach Ovx erheblich an trabekulärer Konnektivität einbüßen. Es

konnte zudem demonstriert werden, dass ovx Tiere von der β -Ecdyson-Gabe profitieren. Ihr Konnektivitätsindex lag signifikant höher als der der ovx Kontrollgruppe.

Die int Ratten dieser Studie besaßen gegenüber den ovx Tieren erwartungsgemäß signifikant mehr freie End-, Verbindungs- und Knotenpunkte. Des Weiteren war der Index Knoten/freie Enden, der laut Carbonare et al. (2005) eine Beurteilung der räumlichen Konnektivität erlaubt, bei den int Ratten erwartungsgemäß signifikant höher. Es lässt sich somit bestätigen, dass die Konnektivität bzw. die räumliche Vernetzung der Trabekel der int Tiere viel besser ist als bei ovx Tieren. Abbildung 10 zeigt die gravierenden Verluste der metaphysären Spongiosa, die aufgrund des Östrogenmangels bei der Ratte auftraten.

Die histomorphometrische Untersuchung dieser Arbeit zeigte weder in den ovx noch in den int Tieren signifikante Effekte von β -Ecdyson. Weder bei den Messungen für freie End-, noch für Verbindungs-, noch für Knotenpunkte gab es messbare Vorteile durch β -Ecdyson Gabe. Die Tiere der Gruppe ovx, Ecd besaßen lediglich tendenziell mehr Verbindungspunkte als die Kontrollgruppe ovx, sf.

Es ist daher festzuhalten, dass sich die Gabe von β -Ecdyson positiv auf die trabekuläre Konnektivität bei Ovx auswirkt (Walliser 2009), dass dieser Effekt allerdings zeitlich begrenzt nachweisbar ist. Bei 15 Monate alten Ratten mit einjährigem Östrogenmangel wirkte das β -Ecdyson nicht mehr ausgleichend im Hinblick auf eine verbesserte räumliche Konnektivität der Trabekel.

4.3 Zusammenhänge der einzelnen Gewebearten

Adulte Bindegewebszellen, wie Chondrozyten, Osteoblasten und Adipozyten, stammen alle von mesenchymalen Stammzellen ab. Die Zusammenhänge zwischen Knochen, Muskel, Gelenkknorpel und Körpergewicht sind komplex und nur zum Teil erforscht.

Bekannt ist das Prinzip der funktionellen Anpassung der Spongiosa-Architektur an Veränderungen der mechanischen Beanspruchung (Lüllmann-Rauch 2006). Bei mangelnder Beanspruchung, beispielsweise bei langer Immobilisationsdauer, kommt es daher zu einem deutlichen Verlust an Knochenmasse. Nach der Mechanostat-Theorie von Frost muss die mechanische Beanspruchung eine bestimmte Grenzwerte überschreiten, um zu einer

positiv adaptiven Antwort im Sinne einer Knochensubstanzvermehrung zu führen (Jee 2000). Die größte Belastung für den Knochen kommt hierbei von den Muskeln (Jee 2000). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass mit steigendem Alter Muskel- und Knochenmasse simultan abnehmen, und dass diesem Rückgang abnehmende Aktivitätslevel vorausgegangen sind (Hamrick et al. 2006). Dem entsprechen verschiedene Studien, dass körperliches Training zu einem Aufbau an Knochenmasse führen kann, bzw. zumindest den altersbedingten Rückgang an Knochenmasse zu mildern vermag (Gómez-Cabello et al. 2012). Die mechanische Beanspruchung der Knochen ist bei Frauen mit niedrigem Körpergewicht tendenziell geringer, als bei Frauen mit höherem Gewicht. Ein niedriger BMI wurde dementsprechend als Risikofaktor für das Auftreten Osteoporose-assoziiierter Frakturen identifiziert (DVO e.V. 2009). Traditionell wurde Übergewicht im Sinne der Theorie der mechanischen Belastung als vorteilhaft für die Knochenformation angesehen, obwohl es ein Risikofaktor für viele andere chronische Krankheiten darstellt. Auf der anderen Seite mehren sich die Anzeichen, dass Übergewicht und Fettakkumulation, die bekannterweise zu einer chronischen Entzündungsreaktion führen, auch schädlich für das Knochengewebe sind. In einer Übersicht von 2011 beschreibt Cao verschiedene Mechanismen, wie sich Adipositas negativ auf das Knochengewebe auswirkt. Demnach führen proinflammatorische Zytokine beispielsweise zu einer vermehrten Knochenresorption. Zudem stört eine extrem fetthaltige Ernährung möglicherweise die intestinale Calciumaufnahme. Da Osteoblasten und Adipozyten von derselben multi-potenten mesenchymalen Stammzelle abstammen, wird möglicherweise bei einer Stimulierung der Adipozytengnese die Osteoblastengnese gleichzeitig gehemmt. Dementsprechend sind BMD und Markfett invers miteinander korreliert (Shen et al. 2007). Mittlerweile sprechen viele Fakten für einen toxischen Effekt der Adipozyten auf die Osteoblasten und auf Zellen der Hämatopoese (Maurin et al. 2000, Wang und Wagers 2011).

Adipositas wirkt sich zudem negativ auf die Gelenkknorpel, besonders im Kniegelenk, auf und führt somit vermehrt zu arthrotischen Veränderungen (Sridhar et al. 2012). Frauen in der Postmenopause sind verstärkt von Arthrose betroffen (Sniekers et al. 2010). Ob der Knorpel arthrotisch wird, weil er direkt durch den Östrogenmangel, indirekt durch die Verminderung des subchondralen Knochens oder aufgrund des vermehrt auftretenden Übergewichts betroffen ist, ist nicht eindeutig geklärt.

Die Hämatopoese durch HSZ, die in sogenannten Knochenmarksnischen lokalisiert sind, ist in besonderer Weise von ihrem Mikroumfeld abhängig. Studien sprechen dafür, dass Osteoblasten eine fördernde und Adipozyten eine hemmende Rolle in der Regulierung der hämatopoetischen Aktivität spielen (Wang und Wagers 2011). Es scheint eine positive Korrelation zwischen BMD und Anzahl der peripheren Blutzellen zu existieren (Kim et al. 2011).

Nach der Menopause und im fortschreitenden Alter sind Frauen in besonderer Weise von dem Rückgang an hämatopoetischer Aktivität, Knochen-, Gelenkknorpel- und Muskelmasse, sowie einer Zunahme von Körpergewicht und Fettgewebe betroffen. Die Zusammenhänge der einzelnen Gewebe sind komplex und angesichts der vielen offenen Fragen ist eine kausale Aufschlüsselung der postmenopausalen, multifaktoriellen Veränderungen immer noch unvollständig.

4.4 Schlussfolgerungen

Mit der vorliegenden Studie wurde der Versuch unternommen, Erkenntnisse über Auswirkungen einer Langzeiteinnahme von β -Ecdyson auf Knochen, Knorpel, Markfett und rotes Knochenmark zu gewinnen. Von besonderem Interesse waren hierbei potenzielle Wirkungen bei ovx Ratten, da sie bei Östrogenmangel vergleichbare ossäre Veränderungen durchmachen wie postmenopausale Frauen, die besonders vom Krankheitsbild der Osteoporose betroffen sind.

Die Ovx und der daraus resultierende Östrogenmangel zeigten in dieser Studie im Wesentlichen die aus der Fachliteratur bereits bekannten Wirkungen auf die Knochenhistomorphologie. So war die Spongiosa der ovx Tiere im Vergleich zu int Tieren deutlich reduziert. Sowohl beim Trabekelflächenanteil im endostealen Raum als auch bei der Trabekelkonnektivität waren die ovx den int Tieren eindeutig unterlegen. Die Auswirkungen der Ovx auf die Kortikalis waren erwartungsgemäß weniger ausgeprägt. Bei der Betrachtung des Gelenkknorpels zeigte sich innerhalb der Kontrollfutter-Tiere, dass Ovx zu einer deutlichen Dickenabnahme des Gelenkknorpels führt. Dies entspricht der Tendenz in der Fachliteratur von einer chondroprotektiven Wirkungsweise der Östrogene auszugehen. Weiterhin führte Ovx erwartungsgemäß zu einer deutlichen Markfett-Zunahme der

betroffenen Tiere. Bei Messung des Flächenanteils von rotem Knochenmark gab es zwischen int und ovx Tieren keinen signifikanten Unterschied. Ein direkter Einfluss von Östrogenen auf hämatopoetische Stammzellen ist unzureichend erforscht.

