

**Steroidhormone in bodengelagertem Skelettmaterial –
Ein Ansatz zur Abschätzung von Fertilitätsparametern in historischen Bevölkerungen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Holger Zierdt

aus Kassel

Göttingen 2005

D7

Referent: Prof. Dr. B. Herrmann

Koreferent: Prof. Dr. R. Hardeland

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2005

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1	Historisch-demographische Grundlagen	1
1.1.1	Bevölkerungsentwicklung in Europa	1
1.1.2	Wechsel des Grundnahrungsmittels vom Getreide zur Kartoffel	2
1.1.3	Einfluss der Nahrungskontaminanten auf die Fertilität in historischen Bevölkerungen	3
1.2	Nahrungskontaminanten in historischen Bevölkerungen	4
1.3	Möglichkeiten der Erfassung von Fertilität	7
2.	Konzeption der experimentellen Untersuchung	8
2.1.	Auswahl geeigneter Substanzklassen	8
2.1.1	Stand der Forschung: Archäometrische Untersuchungen von Biomolekülen	8
2.1.2	Ausschluss des direkten Nachweises exogen wirksamer Substanzen	9
2.1.3	Charakteristika von Steroiden im menschlichen Körper und ihre Eignung als „Marker“ für Fertilität	10
2.2	Konzeption der chemischen Analytik	14
2.2.1	Stand der Forschung: Messtechnik estrogener Substanzen	14
2.2.2	Etablierung des Estradiol-Nachweises in Knochen	15
3.	Material und Methoden	18
3.1.	Material	18
3.1.1	Rezente menschliche Knochen zur Etablierung der Methode	18
3.1.2	Historische menschliche Knochen	19
3.1.3	Material für Validierungsexperimente	26
3.2	Methoden	28
3.2.1	Probenvorbereitung	28
3.2.1.1	Vorbereitung der rezenten menschlichen Knochenproben	28
3.2.1.2	Vorbereitung der historischen menschlichen Knochenproben	30
3.2.1.3	Vorbereitung der Proben für die Validierungsexperimente	31
3.2.2	Chemischer Aufschluss des Probenmaterials	33
3.2.3	Analytische Verfahren und Messparameter	40
3.2.3.1	Gaschromatographie/Massenspektrometrie	40
3.2.3.2	Radioimmunoassay	42
3.2.3.3	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie	47
3.2.3.4	Leerkontrollen, Dotierungsexperimente und interne Standards	50
3.2.4	Datenauswertung und statistische Verfahren	52
3.2.4.1	Auswertung der Chromatogramme und Massenspektren	52
3.2.4.2	Auswertung der Radioimmunoassays	54
4.	Ergebnisse	56
4.1	Chemischer Aufschluss des Probenmaterials	57
4.2	Nachweis von Steroiden durch GC/MS	62
4.2.1	Rezenter menschlicher Knochen	62
4.2.2	Historischer menschlicher Knochen	65
4.3	Nachweis und Quantifizierung von Estradiol (E2) durch Radioimmunoassay	67
4.3.1	Rezenter menschlicher Knochen	67
4.3.2	Historischer menschlicher Knochen	71
4.4	Ergebnisse der Validierungsexperimente	76

4.4.1	Vergleich der E2-Messungen in Blutproben und rezentem Knochen	76
4.4.2	RIA-E2-Messungen in rezenten Tierknochen	78
4.4.3	RIA-E2-Messungen in Bodenproben	80
4.4.4	RIA-E2-Messungen in Pflanzenproben	81
4.4.5	RIA-E2-Messungen in Knochenasche	82
4.4.6	Prüfung der Spezifität der E2-Bestimmungen mit RIA durch HPLC	83
5.	Diskussion	92
5.1	Beurteilung der analytischen Methodik und der Messergebnisse	92
5.1.1	Eignung der Extraktionsverfahren	92
5.1.2.	Eignung von GC/MS zum Nachweis der Steroide in Knochen	94
5.1.3	Nachweis- und Quantifizierungserfolge von E2 in Knochen mittels RIA	95
5.1.4.	Validierungsexperimente: Leichenblutuntersuchung, Tierexperimente	98
5.1.5	Spezifität des im RIA verwendeten Antikörpers	99
5.2	Überlegungen zur Degradierung von Steroiden im Zuge der Knochenidiagenese	104
5.3	Perspektiven für die Anwendung der Steroid-Bestimmungen in der historischen Demographie und Anthropologie	105
6.	Zusammenfassung	108
7.	Literatur	110
8.	Anhang	123
8.1	Verzeichnis der Abkürzungen	123
8.2	Verwendete Geräte und Chemikalien	124
8.3	Probenlisten	127
8.4	Tabellierte Messdaten	132
8.5	HPLC-Chromatogramme	174

Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 2.1.3.A Biosyntheseweg von Steroidhormonen im menschlichen Körper
- Abb. 2.1.3.B Chemische Struktur von 17 β -Estradiol
- Abb. 2.1.3.C Veränderungen der Serum-Konzentrationen wichtiger Sexualhormone einschließlich E2 bei Eintritt in die Menopause
- Abb. 2.1.3.D Anstieg des E2-Spiegels in Serum während der Schwangerschaft
- Abb. 3.1.2.A Skizze der archäologischen Ausgrabungsfläche „Hinter den Brüdern“ in Goslar. Eingezeichnet sind die ergrabenen Bestattungen, gelb markiert die Individuen, deren Knochen auf Estradiol untersucht wurden
- Abb. 3.2.1.B Grundriß der Lichtensteinhöhle
- Abb. 3.2.1.C Gemauerte Gruft der Herzogin Anna von Brandenburg im Mittelschiff der Klosterkirche zu Bordesholm
- Abb. 3.2.1.D Proximales Ende eines der beiden Ossa metatarsalia von BO 9
- Abb. 3.2.1.E Vergleich der beiden Ossa metatarsalia von BO 9.
- Abb. 3.2.2.A Schematischer Ablauf einer Festphasenextraktion (SPE) über eine gepackte Säule (Kartusche)
- Abb. 3.2.3.2.A Struktur von 17 β -Estradiol 17-Hemisuccinat
- Abb. 3.2.3.2.B Struktur von 17 β -Estradiol
- Abb. 3.2.3.3.A Prüfung der Spezifität des E2-Antikörpers, Schema zur Fraktionierung von Extrakten mittels HPLC
- Abb. 4.2.1.A GC/MS-Chromatogramm des sieben verschiedene Steroide (einschließlich E2) umfassenden Standards
- Abb. 4.2.1.B GC/MS-Chromatogramm des sieben verschiedene Steroide (einschließlich E2) umfassenden Standards, mit BSTFA derivatisiert
- Abb. 4.2.1.C GC/MS-Chromatogramm des E2-Standards, mit BSTFA derivatisiert
- Abb. 4.2.1.D GC/MS-Chromatogramm eines rezenten Knochen-Extraktes (Individuum G22) mit Cholesterol
- Abb. 4.2.2.A GC/MS-Chromatogramm des sieben verschiedene Steroide (einschließlich E2) umfassenden Standards, mit BSTFA derivatisiert, Spiking auf historischen Knochen
- Abb. 4.2.2.B GC/MS-Chromatogramm eines Extraktes aus historischem Knochen (Individuum DO0229) mit Cholesterol
- Abb. 4.3.1.A Messwerte der E2-RIAs gegen das Alter der Individuen aufgetragen
- Abb. 4.3.2.A Lichtmikroskopische Aufnahme eines Dünnschliffpräparates der Femurkompakta des Individuums GS0095, Erhaltungszustand „gut“
- Abb. 4.3.2.B Lichtmikroskopische Aufnahme eines Dünnschliffpräparates der Femurkompakta des Individuums GS0105, Erhaltungszustand „mittel“
- Abb. 4.3.2.C Lichtmikroskopische Aufnahme eines Dünnschliffpräparates der Femurkompakta des Individuums GS0064, Erhaltungszustand „schlecht“
- Abb. 4.4.6.A HPLC-Chromatogramm des E2-Standards mit Overlay der im RIA gemessenen E2-Konzentrationen der einzelnen Fraktionen
- Abb. 4.4.6.B HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus rezentem Knochen (Individuum M11) mit Overlay der im RIA gemessenen E2-Konzentrationen der einzelnen Fraktionen
- Abb. 4.4.6.C HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus historischem Knochen (Individuum BO0002, Anna von Brandenburg) mit Overlay der im RIA gemessenen E2-Konzentrationen der einzelnen Fraktionen
- Abb. 4.4.6.D HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus Roggenmehl mit 10 % Ackerunkraut-Besatz mit Overlay der im RIA gemessenen E2-Konzentrationen der einzelnen Fraktionen