Bei der Betrachtung der Epiphysenfuge konnte der zu erwartende Effekt von der Dickenzunahme der Fuge bei Östrogenmangel nicht festgestellt werden. Als mögliche Ursache wurde hierfür das zu hohe Alter der Tiere angeführt.

Die chondro-osteo-protektiven Effekte von β -Ecdyson blieben im Vergleich zu den Kurzzeitversuchen insgesamt hinter den Erwartungen zurück.

Im Bereich des Knochens konnte festgestellt werden, dass die β -Ecdyson Gabe bei int Tieren einen signifikanten Vorteil in Bezug auf den Trabekelanteil im endostealen Raum erbringt. Bei ovx Tieren konnte dieser Effekt im Gegensatz zu den Kurzzeitversuchen nicht dokumentiert werden. Dem entsprechend wurde bei der Kortikalismessung gezeigt, dass nur die int, Ecd Tiere eine signifikant dünnere Kortikalisschicht aufwiesen. Dies entspricht dem Wissen, dass die Kortikalis auf einen Verlust an endostealem Spongiosaknochen mit einer periostealen Apposition von Knochengewebe im Sinne eines Kompensationsmechanismus reagiert. Die int, Ecd Ratten verfügten über den größten Anteil an Trabekeln im endostealen Raum.

Bei der Betrachtung des Gelenkknorpels zeigte sich, dass die ovx Tiere von der β -Ecdysongabe signifikant profitierten. Allerdings war dies innerhalb der int Gruppen nicht der Fall. Aufgefallen war bei der histomorphometrischen Auswertung, dass die int, Ecd Tiere vermehrte Anzeichen einer Gelenkknorpelschädigung aufwiesen. Die Ergebnisse sind daher unter Vorbehalt zu bewerten. Auch die Messungen zur Epiphysenfuge zeigten keine eindeutigen Effekte, die auf eine chondro-protective oder –anabole Wirkung des β -Ecdyson schließen lassen.

Die Messung zur Bestimmung des Markfettanteils zeigte keine Auswirkungen der β -Ecdyson Applikation. Der im Kurzversuch gezeigte Effekt der Reduzierung des Markfetts war nicht reproduzierbar und scheint bei fortgeschrittenem Alter der Tiere nicht mehr zu greifen.

Die Messung des roten Knochenmarkanteils ergab, dass der Anteil nur bei den ovx, Ecd Tieren signifikant geringer war. Bei Vergleich mit den Ergebnissen des Kurzversuches fiel allerdings auf, dass auch die int, sf und int, Ecd-Gruppen massive Verluste von rotem Knochenmark erlitten haben und zum Zeitpunkt des Versuchsendes auf das Niveau der ovx,

sf Tiere gefallen waren. β -Ecdyson führt demnach zu der im Kurzzeitversuch nachgewiesenen Steigerung von roten Knochenmarksanteilen, kann aber im Langzeitversuch die Verminderung des roten Knochenmarks nicht verhindern. Im Gegenteil scheint die β -Ecdyson-Fütterung nachteilig für alte, ovx Tiere zu sein.

Bei der Bewertung der Trabekelkonnektivität nach der Methode von Dalle Carbonare et al. (2005) und Garrahan et al. (1986) zeigte β -Ecdyson keine signifikanten Vorteile, auch wenn die ovx, Ecd Tiere eine tendenzielle Erhöhung der Trabekelverbindungspunkte im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen. Ansonsten zeigten die Messungen zu Anzahl der freien Enden, Verbindungs- und Knotenpunkten sowie der Index Knoten/freie Enden keinen Einfluss durch die orale β -Ecdyson-Applikation.

Bei unbekanntem biochemischen Wirkmechanismus schien die Datenlage für eine generell anabole Potenz von β -Ecdyson zu sprechen. Die vorteilhaften Eigenschaften von β -Ecdyson waren vor dieser Studie nur in Kurzzeitversuchen demonstriert worden. Es lässt sich insgesamt feststellen, dass chondro-osteo-protective bzw. anabole Effekte von β -Ecdyson im Langzeitversuch und bei diesem Studiendesign nur noch tendenziell vorhanden waren. Eine denkbare Ursache ist, dass die Substanz β -Ecdyson langfristig nicht die Potenzen besitzt, osteoporotische Prozesse einzuschränken und somit zukünftig nicht als alleinige Behandlungsoption für die postmenopausale Frau in Betracht kommt. Vielmehr gab es Hinweise, dass int Tiere von der β -Ecdyson-Gabe profitierten.

Bei diesem Studiendesign war die relative und absolute Dauer der Östrogenmangelsituation für das Leben einer Ratte enorm hoch: Gemessen an ihrer Lebenserwartung entspricht ein einjähriger Östrogenmangel bei Ratten etwa 40 Jahren Postmenopause bei Frauen. Möglicherweise wurde die Versuchsdauer als zu lang gewählt und die β -Ecdyson-Gabe konnte trotz vorhandener Potenzen den Östrogenmangel sowie die alterungstypischen Veränderungen nicht mehr ausgleichen. Bis auf die Verminderung des Knochenmarks bei ovx Tieren, die als hämatopoetische Erschöpfung nach Stimulation interpretiert wurde, führte β -Ecdyson-Gabe nicht zu Nachteilen für die behandelten Tiere.

Aus der Zusammenschau der Ergebnisse von Kurzzeitversuchen und dieser Langzeitstudie scheint die therapeutische Bedeutung von β -Ecdyson insgesamt eher im prophylaktischen oder supportiven Anwendungsbereich zu liegen.

5. Zusammenfassung

Diese Studie wurde vorgenommen, um die Auswirkungen einer einjährigen oralen β -Ecdyson-Einnahme auf Knochen- und Knorpelgewebe sowie Knochenmark und Markfett zu untersuchen. Andere Studien hatten in Kurzzeitversuchen gezeigt, dass β -Ecdyson über osteo- und chondroprotektive bzw. -stimulierende Potenzen verfügt. Durch histomorphometrische Messungen wurde untersucht, ob diese Effekte des Ecdysteroids auch im Langzeitversuch bestätigt werden können.

Mit dem Ende der ovariellen Östrogenproduktion beginnt für die postmenopausale Frau ein Prozess des fortschreitenden Knochenverlusts bis hin zur Osteoporose. Dabei handelt es sich um eine systemische Skeletterkrankung, die durch verminderte Knochenmasse, Störung der Mikroarchitektur und erhöhtes Frakturrisiko gekennzeichnet ist. Da die Östrogensubstitution mit Risiken verbunden ist, besteht der Bedarf an anderen Therapieoptionen. In der Forschung stellt die Ratte längst ein etabliertes Modell zur Abbildung ossärer Verhältnisse in der postmenopausalen Frau dar. Sowohl Frauen als auch Ratten reagieren in ähnlicher Weise auf eine Östrogenmangelsituation.

Für die Studie wurden 20 Sprague-Dawley-Ratten randomisiert in vier Gruppen mit jeweils fünf Tieren eingeteilt. Die Testsubstanz β -Ecdyson wurde per os in einer Dosierung von 3g/kg Futter appliziert. Insgesamt ergaben sich folgende Gruppen:

-ovx, sf

-int, sf

-ovx, Ecd

-int, Ecd.

Das Experiment begann bei einem Alter der Ratten von 3 Monaten und endete mit 15 Monaten. Während der Versuchsdauer wurden regelmäßig pQCT- und Gewichtsmessungen sowie für bestimmte Zeitintervalle die Berechnung der Futterraufnahme der einzelnen Gruppen durchgeführt. Nach Ablauf des Experiments wurden histologische Präparate der Tibiaknochen angefertigt. Die tibiale Metaphyse wurde als Lokalisation der Messungen gewählt, da sie besonders sensitiv auf einen Östrogenmangel reagiert. Die anschließende histomorphometrische Untersuchung umfasste folgende Parameter: die Dicke des Gelenkknorpels, der einzelnen Epiphysenfugenzonen, sowie der Kortikalis im Bereich der Metaphyse. Des Weiteren wurde der relative Flächenanteil von Trabekeln, Markfett und rotem Knochenmark in der Metaphyse gemessen. Zudem wurde eine

Trabekelstrukturanalyse in der Metaphyse vorgenommen. Aus den gemessenen Epiphysenfugen zonen wurde die Gesamtdicke der Epiphysenfuge berechnet.

Die Ovx und der damit einhergehende Östrogenmangel bewirkten die zu erwartenden gravierenden Verluste im Bereich der metaphysären Spongiosa der Tibia. Hier waren sowohl der trabekuläre Flächenanteil als auch die inter-trabekuläre Konnektivität gegenüber den int Tieren vermindert. Die metaphysäre Kortikalis war erwartungsgemäß weniger vom Östrogenmangel betroffen. Die Ovx zeigte keine eindeutigen Auswirkungen auf die Epiphysenfuge. Die Ergebnisse zu den einzelnen Zonen waren heterogen. Die Ratten waren mit 15 Monaten und inaktiver Epiphysenfuge aller Wahrscheinlichkeit nach zu alt.

Bei der Betrachtung der Gelenkknorpeldicke zeigte sich, dass beide int Gruppen im Vergleich zur ovx Kontrollgruppe über einen dickeren Knorpel verfügten. Die Ovx führte des Weiteren zu einer erwartungsgemäß massiven Zunahme des metaphysären Markfetts. In Bezug auf das metaphysäre Knochenmark gab es keine Unterschiede zwischen int und ovx Tieren. Durch Vergleich mit den Kurzversuchen fiel auf, dass ovx Tiere dem Anschein nach auf demselben Level an Knochenmarkmenge verbleiben, während int Ratten im Alter auf das Niveau der ovx Tiere abfallen.

Die Testsubstanz β -Ecdyson zeigte nur innerhalb der int Tiere einen signifikant höheren Anteil an Trabekeln im endostealen Raum. Dies wird indirekt durch das Ergebnis der signifikant dünneren Kortikalis bei den int, Ecd-Tieren bestätigt, da hier die Kortikalis nicht in dem Maße wie bei den anderen Gruppen den Spongiosaverlust mit periostealer Apposition kompensieren musste. Die Untersuchung zur Konnektivität der Trabekel zeigte keine Wirkungen durch die Testsubstanz. Nur bei einer Messung wurde ein tendenzieller Vorteil dokumentiert. Bei der Betrachtung der Epiphysenfuge zeigte β -Ecdyson keine eindeutige Auswirkung auf die Dicke dieser. Der Gelenkknorpel war innerhalb der ovx Tiere durch β -Ecdysongabe signifikant dicker. Innerhalb der int Tiere konnte dieser Effekt allerdings nicht gezeigt werden, weshalb nicht von einer generell chondroprotektiven Wirkung des Ecdyson ausgegangen werden kann.

β -Ecdyson zeigte keine Auswirkungen auf den Anteil des Markfetts in der Metaphyse. Der Anteil an rotem Knochenmark wurde durch β -Ecdyson Gabe bei alten ovx Tieren vermindert. Die anderen Messungen zeigen keine Nachteile durch β -Ecdyson. Die aus Kurzversuchen

bekannten osteo-chondro- protektiven Eigenschaften der Testsubstanz β -Ecdyson konnten im Langzeitversuch nur teilweise reproduziert werden.

Somit scheint die Testsubstanz β -Ecdyson nach den Ergebnissen dieser Studie, trotz erwiesener Potenzen in den Kurzzeitversuchen, nicht geeignet, langfristig osteoporotische Prozesse der postmenopausalen Frau zu verhindern. Bei manifester Osteoporose wäre das Phytoecdysteroid somit keine alleinige Therapieoption. Möglicherweise liegt der Einsatzbereich der Testsubstanz eher im prophylaktischen und supportiven Anwendungsbereich, da nach dieser Studie eher int Tiere von einer β -Ecdyson-Gabe profitierten.

6. Anhang

Tabelle 1: Effekte von β -Ecdyson bei Säugetieren		
<u>Effekt von β-Ecdyson</u>	<u>Untersuchte Gruppe</u>	<u>Quelle</u>
Gesteigerte Proteinsynthese in Mäuselebern	Mäuse, intraperitoneale Injektion	Otaka et al. 1968, Okui et al. 1968
Protektive bzw. stimulierende Effekte auf Knorpelgewebe (Epiphysenfuge und Gelenkknorpel)	Ratten, p.o.	Kapur et al. 2010
Steigerung der Proteinsynthese in Skelettmuskelzellen	<i>in vitro</i> : Muskelzellen von Mäusen und Menschen	Gorelick-Feldmann et al. 2008
Größenzunahme der Muskelfasern	Ratten	Tóth et al. 2008
Beschleunigter Heilungsprozess bei Frakturen	Ratten, p.o.	Lafont und Dinan 2003
Förderung der Proliferation von Osteoblasten ähnlichen Zellen	<i>in vitro</i> : UMR 106 Zellen	Gao et al. 2000
Stimulation der osteogenen Differenzierung aus mesenchymalen Stammzellen	mesenchymale Stammzellen der Maus, <i>in vitro</i>	Gao et al. 2008 Wu et al. 2010
Hepatoprotektive Effekte bei induzierter Hepatitis	Ratten, p.o./Magensonde	Syrov et al. 1992
Förderung der Wirkung des Chemotherapeutikums Cisplatin	Mäuse	Konovalova et al. 2002
hypoazotämischer Effekt (Senkung stickstoffhaltiger Stoffwechselprodukte im Blut)	Ratten, p.o./Magensonde	Saatov et al. 1999
Aktivierung der CD2-Präsentation bei T-Zellen	<i>in vitro</i> : humane T-Zellen	Trenin und Volodin 1999
Neuromodulatorische Effekte am GABA-Rezeptor	<i>in vitro</i> : kortikale Rattenneurone	Tsujiyama et al. 1995

Reduktion des hepatischen Cholesterin-Levels	Ratten, intraperitoneale Injektion	Lupien et al. 1969
Senkung von Körpergewicht, Körperfett und Hyperglykämie bei übergewichtigen Mäusen	Mäuse, p.o.	Kizelsztein et al. 2009
Vermehrte Trabekeldichte, Abnahme der Knochenresorptionsparameter	Ratten, p.o.	Seidlová-Wuttke et al. 2010 a
Abnahme des intraabdominellen und prätibialen Fetts, erhöhter Muskelindex	Ratten, p.o.	Seidlová-Wuttke et al. 2010 b

Tabelle 4: Vorbehandlung des Gewebes

Fixation

Die Fixierung des Gewebes erfolgt für 36 h in 4% neutraler gepufferter Formalinlösung (0,1 M Phosphat- oder 0,02 M Phosphatpuffer).

Dehydratation

Die Dehydratation erfolgt in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei Raumtemperatur. Im mangelhaft entwässerten Gewebe entstehen sog. Lunkerstellen, die aus weißem Perlpolymerisat bestehen und das Schneiden sowie die Schnittqualität negativ beeinträchtigen.

Stufe	Lösung	Konzentration	Zeit
Entwässerung 1	Ethanol	70%	24 h
Entwässerung 2	Ethanol	80%	24 h
Entwässerung 3	Ethanol	96%	24 h
Entwässerung 4	Ethanol	96%	24 h
Entwässerung 5	Ethanol	abs.	24 h
Entwässerung 6	Ethanol	abs.	24 h
Entwässerung 7	Ethanol	abs.	24 h

Intermedium

Als Intermedium wird Xylol eingesetzt.