- Abb. 4.4.6.E Dreidimensionale Auftragung der gemessenen Signalintensitäten (mAU) über einen ausgewählten Wellenlängenbereich der Absorption (in nm) gegen die Retentionszeit $RT = 7,291$ min um den Substanz-Peak des E2-Standards
- Abb. 4.4.6.F Auftragung von fünf Absorptionsspektren des Peaks des E2-Standards zur Prüfung der Reinheit. Dargestellt ist die Signalintensität (mAU) gegen die Wellenlängen bei $RT = 7,209, 7,255, 7,289, 7,322$ und $7,349$ min
- Abb. 4.4.6.G Dreidimensionale Auftragung der gemessenen Signalintensitäten (mAU) über einen ausgewählten Wellenlängenbereich der Absorption (in nm) gegen die Retentionszeit $RT = 7,593$ min um den Substanz-Peak des Knochenextraktes von BO0009
- Abb. 4.4.6.H Auftragung von vier Absorptionsspektren des Peaks im Knochenextrakt von BO0009 zur Prüfung der Reinheit. Dargestellt ist die Signalintensität (mAU) gegen die Wellenlängen bei $RT = 7,462, 7,522, 7,595$ und $7,669$ min
- Abb. 5.1.3.A Chemische Struktur des synthetischen Estrogens Ethinylestradiol
- Abb. 5.1.5.A Grundstruktur der Hopanoide, dargestellt am Hopan
- Abb. 8.5.A HPLC-Chromatogramm E2-Standard (100 μg abs.) vor Säulenwechsel und Bestimmung der Proben
- Abb. 8.5.B HPLC-Chromatogramm E2-Standard (100 μg abs.) nach Säulenwechsel und Bestimmung der Proben
- Abb. 8.5.C HPLC-Chromatogramm Leerkontrolle Fließmittel
- Abb. 8.5.B HPLC-Chromatogramm Kontrolle Leerextrakt
- Abb. 8.5.C HPLC-Chromatogramm Leerkontrolle Fließmittel
- Abb. 8.5.D HPLC-Chromatogramm Kontrolle Leerextrakt
- Abb. 8.5.E HPLC-Chromatogramm rezenter Knochen (M11/06, getrübler Extrakt)
- Abb. 8.5.F HPLC-Chromatogramm rezenter Knochen (M07/05, klarer Extrakt)
- Abb. 8.5.G HPLC-Chromatogramm rezenter Knochen, dotiert mit 100 μg E2-Standard
- Abb. 8.5.H HPLC-Chromatogramm historischer Knochen, Individuum GS0095
- Abb. 8.5.I HPLC-Chromatogramm historischer Knochen, Individuum GS0097
- Abb. 8.5.J HPLC-Chromatogramm historischer Knochen, Individuum GS0105
- Abb. 8.5.K HPLC-Chromatogramm historischer Knochen, Individuum BO0002, Extrakt 2
- Abb. 8.5.L HPLC-Chromatogramm historischer Knochen, Individuum BO0002, Extrakt 3
- Abb. 8.5.M HPLC-Chromatogramm der Bodenprobe B01, Schwarzerde
- Abb. 8.5.N HPLC-Chromatogramm der Bodenprobe B03, Sandboden
- Abb. 8.5.O HPLC-Chromatogramm Extrakt aus Roggenmehl mit 10 % Mutterkorn-Besatz
- Abb. 8.5.P HPLC-Chromatogramm Extrakt aus Roggenmehl mit 10 % Ackerunkraut-Besatz
- Abb. 8.5.Q HPLC-Chromatogramm Extrakt aus Rotklee-Samen

Verzeichnis der Tabellen

- Tab. 3.2.3.2.A Verdünnungsschema für die RIA-Proben
- Tab. 3.2.3.2.B Verdünnungsschema für die Standardpunkte zur Erstellung der Eichkurve des Assays
- Tab. 3.2.3.2.C Anti-E2-Spezifität des Antikörpers #22.2
- Tab. 4.1.A Ausbeuten einzelner Extraktionspunkte der vierstufigen Extraktion
- Tab. 4.3.1.A Messwerte für E2 in rezenten Knochen

Tab. 4.3.1.B	Mittelwerte der E2-Messwerte nach Altersklassen (Lebensdekaden) für beide Geschlechter getrennt aufgegliedert
Tab. 4.3.1.C	Messwerte für E2 in rezenten Knochen, Mehrfachmessungen für ausgewählte Individuen
Tab. 4.3.2.A	Messwerte für E2 in historischen Knochen
Tab. 4.3.2.B	Messwerte für E2 in historischen Knochen, Doppel- und Dreifachmessungen für ausgewählte Individuen
Tab. 4.3.2.C	Gegenüberstellung der Messwerte für E2 in historischem Knochen zur Einordnung der Knochenhistologien und der Erhaltung von aDNA
Tab. 4.4.1.A	Rohdaten der RIA-Messwerte für die Messung von E2 in rezenten menschlichen Knochen und Leichenblut bzw. Knochenmark der selben Individuen
Tab. 4.4.1.B	Gegenüberstellung der RIA-Messwerte für die Messung von E2 in rezenten menschlichen Knochen und Leichenblut bzw. Knochenmark der selben Personen
Tab. 4.4.2.A	Gemessene E2-Konzentrationen in Rattenknochen mit und ohne Entfernung des Knochenmarks
Tab. 4.4.2.B	Gemessene E2-Konzentrationen in Rattenknochen mit und ohne Gabe von E2 <i>in vivo</i>
Tab. 4.4.2.C	Gemessene E2-Konzentrationen in Rattenknochen nach vereinfachter Extraktion mit Ether und komplexer Extraktion mit SPE
Tab. 4.4.3.A	RIA-Messwerte der Bodenproben
Tab. 4.4.4.A	RIA-Messwerte der Pflanzenproben
Tab. 4.4.5.A	Messwerte für E2 in Knochenasche
Tab. 4.4.6.A	Ergebnisse der RIA-Messungen mittels HPLC fraktionierter Extrakte (Knochen, Boden und Pflanzen) sowie fraktionierter Kontrollproben
Tab. 5.1.5.A	Gegenüberstellung der E2-Messwerte während der Schwangerschaft verstorbener Individuen zu Individuen mit Lebensaltern > 0
Tab. 8.3.A	Rezente menschliche Knochenproben
Tab. 8.3.B	Rezente menschliche Blutproben (Leichenblut)
Tab. 8.3.C	Historische menschliche Knochenproben
Tab. 8.3.D	Knochenproben aus den Tierexperimenten (Rattenknochen)
Tab. 8.3.E	Bodenproben
Tab. 8.3.F	Pflanzenproben
Tab. 8.4.A	Messdaten der RIAs mit Extrakten rezenter Knochen
Tab. 8.4.B	Messdaten der RIAs mit Extrakten historischer Knochen
Tab. 8.4.C	Messdaten der RIAs mit Extrakten aus Leichenblut und Knochenmark
Tab. 8.4.D	Messdaten der RIAs mit Extrakten aus Rattenknochen
Tab. 8.4.E	Messdaten der RIAs mit Extrakten aus Bodenproben
Tab. 8.4.F	Messdaten der RIAs mit Extrakten aus Pflanzenproben
Tab. 8.4.G	Messdaten der RIAs mit Leerkontroll-Extrakten
Tab. 8.4.H	Messdaten der RIAs der vierstufigen Extraktionsversuche

1. Einleitung

1.1 Historisch-demographische Grundlagen

1.1.1 Bevölkerungsentwicklung in Europa

Die Bevölkerungszahlen für Europa in der Zeit des Mittelalters schwanken zwischen etwa 10 und 30 Millionen Einwohnern (z.B. Pfister 1994, Russell 1978). Die Zahl blieb bis ins ausgehende Mittelalter relativ stabil, sieht man von den demographischen Einbrüchen durch die großen Seuchenzüge, z.B. durch die Pest, einmal ab (Keil 1989). Die im 17. Jahrhundert kurzfristig steigende Bevölkerungszahl wird durch den Dreißigjährigen Krieg 1618-1648 wieder reduziert. Zwischen Mitte und Ende des 18. Jahrhunderts schließlich beginnt die Bevölkerung exponentiell zu wachsen (Abb. 1.1.1.A).