Lösung	Zeit
Intermedium 1 Xylol	24 h
Intermedium 2 Xylol	24 h

Immersion (Präinfiltration 1 - 3, Infiltration)

Die Immersion (Präinfiltration 1 - 3, Infiltration) erfolgt in 3 Stufen. Die angegebenen Zeiten beziehen sich auf Rattentibiae.

Stufe	Lösung	Zeit
Präinfiltration 1	Xylol/Technovit 9100 NEU (Basislg. Stab.) 50%/50%	24 h
Präinfiltration 2	Basis (entstab.), (Kühlschrank)	24h
Präinfiltration 3	Technovit 9100 NEU (entstab.) + Härter 1 (Kühlschrank)	24h
Infiltration	Technovit 9100 NEU, Basis (entstab.) + Härter 1+ PMMA-Pulver,	2-3 d

	(Kühlschrank),	
Um die Entwässerung bzw. Infiltration zu verbessern, ist nach jedem Schritt eine Vakuumbehandlung (im Exikkator mit Wasserstrahlpumpe) sinnvoll.		

Tabelle 5: Herstellung der Färbelösungen

Weigerts Hämatoxylin-Lösung	Verdünnen von Weigerts Eisenhämatoxylin-Set (Sigma-Aldrich®, HT 1079-1 Set) mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:1
Ponceau de Xylidine-Lösung	2g Ponceau de Xylidine (Merck: 1.15927) + 1g Säurefuchsin (Merck: 1.05231) + 0,4ml 1%ige Essigsäure + 200ml destilliertes Wasser
Wolframatophosphorsäure-Lösung	2 g Wolframatophosphorsäure (Merck: 583) + 1g Orange G (Sigma: 0-7252) + 200ml destilliertes Wasser
Lichtgrün-Lösung	0,4g Lichtgrün (Merck: 1.15941) + 0,4ml Essigsäure + 200ml destilliertes Wasser

**Effekt von Ecd (12 Monate per Futter bei intakter Ratte) auf:
Dichte der Trabekul im intraosealem Bereich der Metaphyse der Tibia
qCT,SLC 1+2**

* p<0,05 vs preovx

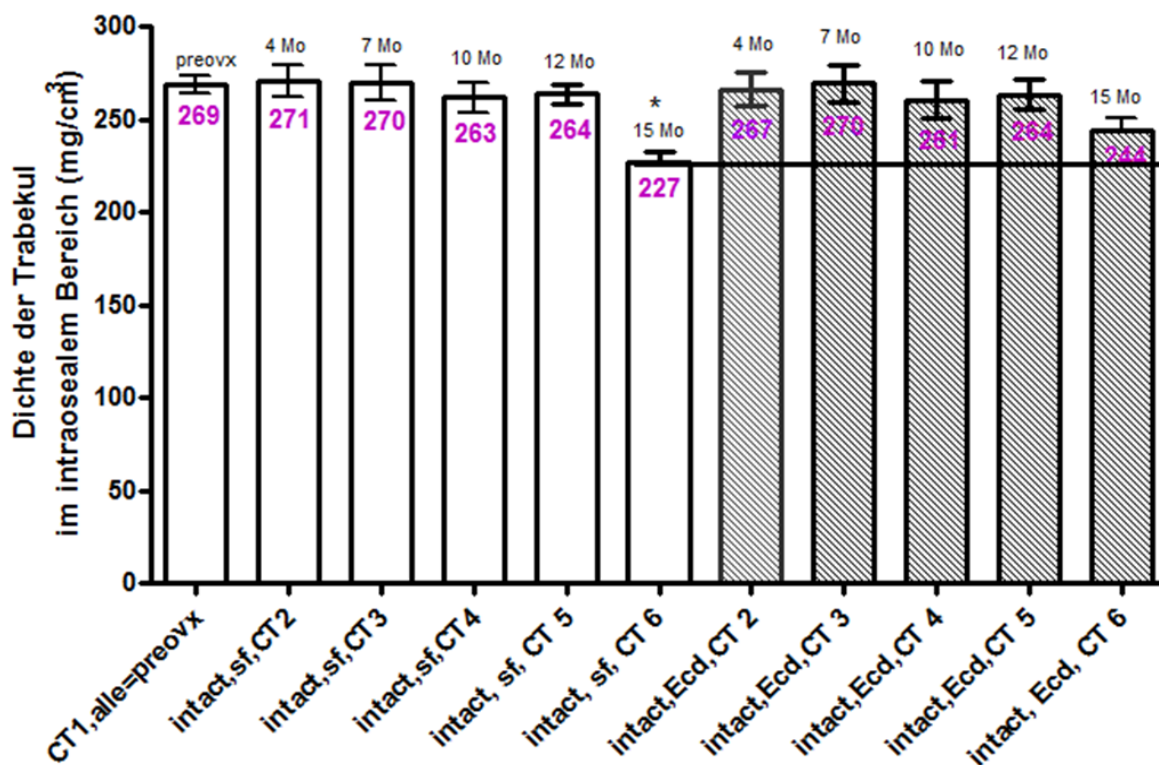


Abbildung 26: Dichte der Trabekel im endostealen Raum der Metaphyse der proximalen Tibia (mg/cm^3). Signifikanter Abfall der Trabekeldichte bei int, sf Tieren im Alter von 15 Monaten. Int, Ecd Tiere zeigten keine signifikante Verminderung der Trabekeldichte. Die Daten wurden von Priv.-Doz. Dr. med. D. Seidlová-Wuttke zur Verfügung gestellt.

Effekt von Ecd (12 Monate p.o. in ovx Ratten) auf die Dichte der Trabekel im endostealen Raum der Metaphyse der proximalen Tibia (pQCT)

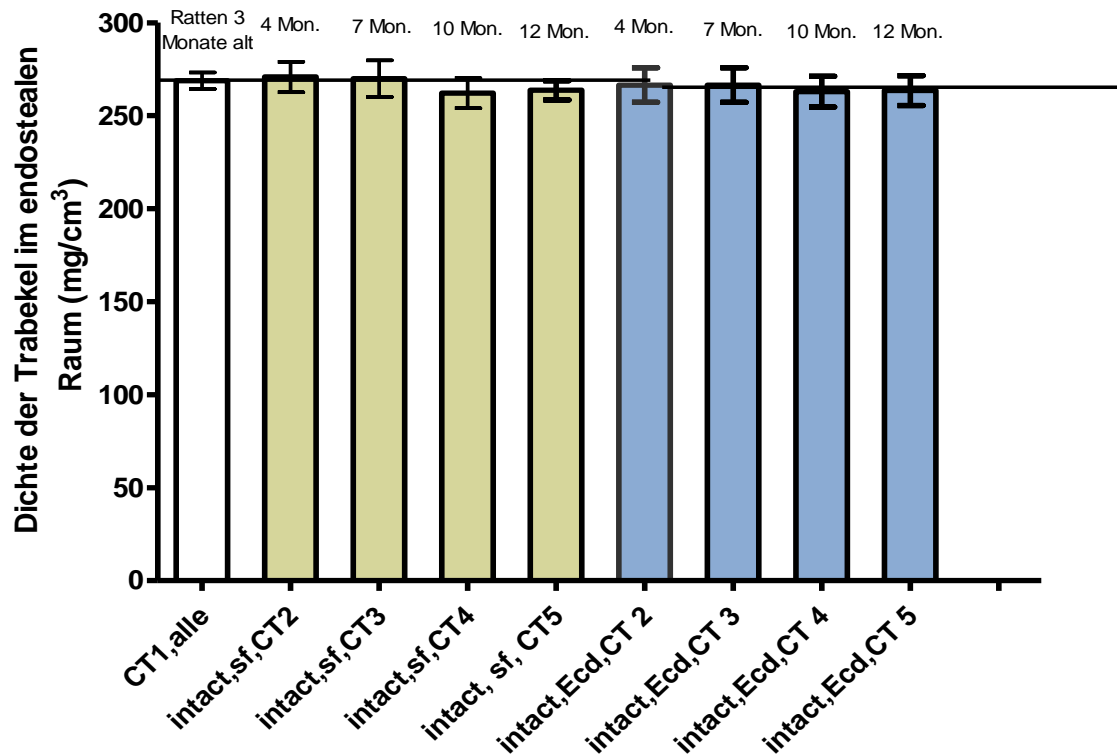


Abbildung 27: Dichte der Trabekel im endostealen Raum der Metaphyse der proximalen Tibia (in mg/cm³). Initial rapider Abfall der Trabekeldichte im endostealen Raum nach Ovx. Vier Monate nach Ovx wird ein Plateau erreicht und bis Ende der Messungen gehalten. Signifikanter Vorteil durch β -Ecdyson vier Monate nach Ovx. Die Daten wurden von Priv.-Doz. Dr. med. D. Seidlová-Wuttke zur Verfügung gestellt.

Beschreibung

Mit diesem Alleinfuttermittel wird der erhöhte Energie- und Proteinbedarf für die hohe Leistung von Ratten während Reproduktion und Wachstum optimal gedeckt. Aus dem Verzicht auf Soja- und Luzernenprodukten resultieren sehr niedrige Konzentrationen an den Phytoestrogenen Genistein, Daidzein und Coumestrol. Die Diät ist daher besonders gut geeignet für Studien, in denen der Effekt von Oestrogenen, Oestrogen ähnlichen Substanzen oder anderer Sexualhormone überprüft werden soll.

Energie	[MJ/kg]
Bruttoenergie (GE)	16,8
Umsetzbare Energie (ME) *	13,3



Futterzusammensetzung

absteigende Reihenfolge der Gruppen (FMV)

Getreide und Getreidenebenerzeugnisse, Knollenprodukte, pflanzliche Fette, Mineralstoffe, Vitamine, Spurenelemente.

Abbildung 28: Futterangaben zu ssniff® V1354 R-Z Phytoestrogenarm- Alleinfuttermittel für die Zucht von Ratten, sojafrei. Quelle: ssniff® online Katalog 2007

URL: http://www.ssniff.de/documents/03a_katalog_dt_phytoestrogen.pdf (Stand 12/2011)

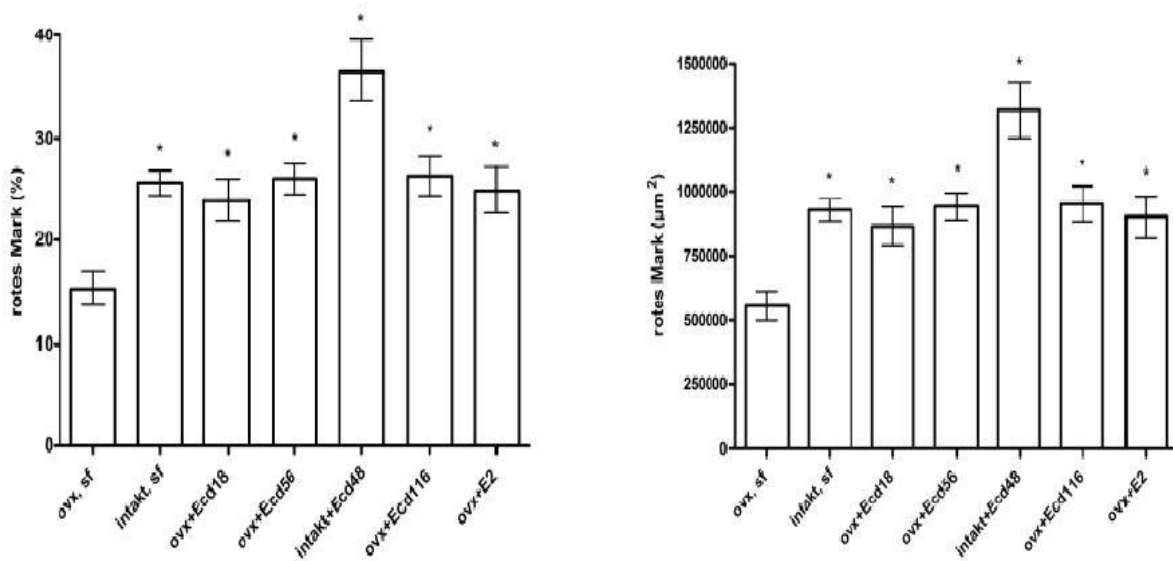


Abbildung 29: Effekt von Ecdyson und E2 (3 Monate per Futter bei ovx Ratten) auf das rote Mark in der proximalen Metaphyse der Tibia.

Entnommen aus: Walliser K: Wirkungen des Ecdysteroids Ecdyson an der Tibia weiblicher ovariectomierter Ratten. Med. Diss. Göttingen 2009

7. Literaturverzeichnis

Akhter MP, Lappe JM, Davies KM, Recker RR (2007): Transmenopausal changes in the trabecular bone structure. *Bone* 41, 111-116

Bagi CM, Miller SC (1994): Comparison of osteopenic changes in cancellous bone induced by ovariectomy and/or immobilization in adult rats. *Anat Rec* 239, 243-54.

Báthori M, Tóth N, Hunyadi A, Márki A, Zádor E (2008): Phytoecdysteroids and anabolic-androgenic steroids--structure and effects on humans. *Curr Med Chem* 15, 75-91 (Abstract)

Becker DJ, Kilgore ML, Morrisey MA (2010): The societal burden of osteoporosis. *Curr Rheumatol Rep* 12, 186-191

Benayahu D, Shur I, Ben-Eliyahu S (2000): Hormonal changes affect the bone and bone marrow cells in a rat model. *J Cell Biochem* 79, 407-415

Borah B, Dufresne TE, Chmielewski PA, Gross GJ, Prenger MC, Phipps RJ (2002): Risedronate Preserves Trabecular Architecture and Increases Bone Strength in Vertebra of Ovariectomized Minipigs as Measured by Three-Dimensional Microcomputed Tomography. *J Bone Miner Res* 17, 1139-1147

Burdan F, Szumilo J, Korobowicz A, Farooquee R, Patel S, Patel A, Dave A, Szumilo M, Solecki M, Klepacz R, Dudka J (2009): Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochem Cytobiol* 47, 5-16

Campbell NA, Reece JB: *Biologie*. 6. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2003

Cao JJ (2011): Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res* 15, 6-30

Carlsten H (2005): Immune responses and bone loss: the estrogen connection. *Immunol Rev* 208, 194-206

Chagin AS, Sävendahl L (2007): Oestrogen receptors and linear bone growth. *Acta Paediatr* 96, 1275-1279

Chappard D, Retailleau-Gaborit N, Legrand E, Baslé MF, Audran M (2005): Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT. *J Bone Miner Res* 20, 1177-1184