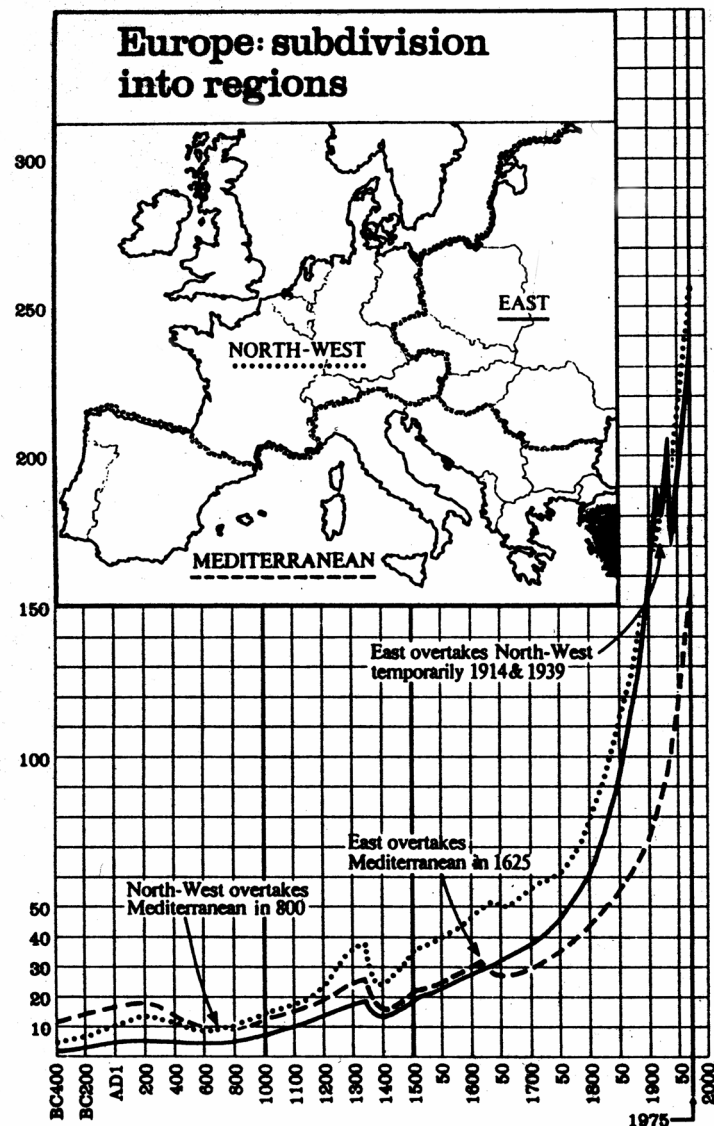


Abb. 1.1.1.A Bevölkerungsentwicklung in Europa von 400 v. Chr. bis ins Jahr 1975, aufgegliedert nach den drei Regionen Nordwest-Europa, Osteuropa und dem Mittelmeerraum (aus McEvedy und Jones 1978).

Die in der klassischen historischen Demographie als Ursache für den Anstieg diskutierten Umstände sind vielfältig. Kernfrage ist, ob für den exponentiellen Bevölkerungszuwachs nur ein Anstieg der Geburtenrate verantwortlich ist, nur ein Rückgang der Mortalität oder gar ein Zusammenspiel beider Faktoren? Als Ursachen für eine in dieser Zeit gestiegene Geburtenrate werden von Historikern u.a. diskutiert: Die Bauernbefreiung, die durch den Wegfall der grundherrlichen Heiratsbeschränkungen auch den Knechten und Mägden die Gründung von Familien erlaubte; die Gewerbefreiheit, die durch Aufweichung der Zunftbestimmungen die Heirat von Gesellen ohne Genehmigung des Meisters erlaubte; sowie die Säkularisation, die mit Auflösung der Orden und sinkenden Zahlen katholischer Geistlicher ebenfalls zu einer Steigerung der Geburtenrate führte. Die sinkende Sterberate wird vor allem zurückgeführt auf eine verbesserte Ernährung durch größere Nahrungsmittelauswahl und durch entstehende Transportmöglichkeiten sowie Fruchtwechselwirtschaft und Erschließung neuer Flächen. Verbesserte Hygiene (z.B. Abwasserentsorgung, Wasserversorgung) und medizinische Fortschritte (z.B. Geburtshilfe, Desinfektion im Krankenhaus, Impfungen) kommen erst am Ende des 19. Jahrhunderts hinzu und wirken sowohl auf die Geburten- als auch die Sterberate.

Besonders deutlich greifbar werden die demographischen Veränderungen bei der Betrachtung einzelner Bevölkerungen in einem mikrohistorischen Ansatz. Als ein herausragendes Beispiel kann hier die Geschichte des Kantons Bern von Pfister gelten (Pfister 1995). Durch den Rückgriff auf exakte Bevölkerungszahlen durch Taufregister und Totenbücher zeichnet Pfister den im Kanton Bern etwas später als im restlichen Europa einsetzenden Wachstumsschub der Bevölkerung für die Zeit um 1770 nach. Zunächst stieg dort die Geburtenrate von unter 30 Promille (vor 1740) auf 38 Promille (1797). Die Sterbeziffer blieb bei Schwankung um einen Wert von 30 Prozent noch bis 1820 stabil und sank erst dann abrupt ab. Regional wird hier deutlich, was offensichtlich Hintergrund des exponentiellen Bevölkerungswachstums in Europa gewesen ist, zunächst eine Zunahme der Geburtenrate, erst einige Jahrzehnte später ein Absinken der Sterberate. Wrigley et al. (1997) zeichnen ein ähnliches Szenario für die Bevölkerung Englands nach.

1.1.2 Wechsel des Grundnahrungsmittels vom Getreide zur Kartoffel

Anhand einer Familienrekonstruktion des Walliser Dorfes Törbel gelang es Netting (1981) zu demonstrieren, dass die im späten 18. Jahrhundert steigende Geburtenrate einen Anstieg der Fertilität bedeutete, weil die Geburtenabstände innerhalb bestehender Ehen kürzer ausfielen. Pfister (1995) betont, dass die Arbeit lange Zeit nicht wahrgenommen wurde, weil sie sich auf

ein abgeschlossenes Bergdorf mit Selbstversorgung bezog und die damalige Auffassung eine Zunahme der Fruchtbarkeit an agrarisches Wirtschaftswachstum knüpfte. Netting (1981) war es jedoch erstmalig gelungen, die Steigerung der Fruchtbarkeit mit der Einführung der Kartoffel als neuem Nahrungsmittel zu erklären, und damit das Zusammenspiel der Bevölkerungsdynamik und der Nahrungsmittelversorgung zu demonstrieren (auch wenn Salaman 1970 implizit schon zu einem ähnlichen Ergebnis gekommen war). Weitere Untersuchungen, z.B. von Pfister (1995) im Kanton Bern, unterstreichen die Hypothese. In ganz Europa geht die Bevölkerungsexplosion mit der Einführung der Kartoffel als neuem Grundnahrungsmittel einher. Der Kartoffelanbau verdrängt nach und nach die schon seit dem 8. Jahrhundert bestehende Dreifelderwirtschaft (zur Geschichte des Kartoffelbaus in Europa siehe u. a. Denecke 1976, Vandenbroecke 1971 und Ziessow 1992). Regional lässt sich für die Zeit des 18. Jahrhunderts in Deutschland überall die Einführung der Kartoffel nachweisen (z.B. Egli und Koller 1993, Hoffmann 1998, Sandgruber 1982, Steinke 1997, Wendler 1992).

Als grundlegende Hypothesen, warum die Kartoffel zur Steigerung der Fertilität in der Europäischen Bevölkerung beiträgt, konkurrieren zunächst zwei Ideen:

- Der Anbau von Kartoffeln auf einer identischen Fläche bringt in Kalorien gemessen den etwa vierfachen Ertrag gegenüber dem Anbau von Getreide (z. B. Menken et al. 1981).
- Die Kartoffel ist stark Vitamin C-haltig, wodurch der Skorbut als eine der am stärksten verbreiteten Mangelkrankungen verdrängt wird. Daher wurden Kartoffeln lange vor ihrer Verbreitung in Europa den spanischen Seefahrern zur Vermeidung des Skorbut auf Schiffsreisen mitgegeben.

1.1.3 Einfluss der Nahrungskontaminanten auf die Fertilität in historischen Bevölkerungen

Eine dritte Hypothese stellt der Agrarwissenschaftler Christoph von Gundlach mit seinen Arbeiten zum Zusammenhang zwischen der agrarischen Innovation durch die Einführung der Kartoffel als neuem Grundnahrungsmittel und der damit einhergehenden demographischen Transition eingehend dar (von Gundlach 1986, 1987 und 1989). Die Kartoffel ersetzt den Getreideanbau im Rahmen der Dreifelderwirtschaft. Von Gundlach geht davon aus, dass die Kartoffel als reines Nahrungsmittel geerntet werden kann, also ohne jegliche Beiernten, dies jedoch in der Getreidewirtschaft der früheren Jahrhunderte nicht möglich war. Er postuliert, dass die mit dem Getreide geernteten Samen von Ackerunkräutern auf den Feldern, die durch die damalige Mühlentechnik nicht ausgesiebt werden konnten, pharmakologisch wirksame

Substanzen enthielten. Der ständige Eintrag dieser Substanzen in die tägliche Getreidebasierte Nahrung (Brot, Brei) führte seiner Auffassung nach zu einer Suppression der Fertilität. Diese Art der „natürlichen Geburtenregelung“ entfiel mit dem Verzehr von Kartoffeln. Unabhängig von der These von Gundlachs hat die amerikanische Historikerin Mary Matossian ein ganz ähnliches Konzept entwickelt (Matossian 1981, 1984, 1989 und 1996). Matossian hebt dabei auf die Problematik der Kontamination des Getreides, hier vor allem des Roggens, mit Mutterkorn ab. Sie entwickelt die gleiche Idee wie von Gundlach, dass die Kartoffel für die Entlastung der Nahrung von pharmakologisch wirksamen Stoffen sorgt, namentlich der Ergotalkaloide aus den Sklerotien des Mutterkorn-Pilzes *Claviceps purpurea*. Diese werden über das Brot als tägliche Nahrung von der Bevölkerung aufgenommen und setzen, ebenso wie die Substanzen aus den Ackerunkräutern, die Fertilität herab.