- Chermnykh NS, Shimanovskii NL, Shutko GV, Syrov VN (1988): The action of methandrostenolone and ecdysterone on the physical endurance of animals and on protein metabolism in the skeletal muscles. *Farmakol Toksikol* 51, 57-60 (Abstract)
- Chrysis D, Nilsson O, Ritzen EM, Sävendahl L (2002): Apoptosis is developmentally regulated in rat growth plate. *Endocrine* 18, 271-278
- Consensus Development Conference (1993): Diagnosis, Prophylaxis, and Treatment of Osteoporosis. *Am J Med* 94, 646-650 [ohne Autorenangabe]
- Coors NC: Analyse des Effekts von β -Ecdyson auf die histologische Struktur der proximalen Tibia von gonadektomierten Sprague-Dawley-Ratten. Med. Diss. Göttingen 2010
- Dalle Carbonare L, Giannini S (2004): Bone microarchitecture as an important determinant of bone strength. *J Endocrinol Invest* 27, 99-105
- Dalle Carbonare L, Valenti MT, Bertoldo F, Zanatta M, Zenari S, Realdi G, Lo Cascio V, Giannini S (2005): Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. *Micron* 36, 609-616
- Dempster DW (2003): Bone microarchitecture and strength. *Osteoporos Int* 14, 54-56
- Devlin MJ, Cloutier AM, Thomas NA, Panus DA, Lotinun S, Pinz I, Baron R, Rosen CJ, Bouxsein ML (2010): Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *J Bone Miner Res* 25, 2078-88
- Dinan L (2001): Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry* 57, 325-339
- Dinan L (2009): The Karlson Lecture. Phytoecdysteroids: what use are they? *Arch Insect Biochem Physiol* 72, 126-141
- Dinan L, Lafont R (2006): Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. *J Endocrinol* 191, 1-8
- Ding C, Cicuttini F, Scott F, Cooley H, Jones G (2005): Association between age and knee structural change: a cross sectional MRI based study. *Ann Rheum Dis* 64, 549-555
- Duque G (2008): Bone and fat connection in aging bone. *Curr Opin Rheumatol* 20, 429-34
- DVO e.V. (2009): DVO Leitlinie 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen, URL: http://www.dv-osteologie.org/uploads/leitlinien/DVO-Leitlinie_2009_Langfassung_Druck.pdf (Stand: 04/2012)

Elbaz A, Rivas D, Duque G (2009): Effect of estrogens on bone marrow adipogenesis and Sirt1 in aging C57BL/6J mice. *Biogerontology* 10, 747-55

Fardellone P (2008): Predicting the fracture risk in 2008. *Joint Bone Spine* 75, 661-664

Felson DT, Nevitt MC (1998): The effects of estrogen on osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 10, 269-272

Gabet Y, Bab I (2011): Microarchitectural changes in the aging skeleton. *Curr Osteoporos Rep* 9, 177-183

Gao L, Cai G, Shi X (2008): β -Ecdysterone Induces Osteogenic Differentiation in Mouse Mesenchymal Stem Cells and Relieves Osteoporosis. *Biol Pharm Bull* 31, 2245-2249

Gao Z, Wang D, Li F (2000): Determination of ecdysterone in *Achyranthes bidentata* BL. and its activity promoting proliferation of osteoblast-like cells. *Acta Pharmaceutica Sinica* 35, 868-870 (Abstract)

Garrahan NJ, Mellish RW, Compston JE (1986): A new method for the two-dimensional analysis of bone structure in human iliac crest biopsies. *J Microsc* 142, 341-349

Gasparrini M, Rivas D, Elbaz A, Duque G (2009): Differential expression of cytokines in subcutaneous and marrow fat of aging C57BL/6J mice. *Exp Gerontol* 44, 613-618

Genant HK, Cann CE, Ettinger B, Gordan GS (2006): The Classic: Quantitative computed tomography of vertebral spongiosa: a sensitive method for detecting early bone loss after oophorectomy. 1982. *Clin Orthop Relat Res* 443, 14-18

Gómez-Cabello A, Ara I, González-Agüero A, Casajús JA, Vicente-Rodríguez G (2012): Effects of training on bone mass in older adults: a systematic review. *Sports Med* 42, 301-325

Gorelick-Feldman J, Maclean D, Ilic N, Poulev A, Lila MA, Cheng D, Raskin I (2008): Phytoecdysteroids increase protein synthesis in skeletal muscle cells. *J Agric Food Chem* 56, 3532-3537

Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless Th, Schmidt T, Steinle Th, Verheyen F, Linder R (2013): The epidemiology of osteoporosis—Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. *Dtsch Arztebl Int* 110, 52–57

Hamrick MW, Ding KH, Pennington C, Chao YJ, Wu YD, Howard B, Immel D, Borlongan C, McNeil PL, Bollag WB, Curl WW, Yu J, Isales CM (2006): Age-related loss of muscle mass and

bone strength in mice is associated with a decline in physical activity and serum leptin. *Bone* 39, 845-853

Hamrick MW, Ding KH, Ponnala S, Ferrari SL, Isaacs CM (2008): Caloric restriction decreases cortical bone mass but spares trabecular bone in the mouse skeleton: implications for the regulation of bone mass by body weight. *J Bone Miner Res* 23, 870-878

Høegh-Andersen P, Tankó LB, Andersen TL, Lundberg CV, Mo JA, Heegaard AM, Delaissé JM, Christgau S (2004): Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application. *Arthritis Res Ther* 6, 169-80

Horton JA, Bariteau JT, Loomis RM, Strauss JA, Damron TA (2008): Ontogeny of skeletal maturation in the juvenile rat. *Anat Rec* 291, 283-292

Illing A, Liu P, Ostermay S, Schilling A, de Haan G, Krust A, Amling M, Chambon P, Schinke T, Tuckermann JP (2012): Estradiol increases hematopoietic stem and progenitor cells independent of its actions on bone. *Haematologica* 97, 1131-1135

Janssen I, Powell LH, Crawford S, Lasley B, Sutton-Tyrrell K (2008): Menopause and the metabolic syndrome: the Study of Women's Health Across the Nation. *Arch Intern Med* 168, 1568-1575

Jee WS (2000): Principles in bone physiology. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1, 11-13

Jee WSS, Yao W (2001): Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuron Interact* 1, 193-207

Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15, 175-191

Kanis JA (1994): Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis: Synopsis of a WHO Report. WHO Study Group. *Osteoporos Int* 4, 368-381

Kapur P, Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D (2010): Beneficial effects of beta-Ecdysone on the joint, epiphyseal cartilage tissue and trabecular bone in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17, 350-355

Karolson P (1996): On the hormonal control of insect metamorphosis. A historical review. *Int J Dev Biol* 40, 93-96

Keller C, Larkey L, Distefano JK, Boehm-Smith E, Records K, Robillard A, Veres S, Al-Zadjali M, O'Brian AM (2010): Perimenopausal obesity. *J Womens Health* 19, 987-96

Khosla S (2010): Update on estrogens and the skeleton. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 3569-3577

Kim HL, Cho HY, Park IY, Choi JM, Kim M, Jang HJ, Hwang SM (2011): The positive association between peripheral blood cell counts and bone mineral density in postmenopausal women. *Yonsei Med J* 52, 739-745

Kizelsztejn P, Govorko D, Komarnytsky S, Evans A, Wang Z, Cefalu WT, Raskin I (2009): 20-Hydroxyecdysone decreases weight and hyperglycemia in a diet-induced obesity mice model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E433–E439

Konovalova NP, Mitrokhin YI, Volkova LM, Sidorenko LI, Todorov IN (2002): Ecdysterone Modulates Antitumor Activity of Cytostatics and Biosynthesis of Macromolecules in Tumor-Bearing Mice. *Biol Bull* 29, 530-536 (Abstract)

Kulak CA, Dempster DW (2010): Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 54, 87-98

Lafont R, Dinan L (2003): Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J Insect Sci* 3, 1-30

Lane NE (2006): Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol* 194, 3-11

Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA (2008): The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 58, 424-430

Lovejoy JC, Champagne CM, de Jonge L, Xie H, Smith SR (2008): Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. *Int J Obes (Lond)* 32, 949-958

Lüllmann-Rauch R: Taschenlehrbuch Histologie. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006

Lupien PJ, Hinse C, Chaudhary KD (1969): Ecdysone as a hypocholesterolemic agent. *Arch Int Physiol Biochim* 77, 206-212

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995): The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839

Marcu F, Bogdan F, Muțiu G, Lazăr L (2011): The histopathological study of osteoporosis. *Rom J Morphol Embryol* 52, 321-325

Maurin AC, Chavassieux PM, Frappart L, Delmas PD, Serre CM, Meunier PJ (2000): Influence of mature adipocytes on osteoblast proliferation in human primary cocultures. *Bone* 26, 485-489

Melton SA, Hegsted M, Keenan MJ, Zhang Y, Morris S, Potter Bulot L, O'Neil CE, Morris GS (2000): Swimming eliminates the weight gain and abdominal fat associated with ovariectomy in the retired breeder rat despite high-fat diet selection. *Appetite* 35, 1-7

Miyagawa K, Kozai Y, Ito Y, Furuhashi T, Naruse K, Nonaka K, Nagai Y, Yamato H, Kashima I, Ohya K, Aoki K, Mikuni-Takagaki Y (2011): A novel underuse model shows that inactivity but not ovariectomy determines the deteriorated material properties and geometry of cortical bone in the tibia of adult rats. *J Bone Miner Metab* 29, 422-436

Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K (1995): Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 3689-98

Müller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, Rügsegger P (1998): Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 23, 59-66

NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy (2001): Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 285, 785-795

Nilsson S, Gustafsson JÅ (2011): Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther* 89, 44-55

Oehme I, Bösser S, Zörnig M (2006): Agonists of an ecdysone-inducible mammalian expression system inhibit Fas Ligand- and TRAIL-induced apoptosis in the human colon carcinoma cell line RKO. *Cell Death Differ* 13, 189-201

Okui S, Otaka T, Uchiyama M, Takemoto T, Hikino H, Ogawa S, Nishimoto N (1968): Stimulation of protein synthesis in mouse liver by insect-moulting steroids. *Chem Pharm Bull* 16, 384-387

- Ornoy A, Giron S, Aner R, Goldstein M, Boyan BD, Schwartz Z (1994): Gender dependent effects of testosterone and 17 beta-estradiol on bone growth and modelling in young mice. *Bone Miner* 24, 43-58
- Otaka T, Uchiyama M, Okui S, Takemoto T, Hikino H, Ogawa S, Nishimoto N (1968): Stimulatory effect of insect metamorphosing steroids from *Achyranthes* and *Cyathula* on protein synthesis in mouse liver. *Chem Pharm Bull* 16, 2426-2429
- Palli SR, Kapitskaya MZ, Potter DW (2005): The influence of heterodimer partner ultraspiracle/retinoid X receptor on the function of ecdysone receptor. *FEBS J* 272, 5979-5990
- Parfitt AM (1988): Bone histomorphometry: proposed system for standardization of nomenclature, symbols, and units. *Calcif Tissue Int* 42, 284-286
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987): Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2, 595-610
- Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC (2011): Osteoporosis: now and the future. *Lancet* 377, 1276-1287
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd (1998): A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 13, 763-773
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd (2002): Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 23, 279-302
- Roach HI, Mehta G, Oreffo RO, Clarke NM, Cooper C (2003): Temporal analysis of rat growth plates: cessation of growth with age despite presence of a physis. *J Histochem Cytochem* 51, 373-383
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288, 321-333
- Saatov Z, Agzamkhodzhaeva DA, Syrov VN (1999): Distribution of phytoecdysteroids in plants of Uzbekistan and the possibility of using drugs based on them in neurological practice. *Chem Nat Comp* 35, 186-191

Sadie-Van Gijsen H, Crowther NJ, Hough FS, Ferris WF (2012): The interrelationship between bone and fat: from cellular see-saw to endocrine reciprocity. *Cell Mol Life Sci*, Epub ahead of print. URL: <http://www.link.springer.com/journal/18>, Stand 05/2013

Schmelz EA, Grebenok RJ, Galbraith DW, Bowers WS (1998): Damage-Induced Accumulation of Phytoecdysteroids in Spinach: A Rapid Root Response Involving the Octadecanoic Acid Pathway. *J Chem Ecol* 24, 339-360

Schmelz EA, Grebenok RJ, Galbraith DW, Bowers WS (1999): Insect-induced synthesis of phytoecdysteroids in spinach, *Spinacia oleracea*. *J Chem Ecol* 25, 1739-1757

Schnatz PF, Marakovits KA, O'Sullivan DM (2010): Assessment of postmenopausal women and significant risk factors for osteoporosis. *Obstet Gynecol Surv* 65, 591-596

Seeman E (2002): Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet* 359, 1841-1850

Seidlová-Wuttke D, Christel D, Kapur P, Nguyen BT, Jarry H, Wuttke W (2010 a): Beta-ecdysone has bone protective but no estrogenic effects in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17, 884-889

Seidlová-Wuttke D, Ehrhardt C, Wuttke W (2010 b): Metabolic effects of 20-OH-Ecdysone in ovariectomized rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 119, 121-126

Shen W, Chen J, Punyanitya M, Shapses S, Heshka S, Heymsfield SB (2007): MRI-measured bone marrow adipose tissue is inversely related to DXA-measured bone mineral in Caucasian women. *Osteoporos Int* 18, 641-647

Shen Y, Nilsson SK (2012): Bone, microenvironment and hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 19, 250-255

Siris ES, Baim S, Nattiv A (2010): Primary care use of FRAX: absolute fracture risk assessment in postmenopausal women and older men. *Postgrad Med* 122, 82-90

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

Sniekers YH, Weinans H, Bierma-Zeinstra SM, van Leeuwen JP, van Osch GJ (2008): Animal models for osteoarthritis: the effect of ovariectomy and estrogen treatment - a systematic approach. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 533-541

Sniekers YH, Weinans H, van Osch GJ, van Leeuwen JP (2010): Oestrogen is important for maintenance of cartilage and subchondral bone in a murine model of knee osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 12, R182

Sridhar MS, Jarrett CD, Xerogeanes JW, Labib SA (2012): Obesity and symptomatic osteoarthritis of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 94, 433-440

Steinmark M: Die Wirkung von Tinospora cordifolia, 20-Hydroxyecdysone und STX im Vergleich zu 17 β -Östradiol in der Tibia ovariectomierter Sprague-Dawley-Ratten als mögliche Therapie der postmenopausalen Osteoporose der Frau. Med. Diss. Göttingen 2012

Stevenson JC, Hodis HN, Pickar JH, Lobo RA (2011): HRT and breast cancer risk: a realistic perspective. *Climacteric* 14, 633-636

Syed FA, Oursler MJ, Hefferanm TE, Peterson JM, Riggs BL, Khosla S (2008): Effects of estrogen therapy on bone marrow adipocytes in postmenopausal osteoporotic women. *Osteoporos Int* 19, 1323-1330

Syrov VN, Khushbaktova ZA, Nabiev AN (1992): An experimental study of the hepatoprotective properties of phytoecdysteroids and nerobol in carbon tetrachloride-induced liver lesion. *Eksp Klin Farmakol* 55, 61-65 (Abstract)

Syrov VN, Nasyrova SS, Khushbaktova ZA (1997): The results of experimental study of phytoecdysteroids as erythropoiesis stimulators in laboratory animals. *Eksp Klin Farmakol* 60, 41-44 (Abstract)

Tankó LB, Søndergaard BC, Oestergaard S, Karsdal MA, Christiansen C (2008): An update review of cellular mechanisms conferring the indirect and direct effects of estrogen on articular cartilage. *Climacteric* 11, 4-16

Tomaschko KH (1999): Nongenomic Effects of Ecdysteroids. *Arch Insect Biochem Physiol* 41, 89-98

Tóth N, Szabó A, Kacsala P, Héger J, Zádor E (2008): 20-Hydroxyecdysone increases fiber size in a muscle-specific fashion in rat. *Phytomedicine* 15, 691-698 (Abstract)

Trenin DS, Volodin VV (1999): 20-Hydroxyecdysone as a Human Lymphocyte and Neutrophil Modulator: In Vitro Evaluation. *Arch Insect Biochem Physiol* 41, 156-161

Trombetti A, Herrmann F, Hoffmeyer P, Schurch MA, Bonjour JP, Rizzoli R. (2002): Survival and potential years of life lost after hip fracture in men and age-matched women. *Osteoporos Int* 13, 731-737

Tsujiyama S, Ujihara H, Ishihara K, Sasa M (1995): Potentiation of GABA-Induced Inhibition by 20-Hydroxyecdysone, a Neurosteroid, in Cultured Rat Cortical Neurons. *Jpn J Pharmacol* 68, 133-136