1.2 Nahrungskontaminanten in historischen Bevölkerungen

Ergotalkaloide, Mykotoxine

Die von Matossian aufgestellte These der Fertilitäts-Suppression bezieht sich auf die Kontamination der Getreidenahrung mit Mykotoxinen (Matossian 1996) und Ergotalkaloiden aus dem Mutterkorn (Matossian 1981, 1984 und 1989).

Von den Mutterkornalkaloiden stellt Ergotamin den wichtigsten Vertreter dar, der Bestandteil der Sklerotien des Mutterkorn-Pilzes *Claviceps purpurea* ist und erstmals 1918 von Arthur Stoll bei Sandoz isoliert wurde. Die orale Aufnahme von Ergotalkaloiden führt dosisabhängig zu einer schleichenden oder akuten Vergiftung, die bei Tieren wie Menschen beobachtet werden kann. Akute Symptome sind Muskelkrämpfe, brennende Schmerzen in den Gliedmaßen, die den Vergiftung den Namen „St. Antonius-Feuer“ einbrachten, sowie Absterben von Fingern und Zehen oder sogar ganzen Gliedmaßen. Fünf bis zehn Gramm frisches Mutterkorn enthalten genug Ergotalkaloide, um einen erwachsenen Menschen zu töten. Geringere Dosen der Substanzen wirken abortiv, weshalb Mutterkorn in früheren Zeiten auch als Abtreibungsmittel eingesetzt wurde. Mutterkornpilze wachsen bevorzugt auf Roggen, können aber auch Weizen oder andere Getreide und Gräser befallen. Für das Wachstum ist feucht-warmes Wetter notwendig, wodurch Mutterkorn besonders dann häufig auftritt, wenn die Ernten schon aus klimatischen Gründen schlecht ausfallen. In Mangelzeiten ist man dann auch bereit, sichtbar mit Mutterkorn besetztes Getreide trotzdem zu Mehl zu vermahlen und zu Brot zu verarbeiten. Untersuchungen belegen, dass die enthaltenen Ergotalkaloide beim Backprozess nicht quantitativ zerstört werden (Wolff und Ocker 1985),

so dass der Verzehr von Brot mit Mutterkornanteilen zu Vergiftungen führen kann. Aus historischen Zeiten sind zahlreiche Berichte über Massenvergiftungen bekannt, die Bevölkerungen ganzer Dörfer dezimierten. Vereinzelt wird noch heute von Vergiftungen berichtet (z.B. Pfänder et al. 1985).

Die Matossian'sche Hypothese der Suppression von Fertilität durch Mutterkorn-Intoxikation bezieht sich jedoch weniger auf die deutlich sichtbaren Auswirkungen der akuten Vergiftung, sondern mehr auf die latente Vergiftungswirkung bei der Aufnahme kleiner Dosen (die im übrigen daher nicht bemerkt werden). Die Fertilitäts-hemmende Wirkung der Ergotalakaloide konnte im Tierversuch belegt werden, da heute Getreide mit Mutterkorn-Besatz bis zu einem bestimmten Grenzwert noch als Tierfutter Verwendung findet.

Matossian bezieht in ihre Annahme auch Mycotoxine mit ein, toxische Substanzen, die durch das Wachstum von Pilzen der Gattung *Fusarium* spp. insbesondere auf Mais, Hafer und Weizen in die Nahrung gelangen können (Frank 1981, van Egmond 1989). Giftstoffe aus Fusarien sind vor allem Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON), sowie Ochratoxin A aus *Aspergillus*- oder *Penicillium*-Arten. Außerhalb Europas zählen auch die hochtoxischen Aflatoxine der *Aspergillus*-Arten dazu. Mykotoxine und ihre Auswirkungen sind zwar nicht so bekannt wie die Ergotalakaloide, jedoch sehr verbreitet, in Europa geht man von einem Befall von etwa 25 % aller Feldfrüchte aus (Krska 1999), daher existiert eine spezialisierte chemische Analytik zum Nachweis der Mycotoxine (z.B. Krska 1998). Für die enthaltenen Gifte sind z.T. Wirkungen auf das endokrine System bekannt. ZON hat eine estrogene Wirkung und ruft in hohen Dosen Sterilität hervor (Krska 1999). Bei Schwangeren kann es zum Abort führen.

Ackerunkräuter

Die nach von Gundlach für Fertilitäts-Suppression verantwortlichen pharmakologisch wirksamen Substanzen gelangen über die Beiernte von Samen im Getreide mit in die Nahrung, werden also nicht-intentionell aufgenommen. Alltägliche Nahrungsmittel waren Roggenschrotbrote, Hafergrütze oder Haferbrei, ggf. Gemüsebrei aus Erbsen und Bohnen, dem Hafer beigegeben wurde (Ruf 1993). Der geschätzte Getreidekonsum um 1600 lag bei 250 kg/Jahr pro Person. Bei den meisten Familien der ärmeren Schichten verschlangen die Nahrungsausgaben nach Schätzungen mindestens zwei Drittel der Gesamtausgaben (Rahlf 1996, Saalfeld 1989, 1990). Damit waren die Familien gezwungen, Nahrungsmittel minderer Qualität zu sich zu nehmen, wenn höhere Qualitäten nicht erschwinglich waren.

Die nicht-intentionelle Aufnahme unterscheidet sich von der Verwendung der mittelalterlichen Nutzpflanzen, deren pharmakologisch wirksame Substanzen gezielt als Medikamente eingesetzt wurden (z.B. Schwarzes Bilsenkraut „Herba dentaria“, als Paste gegen Zahnschmerzen; Filicinsäure aus dem Wurmfarne als Abführmittel; Alkaloide wie z.B. aus Mastix, Alraune, Kampfer).

Von Gundlach listet in seiner Dissertation (von Gundlach 1986) eine stattliche Zahl von Ackerunkräutern des Sommer- und des Winterfeldes auf, bei denen er vermerkt, ob sie pharmakologisch wirksame Substanzen enthalten. Problematisch ist, dass alle Daten der Zusammenstellung auf nur eine Publikation zurückgehen, die Zusammenstellung von Farnsworth et al. (1975a und 1975b). Farnsworth et al. schreiben aus dem Wissen der damaligen Zeit allen Pflanzen antifertile Wirkungen zu. Bei näherer Prüfung fallen zahlreiche Pflanzen aus dem Spektrum der mit wirksamen Substanzen versehenen Arten heraus, weil Stengel-, Blatt- oder Wurzelteile die eigentlich giftigen Anteile darstellen bzw. die Substanzen enthalten, die unter Verdacht stehen, pharmakologisch relevant zu sein.

In einer detaillierten Durchsicht der Literatur konnte Johannsen (unveröffentlicht) die Anzahl der Arten mit tatsächlicher Relevanz stark einengen. Dazu wurde nicht nur die toxische Wirkung, sondern auch die Größe und Form der Samen (schwere Trennbarkeit von Getreide durch historische Mühlentechnik), und ihre tatsächliche Verbreitung auf den Feldern mit in die Bewertung einbezogen (Paläoethnobotanische Funde, z.B. Lange 1978, Kroll 1995, Übersicht in Willerding 1986).

Danach verbleiben sicher nur folgende Arten, die Samen mit toxischer Wirkung aufweisen bzw. deren Samen möglicherweise Pilze mit Toxinen tragen (nach den Namen sind bekannte oder vermutete Toxine gelistet):

- *Agrostemma githago*, Kornrade, Githagin, Gypsogenin
- *Centaurea cyanus*, Kornblume, möglicherweise Indolalkaloide
- *Lathyrus sativus*, Saat-Platterbse, Canavanine, Aminopropionitril
- *Lolium temulentum*, Taumelloch, Alkaloid: Festucin, oder Mykotoxine verschiedener Pilze
- *Medicago sativa*, Luzerne, Canavanine oder Saponine
- *Polygonum arvense*, Feld- oder Wiesenknöterich, Fagopyrin
- *Vaccaria pyramidata*, Kuhkraut, Saponine
- *Vicia spec.*, Saatwicke, weitgehend unbekannte Neurotoxine

Wobei die Pflanzen hier nicht nach Vorkommen auf dem Sommer- bzw. Winterfeld getrennt wurden. Detaillierte Aufstellungen über giftige Unkrautsamen, die in die Nahrung gelangen, existieren fast ausschließlich aus Zeiten, deren Kenntnisstand als überholt angesehen werden muss (z.B. Steyn 1933).

1.3 Möglichkeiten der Erfassung von Fertilität

Die von Matossian und von Gundlach parallel formulierte Hypothese, dass die Einführung der Kartoffel letztendlich die Bevölkerung im Europa des ausgehenden 18. Jahrhunderts von einer Unterdrückung der natürlichen Fertilität durch verunreinigte Nahrung befreit hat, erscheint frappierend logisch.

Die historische Demographie ist jedoch auf Basis der aus schriftlichen Aufzeichnungen (in der Regel Tauf-, Trau- und Sterberegister) genauso wenig in der Lage, Fertilität auf diesem Niveau zu erfassen, wie die Paläodemographie, der die Individualdaten Geschlecht und Sterbealter der untersuchten Skelettpopulationen zur Verfügung stehen. Die Feststellung von Fertilität in historischen Bevölkerungen ist ein Desiderat der Anthropologie, das die Erfassung von Individualdaten vor allem der Frauen fordert. Kenntnisse über Schwangerschaft (Häufigkeit, Intergeburtenabstände), sowie das zeitliche Einsetzen von Menarche und Menopause, also der reproduktiven Zeitspanne während des Lebens, würden die individuelle Darstellung von „life-histories“ ermöglichen. Durch Massenuntersuchung dieser „Fallstudien“ erfolgt eine Übertragung auf Bevölkerungen, so dass Individualereignisse zu kollektiven Parametern werden.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, eine Methode zu entwickeln, mit der sich empirische Daten gewinnen lassen, welche die Fertilität historischer Bevölkerungen charakterisieren und zur Prüfung der Matossian/von Gundlach-Hypothese beitragen.

Dabei wird die Datengewinnung durch den direkten Zugriff auf das Substrat Knochen der verfügbaren Skelettpopulationen erfolgen müssen.

2. Konzeption der experimentellen Untersuchung

2.1. Auswahl geeigneter Substanzklassen

2.1.1 Stand der Forschung: Archäometrische Untersuchungen von Biomolekülen

Endogene Biomoleküle

In der archäometrischen Forschung werden heute bereits zahlreiche Makromoleküle aus alten Geweben (Knochen, Mumien, Haare) bearbeitet. Dazu zählen vor allem:

- **DNA.** Die Analyse alter DNA, sog. „aDNA“, zählt zu den wichtigsten der naturwissenschaftlichen Techniken aus dem Spektrum der archäometrischen Zugänge, die kulturwissenschaftliche Fragestellungen zu beantworten suchen. Seit mehr als 15 Jahren ist die Analyse-Technik etabliert, die vor allem durch die Erfindung der Polymerase Chain Reaction (PCR). Erste erfolgreiche DNA-Nachweise in menschlichen Knochen gelangen Hagelberg et al. (1989) und Hummel (1992). Heute umfasst das Spektrum der Anwendungen die Feststellung von Geschlecht, Verwandtschaft, infektiösen Erkrankungen u.v.a. (aktuelle Übersicht in Hummel 2003).
- **Proteine.** Die funktionell sehr viel heterogenere Stoffgruppe der Proteine ist in den vergangenen 10-15 Jahren ebenfalls intensiv untersucht worden. Ein Schwerpunkt liegt auf der Identifikation von Enzymen in alten Geweben, z. B. Arbeiten über Phosphatasen von Demir et al. (2003), Etspüler et al. (1995), Kaup et al. (1994) und Weser et al. (1995). Auch Proteine aus Knochen konnten nachgewiesen werden (z.B. Brandt et al. 2000, Poinar und Stankiewicz 1999, Tuross und Stathoplos 1993). Sogar in fossilem Material gelang die Bindung spezifischer Proteine im Radioimmunoassay (Lowenstein 1980, 1991).
- **Fette/Lipide.** Lipide stellen wohl die am weitesten in archäologischem Material verbreiteten Substanzen dar. Sie werden sowohl in archäologischen Funden (z.B. Keramiken, Copley et al. 1998, Evershed et al. 1997, Rottländer 1985) als auch in menschlichen Überresten (z.B. Evershed et al. 1995) identifiziert. Cholesterol als bekanntester Vertreter ist in historischem Knochen gut nachweisbar und wird z.B. zur Untersuchung von Ernährungsgewohnheiten in historischen Bevölkerungen (Stott et al. 1999, Stott und Evershed 1996) genutzt (Isotopenanalytik).

Exogene Biomoleküle

Sehr viel uneinheitlicher ist die Systematik für exogene, also von außen in die untersuchten Körpergewebe eingetragenen Substanzen. Die einzig regelmäßig untersuchten Gruppen sind:

- **Drogen.** Einigen Arbeitsgruppen gelingt angeblich der Nachweis von Kokain und THC in ägyptischen Mumien (z.B. Balabanova et al. 1992), sowie Nikotin (Balabanova et al. 1994, 1996). Wischmann et al. (2002) zeigten die Analytik von Nikotin in Neu- und Bronzezeitlichen Skeletten.
- **Bitumen.** Die Charakterisierung des für die Balsamierung von Mumien eingesetzten Bitumens mit Hilfe der GC/MS erlaubt die Bestimmung seiner Herkunft (z.B. Harrell und Lewan 2002).

2.1.2 Ausschluss des direkten Nachweises exogen wirksamer Substanzen

Die in Kap. 2.1.1 wiedergegebene, unvollständige Übersicht der archäometrisch untersuchten Substanzen deutet bereits an, dass der Schwerpunkt der Untersuchungen auf endogenen Stoffgruppen liegt.

Informationsgehalt

Endogene Stoffgruppen liefern in der Regel einen höheren Informationsgehalt also exogen eingetragene Stoffe. Nach der DNA mit dem größten Informationsgehalt folgen Proteine, Kohlenwasserstoffe, Lipide und schließlich pflanzliche Biopolymere mit dem geringsten Informationsgehalt. Sie übertreffen aber in fast allen Fällen die Informationsdichte, die ein Nachweis einer einzelnen exogenen Substanz aufweisen kann. Zu den bisher wenig oder überhaupt nicht untersuchten endogenen Stoffgruppen mit hohem Informationsgehalt gehören die Steroide (Sexualhormone, Schwangerschaftshormone), Catecholamine und Endorphine. Die Analyse jeder einzelnen Stoffgruppe liefert biographische Informationen.

Nachweiswahrscheinlichkeit

Der Nachweis endogener Substanzen gelingt unter der Annahme, dass sie während der Diagenese des betreffenden Gewebes in einer für die Analyse ausreichenden Menge erhalten bleiben. Die Stoffe

Der Nachweis exogener Substanzen erfordert das Zutreffen einer sehr viel größeren Zahl von Randbedingungen: Die Substanzen müssen

- in den Körper aufgenommen werden (möglichst Resorption im Magen-Darm-Trakt) und
- im Knochen deponiert werden (im organischen Anteil des Knochens deponiert oder akkumuliert werden, entsprechend ihrer Funktion auf physiologischem Weg);

- der Eintrag ist hinsichtlich des Zeitfaktors bei akut toxisch wirkenden und zum Tode führenden Substanzen kritisch; in beiden Fällen
- muss dabei so viel Substanz eingetragen werden, dass die Nachweisgrenzen der Analytik überschritten werden.
- Während der Diagenese des Knochenmaterials müssen die Substanzen erhalten bleiben (einem Um- oder Abbau durch Mikroorganismen widerstehen), bei teilweisem Abbau ist die Rate (Halbwertszeit) zu bestimmen.

Nicht abschätzbar ist auch, welche Individuen z.B. eines Gräberfeldes dem gesuchten Stoff überhaupt ausgesetzt waren, sofern, in der Regel, keine äußeren Spuren am Skelett erkennbar sind.

Praktische Anwendung: Auswahl einer Substanzklasse

In summa der gelisteten Randbedingungen und Unbekannten erscheint die Aussicht, z.B. Ergotalkaloide, Mycotoxine oder Alkaloide pflanzlichen Ursprungs in menschlichen Überresten direkt nachzuweisen, als äußerst gering. Die Auswahl von untersuchungswürdigen Individuen ist extrem schwer und beschränkt sich auf Verdachtsfälle (mit entsprechenden archäologischen Kontexten). Screening-Verfahren scheitern ebenfalls, wenn zur Etablierung der Analysenmethode keine Positivkontrollen zur Verfügung stehen.

Daher muss zur Prüfung der Matossian/von Gundlach-Hypothese die Untersuchung durch den direkten Nachweis der die Fertilität herabsetzenden exogenen Substanzen verworfen werden. Der Rückgriff erfolgt auf eine endogene Substanzklasse, welche die positiven Eigenschaften hohen Informationsgehaltes und hoher Nachweiswahrscheinlichkeit in sich vereinigt. Zur Untersuchung von Fertilitäten erscheinen die Sexualhormone (Steroide) dazu geeignet (vgl. Kap. 2.1.3).

2.1.3 Charakteristika von Steroiden im menschlichen Körper und ihre Eignung als „Marker“ für Fertilität

Steroidhormone

Die Synthesewege der Steroide im menschlichen Körper sind umfassend erforscht. Die Steroidhormone teilen sich in die Androgene, die männlichen Sexualhormone, sowie die Estrogene, die weiblichen Sexualhormone, auf (Übersicht Abb. 2.1.3.A). Steroidhormone wirken primär auf die Genexpression und nicht auf die Enzymaktivitäten oder Transportprozesse. Im Gegensatz zu z.B. Adrenalin muss ein Steroidhormon wie Estradiol in

die Zielzelle eindringen, um seine Wirkung zu entfalten. Sein biologischer Effekt hängt dabei von der Synthese neuer Proteine ab.