Turner RT, Evans GL, Wakley GK (1994): Reduced chondroclast differentiation results in increased cancellous bone volume in estrogen-treated growing rats. *Endocrinology* 134, 461-466

Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Ohkubo I, Hukuda S (1999): Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 7, 560-566

Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L (2007): Increased mortality in patients with a hip fracture-effect of pre-morbid conditions and post-fracture complications. *Osteoporos Int* 18, 1583-1593

Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L (2009): Loss of life years after a hip fracture. *Acta Orthop* 80, 525-530

Villemure I, Stokes IA (2009): Growth plate mechanics and mechanobiology. A survey of present understanding. *J Biomech* 42, 1793-1803

Wade GN, Gray JM (1979): Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. *Physiol Behav* 22, 583-93

Walliser K: Wirkungen des Ecdysteroids Ecdyson an der Tibia weiblicher ovariectomierter Ratten. Med. Diss. Göttingen 2009

Wang LD, Wagers AJ (2011): Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 643-655

Welsch U: Lehrbuch Histologie. 1. Auflage; Urban & Fischer Verlag Elsevier GmbH, München 2003

Wilsman NJ, Farnum CE, Leiferman EM, Fry M, Barreto C (1996): Differential growth by growth plates as a function of multiple parameters of chondrocytic kinetics. *J Orthop Res* 14, 927-936

World Anti-Doping Agency (2013): The 2013 Prohibited List- International Standard, URL: www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/2013/WADA-Prohibited-List-2013-EN.pdf (Stand 03/2013)

Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M (1989): Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 45, 360-366

Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA (1986): Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 7, 119-123

Wu CH, Wu X, Fu XB, Zhao YF, Zhang YZ, Zhang ZL (2010): Effect of ecdysterone on the proliferation of human mesenchymal stem cells in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 30, 1180-1182 (Abstract)

Yamashiro T, Takano-Yamamoto T (1998): Differential responses of mandibular condyle and femur to oestrogen deficiency in young rats. *Arch Oral Biol* 43, 191-195

Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM (1993): Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* 366, 476-479

Yao X, Chen H, Ohtake N, Shoumura S (2006): Morphological alterations in the growth plate cartilage of ovariectomized mice. *Med Mol Morphol* 39, 193-197

Zhang Y, Lai WP, Leung PC, Wu CF, Wong MS (2007): Short- to mid-term effects of ovariectomy on bone turnover, bone mass and bone strength in rats. *Biol Pharm Bull* 30, 898-903

8. Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abbildung 1	Strukturformel des β -Ecdysons ($C_{27}H_{44}O_7$)	11
Abbildung 2	Histomorphometrische Parameter	21
Abbildung 3	Messung des proximalen Tibia-Gelenkknorpels	23
Abbildung 4	Lage und Ausschnitt der Epiphysenfuge	25
Abbildung 5	Manuelle Einzeichnung und Messung der einzelnen Zonen der Epiphysenfuge	26
Abbildung 6	Schema zur Messung der Kortikalisdicke in der Metaphyse der Tibia	27
Abbildung 7	Kortikalismessung im Bereich der Metaphyse	28
Abbildung 8	Negativbild vom endostealen Raum nach Inversion	29
Abbildung 9	<i>Strut analysis</i> nach der Methode von Dalle Carbonare et al. (2005) und Garrahan et al. (1986) in der endostealen Metaphyse, Gruppe int, sf	30
Abbildung 10	<i>Strut analysis</i> nach der Methode von Dalle Carbonare et al. (2005) und Garrahan et al. (1986) in der endostealen Metaphyse, Gruppe ovx, sf	31
Abbildung 11	Gewichtsentwicklung von ovx und int Tieren bei unterschiedlicher Futtergabe (sf oder Ecd enthaltend)	33
Abbildung 12	Futteraufnahme von ovx und int Tieren bei unterschiedlicher Futtergabe (sf oder Ecd enthaltend)	34
Abbildung 13	Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Dicke des Gelenkknorpels (proximale Tibia)	35
Abbildung 14	Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Epiphysenfugendicke (proximale Tibia)	36
Abbildung 15	Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Dicke der Reservezone der Epiphysenfuge (proximale Tibia)	37

Abbildung 16	Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Dicke der Proliferationszone der Epiphysenfuge (proximale Tibia)	38
Abbildung 17	Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Dicke der hypertrophen Zone der Epiphysenfuge (proximale Tibia)	39
Abbildung 18	Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Dicke der Kortikalis (proximale Tibia)	40
Abbildung 19	Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf den Flächenanteil der Trabekel (proximale Tibia)	41
Abbildung 20	Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf den Flächenanteil des Markfetts (proximale Tibia)	42
Abbildung 21	Effekt von Ecd (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf den Flächenanteil des Knochenmarks (proximale Tibia)	43
Abbildung 22	Effekt von Ecdyson (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Trabekelkonnektivität (proximale Tibia) - Anzahl der freien Enden	44
Abbildung 23	Effekt von Ecdyson (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Trabekelkonnektivität (proximale Tibia) - Anzahl der Trabekelverbindungspunkte	45
Abbildung 24	Effekt von Ecdyson (12 Monate per Futter in ovx und int S.D. Ratten) auf die Trabekelkonnektivität (proximale Tibia) - Anzahl der Trabekelknotenpunkte	46
Abbildung 25	Effekt von Ecdyson (12 Monate per Futter in ovx oder int S.D. Ratte) auf die Trabekelkonnektivität (proximale Tibia) - Index Knoten/freie Enden	47
Abbildung 26	Effekt von Ecd (12 Monate per Futter bei intakter Ratte) auf die Dichte der Trabekel im intraossealen Bereich der Metaphyse der Tibia qCT, SLC 1+2	73
Abbildung 27	Effekt von Ecd (12 Monate p.o. in ovx Ratten) auf die Dichte der Trabekel im endostealen Raum der Metaphyse der Tibia (pQCT)	74

Abbildung 28	Futterangaben zu ssniff® V1354 R-Z Phytoestrogenarm- Alleinfuttermittel für die Zucht von Ratten, sojafrei	75
Abbildung 29	Effekt von Ecdyson und E2 (3 Monate per Futter bei ovx Ratten) auf das rote Mark in der proximalen Metaphyse der Tibia	76

9. Tabellenverzeichnis

	Seite	
Tabelle 1	Effekte von β -Ecdyson bei Säugetieren	69
Tabelle 2	Übersicht über die einzelnen Gruppen und ihre Merkmale	16
Tabelle 3	Ereignisse im Hinblick auf das Alter der Ratten in Monaten	18
Tabelle 4	Vorbehandlung des Gewebes	71
Tabelle 5	Herstellung der Färbelösungen	72

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Priv.- Doz. Dr. med. D. Seidlová-Wuttke und Herrn Prof. Wuttke für die Betreuung meiner Arbeit in der Klinischen und Experimentellen Endokrinologie.

Zudem möchte ich Heidi Brueggemann-Meyer für die Anleitung und Unterstützung bei der Herstellung der histologischen Präparate danken.

Curriculum Vitae

Mein Name ist Anne Christine Lanzer. Ich wurde am 21.01.1987 als Tochter von Dr. med. Peter Lanzer und Renate Lanzer in San Francisco, Kalifornien geboren.

Von 1993-1997 besuchte ich die Reichenberg-Grundschule in Reichelsheim, Hessen. Am Liborius-Gymnasium in Dessau absolvierte ich 2006 mein Abitur mit der Note 1,6. Vor Beginn des Medizinstudiums an der Georg-August-Universität Göttingen machte ich ein sechsmonatiges Praktikum in der Kardiologie der University of California, San Francisco. Den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung bestand ich im Frühjahr 2008 mit der Note 2.

Im Sommer 2010 nahm ich meine Doktorandentätigkeit in der Abteilung für Klinische und Experimentelle Endokrinologie in der Universitätsmedizin Göttingen auf. Mein Medizinstudium werde ich im Herbst 2013 mit dem zweiten Staatsexamen abschließen.