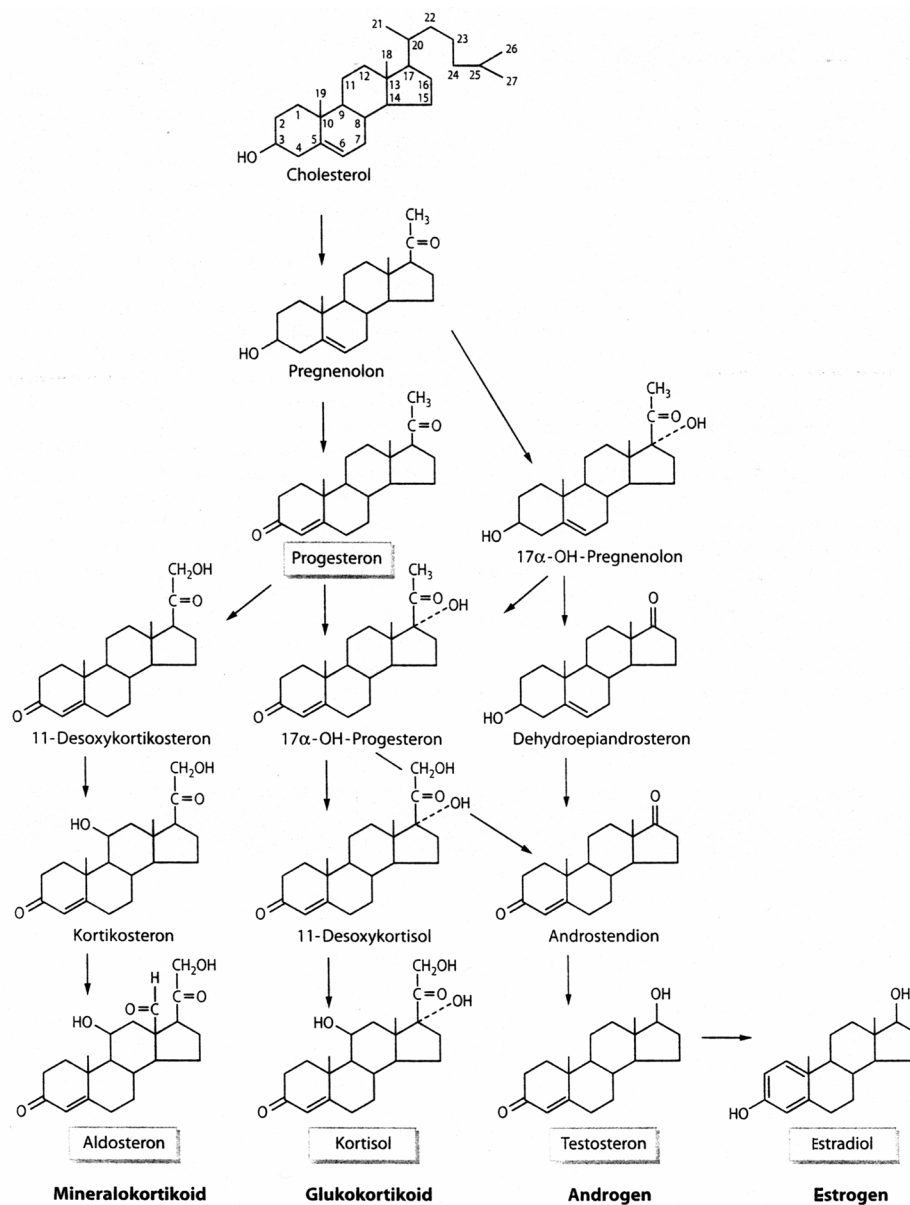


Abb. 2.1.3.A Biosyntheseweg von Steroidhormonen im menschlichen Körper (aus Leidenberger 1997).

Estradiol (E2)

Estradiol ist eines der wichtigsten natürlichen Estrogene (auch Follikelhormone). Im Organismus ist Cholesterin der Ausgangsstoff für die Estradiol-Synthese (vgl. Abb. 2.1.3.A). Über Pregnenolon, Progesteron, 17 α -Hydroxyprogesteron, Androstendion und Testosteron entsteht letztendlich das 17 β -Estradiol (Abb. 2.1.3.B). Durch Oxidation der OH-Gruppe in Position 17 kann es in Estron überführt werden. Estradiol ist das biologisch höchst aktive

natürlich produzierte Steroidhormon. Es spielt neben der Funktion als Follikelhormon eine entscheidende Rolle im Knochenstoffwechsel.

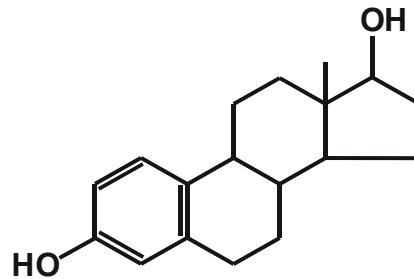


Abb. 2.1.3.B Chemische Struktur von 17 β -Estradiol

Für die Untersuchung von Fertilitätsparametern aus Knochen ist E2 als „Marker“ besonders geeignet, weil es folgende Voraussetzungen erfüllt:

- seine zentrale Funktion im Knochenstoffwechsel bedingt eine hohe Aussicht auf Wiederfindung im Gewebe Knochen. Einen Überblick der Mechanismen estrogener Wirkungen auf das Skelett geben z.B. Rickard et al. (1999), die Wirkungen androgener Hormone fasst z.B. Finkelstein (1995) zusammen.
- seine chemische Struktur ist stabil und erhöht somit die Aussicht auf Erhaltung während der Diagenese (gestützt von den erfolgreichen Nachweisen von Cholesterin in archäometrischen Untersuchungen, vgl. Kap. 2.1.1)
- es liegt in zahlreichen bisher untersuchten Körpergeweben in geschlechts- und altersdifferenten Spiegeln vor, die sich signifikant unterscheiden und die Feststellung der großen endokrinen Wechsel im Lebenslauf von Frauen ermöglichen: Menarche, Menopause, Schwangerschaft. Die Konzentrationsunterschiede zwischen Geschlechtern, Lebensjahren, reproduktiven Stadien usw. sind notwendig, um überhaupt sinnvoll quantifizieren zu können.

Menarche, Menopause

Im Serum von Mädchen vor der Pubertät sind ca. 0,6-1,2 pg E2/ml Serum zu erwarten. Mit Einsetzen der Menarche steigt der Wert auf etwa 140-160 pg E2/ml Serum an, um in der Perimenopause auf etwa 20 pg E2/ml abzusinken (Abb. 2.1.3.C).

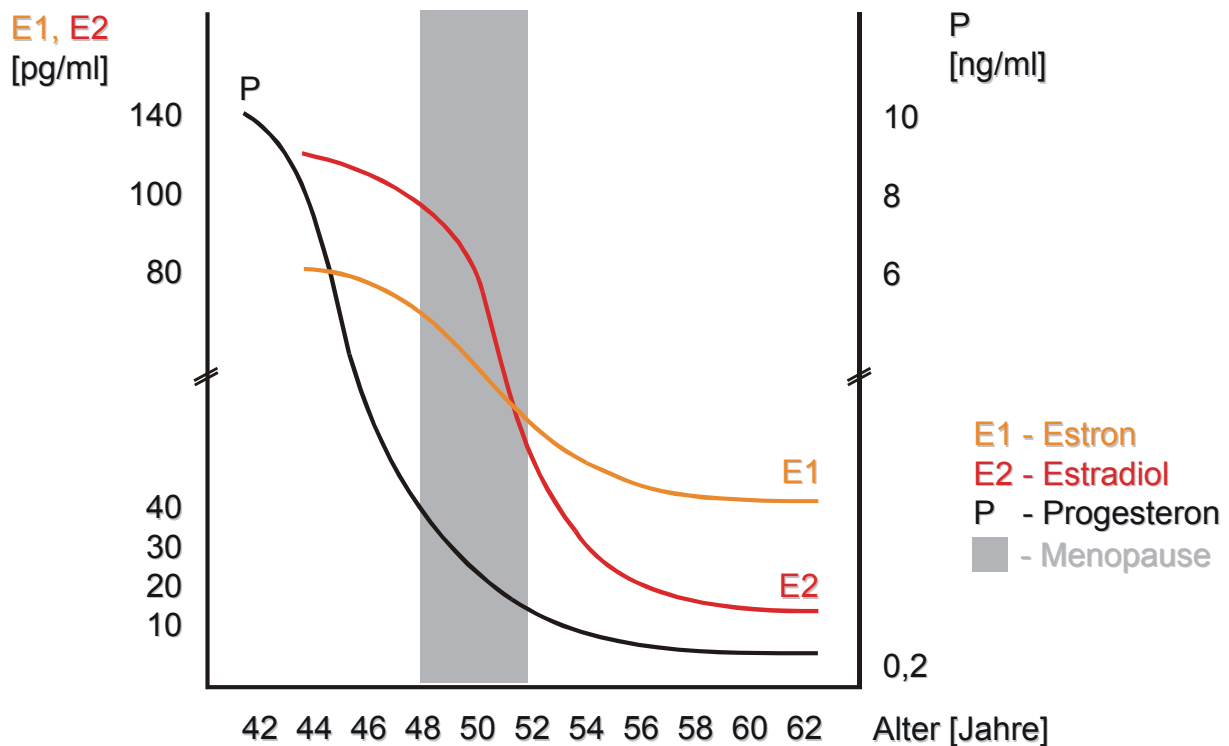


Abb. 2.1.3.C Veränderungen der Serum-Konzentrationen wichtiger Sexualhormone einschließlich E2 bei Eintritt in die Menopause (nach Allolio 1996).

Das Estrogen-Defizit von Frauen im postmenopausalen Lebensabschnitt bewirkt die primäre Osteoporose. Die Feststellung des Menopause-Zeitpunktes anhand des stark verringerten E-2-Spiegels im Serum stellt eine der Möglichkeiten dar, einen Fertilitätsparameter zu erfassen. So konnten z.B. Gold et al. (2001) feststellen, dass ethnische Unterschiede für den Zeitpunkt der Menopause existieren. Sie stellten jedoch auch fest, dass die Zahl der von einer Frau geborenen Kinder, ihr sozio-ökonomischer Status (z.B. Verheiratung, Arbeitslosigkeit) und der Konsum von Drogen (Tabak) einen ähnlich großen Einfluß auf den Menopausezeitpunkt haben. Sie stellten eine Variation von max. 2,5 Jahren fest.

Schwangerschaft

Während der Schwangerschaft steigt die Konzentration des freien E2 im Serum um eine ganze Größenordnung. Spätestens mit der 20. SSW wird ein Spiegel von mindestens 3 ng/ml Serum erreicht (z.B. Gerhard und Runnebaum 1998, Leidenberger 1997), vgl. Abb. 2.1.3.D. Die außerordentlich hohen Konzentrationen sollten eindeutig erfassbar sein und somit die Möglichkeit der Feststellung von Schwangerschaften auch in historischem Skelettmaterial ermöglichen.

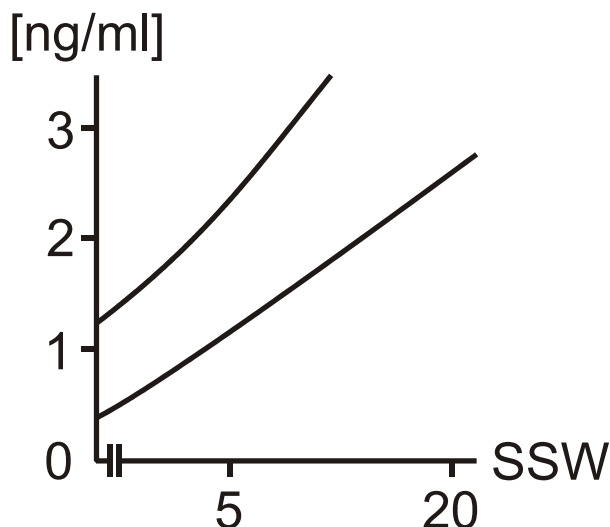


Abb. 2.1.3.D Anstieg des E2-Spiegels in Serum während der Schwangerschaft. Die beiden Linien geben das 5. und 95. Perzentil an (nach Gerhard und Runnebaum 1998).

2.2 Konzeption der chemischen Analytik

2.2.1 Stand der Forschung: Messtechnik estrogener Substanzen

Untersuchungsgebiete

Estrogene Substanzen, zu denen das Estradiol zu zählen ist, werden in unterschiedlichen Arbeitsgebieten untersucht. In der medizinischen Diagnostik wird E2 routinemäßig in Vollblut, Plasma, Serum, Follikelflüssigkeit aus dem Ovar sowie in Urin (nicht-invasive Methode) bestimmt. Urin stellt auch in der Dopinganalyse, bei der hauptsächlich nach anabolen Steroiden gesucht wird, das vorherrschende Substrat dar (Gower et al. 1995). Im Pferdesport werden bei plötzlichen Todesfällen der Tiere unter Belastung Dopingtests gelegentlich auch in Muskelgewebe oder Knochen durchgeführt (Uboh et al. 1995). In der Lebensmittelanalytik wird vor allem Rindfleisch standardisiert Hormonuntersuchungen unterzogen (Hartwig et al. 1995, 1997).

Der Einsatz von Steroid-Bestimmungen aus Fäkalien von Tieren wird im Kontext der Verhaltensforschung eingesetzt, um z.B. den Zyklus der weiblichen Tiere festzustellen.

In der Umweltanalytik werden Xenoestrogene (Übersicht in Metzler und Pfeiffer 2001) v.a. im Zuge von Wassergüteuntersuchungen bestimmt (Upmeier 2001).

Messtechniken

Als Messtechniken sind sowohl HPLC als auch GC/MS und Radioimmunoassay (RIA) etabliert. Welche Technik angewendet wird, ist abhängig vom Substrat und den zu bestimmenden Konzentrationen.

Die älteste angewandte Technik ist die GC/MS. Die erste Auftrennung von Steroiden mit Hilfe der Gaschromatographie gelang Vandenheuvel et al. 1960. Steroide gehörten zu den ersten Substanzen, die auf einen kommerziell erwerbbaaren GC/MS-System untersucht wurden. Die GC/MS bietet neben niedrigen Nachweisgrenzen für Steroide die Möglichkeit, die gemessenen Substanzen eindeutig zu identifizieren und damit eine Spezifität von 100 % zu erreichen. Auch Simultanbestimmungen einer Vielzahl von Substanzen sind dadurch möglich.

Immunologische Verfahren (v.a. RIAs) sind generell empfindlicher als GC/MS. Sie bieten jedoch nicht die Identifikationsmöglichkeit von Substanzen, und auch keine so hohe Selektivität (Spezifität) wie die GC/MS. Die Methode des Radioimmunoassay (RIA) wurde von 1959 von Berson und Yalow gemeinsam entwickelt, um im klinischen Umfeld aus relativ kleinen Blutproben einfache und kostengünstige Tests auf bestimmte Krankheiten (z.B. Diabetes) durchführen zu können (Yalow und Berson 1959). 1977 erhielt Yalow den Nobelpreis für Medizin für die Erfindung des RIA. Der RIA hat sich vor als sehr wichtige und außerordentlich empfindliche klinische Hormonbestimmungsmethode etabliert. Wichtigster Parameter ist die Spezifität des verwendeten Antikörpers. Er soll möglichst außer dem zu bestimmenden Antigen in der Probe keine anderen Antigene binden (Kreuzreaktionen). Für den Test der Spezifität des Antikörpers sind meist aufwendige Versuche notwendig, bei denen die Verdrängung des Antigens durch eine große Zahl verschiedener Substanzen gemessen wird (zur Spezifität des Antikörpers in dieser Untersuchung siehe Kap. 3.2.3.2 und 5.1.5).

Die HPLC wird relativ selten für Steroidbestimmungen eingesetzt, da die Nachweisgrenzen sehr viel höher sind als bei immunologischen Verfahren. Ein Beispiel für eine E2-Bestimmung aus Plasma mit elektrochemischer Detektion stellt die Arbeit von Yamada et al. (2002) dar.

2.2.2 Etablierung des Estradiol-Nachweises in historischen Knochen

Stand der Forschung

Obwohl in der Medizin, Chemie und in der Doping-Kontrolle, der Umweltanalytik E2-Nachweise und Bestimmungen weit verbreitet sind, existiert für das Substrat Knochen praktisch keine Literatur.

Der erste Nachweis von Steroiden in archäologischem Material mit Hilfe von TLC erfolgte durch Lin et al. (1978) an humanen Coproliten aus Nevada. Von Bethell et al. (1994) und Sobolik et al. (1996) wurden ähnliche Versuche an historischem Fäkalmaterial durchgeführt:

Das festgestellte Muster der bestimmten Substanzen ähnelte dem moderner Kotproben. Allerdings wurden auch Unterschiede festgestellt, die auf Abbauprozesse hindeuten. In archäologischem Kontext sind die Arbeiten über die Inhalte der Keramiken zu nennen, die als Nachgeburtstöpfe angesehen werden (Rademacher und Waidelich 1996) Einerseits mit Hilfe von Dünnschichtchromatografie (Beitler 1997), andererseits unter dem Einsatz von GC/MS (Alt und Mußhoff 1997) wurden hier Steroide nachgewiesen.

Die Untersuchung von Cholesterol in alten Geweben wurde von der Arbeitsgruppe um Evershed etabliert. Zur Gewinnung von Daten zur Nahrungszusammensetzung wurden hier stabile Isotope des Kohlenstoffs in archäologischen Knochen und Zähnen untersucht (Stott und Evershed 1996). Vor allem die Erhaltung des metabolischen Steroid-Vorläufers Cholesterol in Knochen und Zähnen (im diesem Fall aus dem 18. Jahrhundert) deutet auf die mögliche Analysierbarkeit von Steroiden im historischen Knochen hin.

Erwartungswert für Steroide im Knochen

Welche Menge eines Steroids im Knochenmaterial erwartet werden kann, ist nicht nur abhängig von der Absolutmenge in der Knochenmatrix selbst, sondern auch vom Blutvolumen, das im untersuchten Knochenvolumen eingeschlossen ist. Weder bei den rezenten Knochen lässt sich dieses Volumen in den kleinen und kleinsten Gefäßen (incl. der Kapillaren) z.B. durch Spülung mit Puffern entfernen, noch beim historischen Knochen. In historischem Knochen kann zunächst theoretisch erwartet werden, dass ein großer Teil der Substanzen aus dem Blut und den Blutgefäßen in den während der Diagenese entstehenden Hohlräumen verbleibt, sofern er nicht durch Mikroorganismen um- oder abgebaut wird.

In historischem Knochen als Quelle für die Substanz zu erwarten:

- die in der organischen Phase des Knochens eingelagerten Substanzen
- die möglicherweise durch Adsorption an die mineralische Phase des Knochens gebunden Substanzen
- die im Knochenmark zum Zeitpunkt des Todes eingelagerten Substanzen
- die im Blut zum Zeitpunkt des Todes vorhandenen Substanzen (aus dem Blutvolumen im Knochen)

Allerdings zeigen Cook et al. (2000), dass *post mortem* die Konzentrationsverhältnisse bestimmter im Blut vorhandener Substanzen sich allein durch Rückfluss großer Mengen des Blutes in die zentralen Blutgefäße erheblich verändern können.

Direkte Angaben zum Anteil der Blutgefäße bzw. des Blutes selbst am Volumen des Knochens konnten in der Literatur nicht festgestellt werden. Der Anteil wurde daher aus verschiedenen Grundangaben überschlägig berechnet (für Erwachsene; bei differierenden Angaben in der Literatur wurden Mittelwerte zu Grunde gelegt):

- das Skelett macht zwischen 10 und 18 % des Körpergewichtes aus (z. B. Felsenberg 2001), bei einem Körpergewicht von 70 kg sind dies im Mittel 12,5 kg Knochen
- bei durchschnittlich 5,4 l Blut im Körper eines Menschen befinden sich ca. 1,3 l im Gefäßsystem des Skelettes (Kunsch und Kunsch 2000)
- bei einer Knochendichte von ca. 1,4 g/cm³ des rezenten Knochens ¹⁾ [0,9-2 g/cm, abhängig vom Skelettelement und Individualalter (Evans 1973, Skalak und Chien 1987)] stellen 12,5 kg Knochen ein Volumen von 8929 cm³ dar, die 1300 cm³ Blut enthalten [angegeben ist hier die physikalische Dichte des Knochens, nicht die Mineralknochendichte, also der Calciumhydroxylapatit-Gehalt des Knochens, der in der medizinischen Osteodensitometrie als Knochendichte üblicherweise bestimmt wird]
- 1 cm³ Knochen enthält damit ca. 0,15 cm³ Blut

Anm. ¹⁾ Die Dichte historischen Knochens weicht aufgrund der Auswirkungen der diagenetischen Prozesse davon erheblich ab. Hammerl et al. (1991) und Hammerl (1996) konnten hier Werte von durchschnittlich 0,9 g/cm³ messen.

Legt man das ermittelte Blutvolumen im Knochen zugrunde, und geht von den in der klinischen Forschung nachgewiesenen 140-160 pg E2/ml Serum aus, muss für positive Nachweise aus Knochenmaterial vorausgesetzt werden, dass mindestens die organische Phase des Knochens ähnliche oder höhere Konzentrationen als das Serum enthält.

Untersuchungsstrategie

Unter Rückgriff auf etablierte Extraktionsmethoden aus der Lebensmittelchemie (Substrat: Fleisch) soll zunächst die Extraktion auf rezenten Knochen angepasst werden, da im rezenten Knochen indigenes Estradiol auf jeden Fall nachweisbar sein sollte.

Als Messtechnik soll die GC/MS eingesetzt werden, die sich in den Vorversuchen von Wischmann et al. (2000) als geeignet erwiesen hat. Anschließend werden die erarbeiteten Protokolle auf historischen Knochen angewendet bzw. umgesetzt. Gegebenfalls kommen Untersuchungen mit Radioimmunoassays und HPLC zur Validierung zum Einsatz.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1 Rezente menschliche Knochen zur Etablierung der Methode

Zur Etablierung der Methode wurde auf Sektionsknochen (im Folgenden „rezipienter Knochen“) zurückgegriffen. Die genaue Aufstellung der Proben befindet sich im Anhang unter 8.3.

Das Knochengewebe aus Sektionen sollte, mit Ausnahme der unmittelbar nach dem Tod durch enzymatische bzw. autolytische Prozesse ab- oder umgebauten Anteile der Hormone, möglichst authentisch die Konzentrationen *in vivo* widerspiegeln. Zur Konservierung wurden die rezenten Knochenproben nach Entnahme bei -20°C tiefgefroren gelagert und erst unmittelbar vor der Bearbeitung aufgetaut.

Die begrenzte Anzahl von Sektionen sowie das notwendige Einverständnis in die Entnahme von Gewebeproben durch die Verstorbenen selbst bzw. deren Angehörige vermindert die zahlenmäßige Auswahl von Proben erheblich. Daher wurde Probenmaterial aus mehreren rechtsmedizinischen Instituten und Pathologien gesammelt.

Die Entnahme erfolgte ausschließlich durch Mitarbeiter der betreffenden Institute. Die Knochenstücke wurden, so weit möglich, standardisiert in zentraler Position aus der anterioren Femurdiaphyse entnommen (Ausnahmen, die andere Skelettelemente betreffen, sind in der Probenliste unter 8.3 vermerkt). Die Stücke umfassten minimal 3 und maximal 10 cm in der Länge und ca. 2 cm in der Breite. Ausnahmen davon bildeten die Knochen der Kinder und Säuglinge bzw. Föten, die erheblich kleinere Ausmaße aufweisen als Skelettelemente adulter Individuen. Hier wurden zum Ausgleich z.T. komplette Femora entnommen, um für eine Analyse ausreichende Gewebemengen zu gewinnen. Auch von zwei adulten Individuen konnten vollständige Femora gewonnen werden, deren Diaphysen bei materialintensiven Testreihen während der Methodenetablierung verwendet wurden. Außerdem wurde in einem Fall aus der Diaphyse entnommenes Knochenmark eines solchen Individuums zu Vergleichsmessungen herangezogen (Individuum W65KM). Eine einzelne Knochenprobe stammt von einer vier Jahre bodengelagerten Leiche.

Rezente Knochenproben wurden ausschließlich von Verstorbenen entnommen, die nachweislich nicht mit HIV oder Hepatitis infiziert waren; auch solche Individuen, die an anderen infektiösen Krankheiten verstorben waren, wurden nicht beprobt.

So weit wie möglich wurde Einblick in die Anamnese der beprobten Individuen genommen, sowie die eigentlich zum Tode führende Ursache erfasst (vgl. 8.3). Somit war es möglich,

einige Proben von Individuen auszuschließen, die an Krankheiten litten, die erheblichen Einfluss auf den Hormonstoffwechsel und damit auf die im Knochen zu erwartenden Konzentrationen der Hormone haben. Im Einzelfall war das nicht zu realisieren, wenn die Krankengeschichte oder damit verbundene Dauermedikationen der Individuen gar nicht (rechtsmedizinische Fälle) oder nur sehr fragmentarisch bekannt waren. Das betrifft vor allem weibliche Individuen nach der Menopause, deren Hormonsubstitutionstherapien nicht bekannt, aber medizinisch zu erwarten waren. Aufgrund der beschränkten Probenzahlen musste auch auf Gewebe von Individuen mit Krebserkrankungen zurückgegriffen werden, die zuvor eine Chemotherapie erhalten hatten. Inwiefern verschiedene Methoden der Chemotherapie, die den Hormonstoffwechsel beeinflussen, auf die im Knochen befindlichen Hormonkonzentrationen direkten Einfluss haben, ist weitgehend unbekannt.

3.1.2 Historische menschliche Knochen

Für die vorliegende Arbeit wurden historische menschliche Knochenproben verschiedener Herkunft verwendet. Diese wurden zum größten Teil ausgewählt, weil sie in bereits abgeschlossenen oder laufenden Projekten der Historischen Anthropologie mit etablierten Methoden der DNA- und Spurenelement-Analytik untersucht worden waren und so Vergleichsdaten zu den Hormon-Untersuchungen vorlagen. Darüber hinaus lagen von den meisten Individuen in diesem Zusammenhang Individualdaten zu Geschlecht und Alter vor. Eine detaillierte Liste der verwendeten Knochenproben ist im Anhang beigefügt (Tab. 8.3.C).

Goslar (Hinter den Brüdern)

Im Jahr 1981 wurden im Zuge von Neubauarbeiten an der Stelle des ehemaligen Brüdernklosters in Goslar die Reste dieses Franziskanerklosters archäologisch dokumentiert. Im Rahmen des Projektes „Metallerzhütten und Verhüttungsverfahren des Goslarer Montanwesens“ in Kooperation des Niedersächsischen Landesverwaltungsamtes, Institut für Denkmalpflege und dem Deutschen Bergbau-Museum schlossen sich zahlreiche Untersuchungen an, zu denen 1993 auch die Freilegung des Klosterfriedhofes mit mehr als 100 Bestattungen zählte (vgl. Abb. 3.1.2A; Klappauf 1996). Es handelt sich um Bestattungen aus dem ausgehenden 18. Jahrhundert. Auf dem Klosterfriedhof wurden zu dieser Zeit vorwiegend Bewohner des Goslarer Frankenbergviertels bestattet, das als bevorzugte Wohnstätte der Hüttenleute und Waldarbeiter galt.

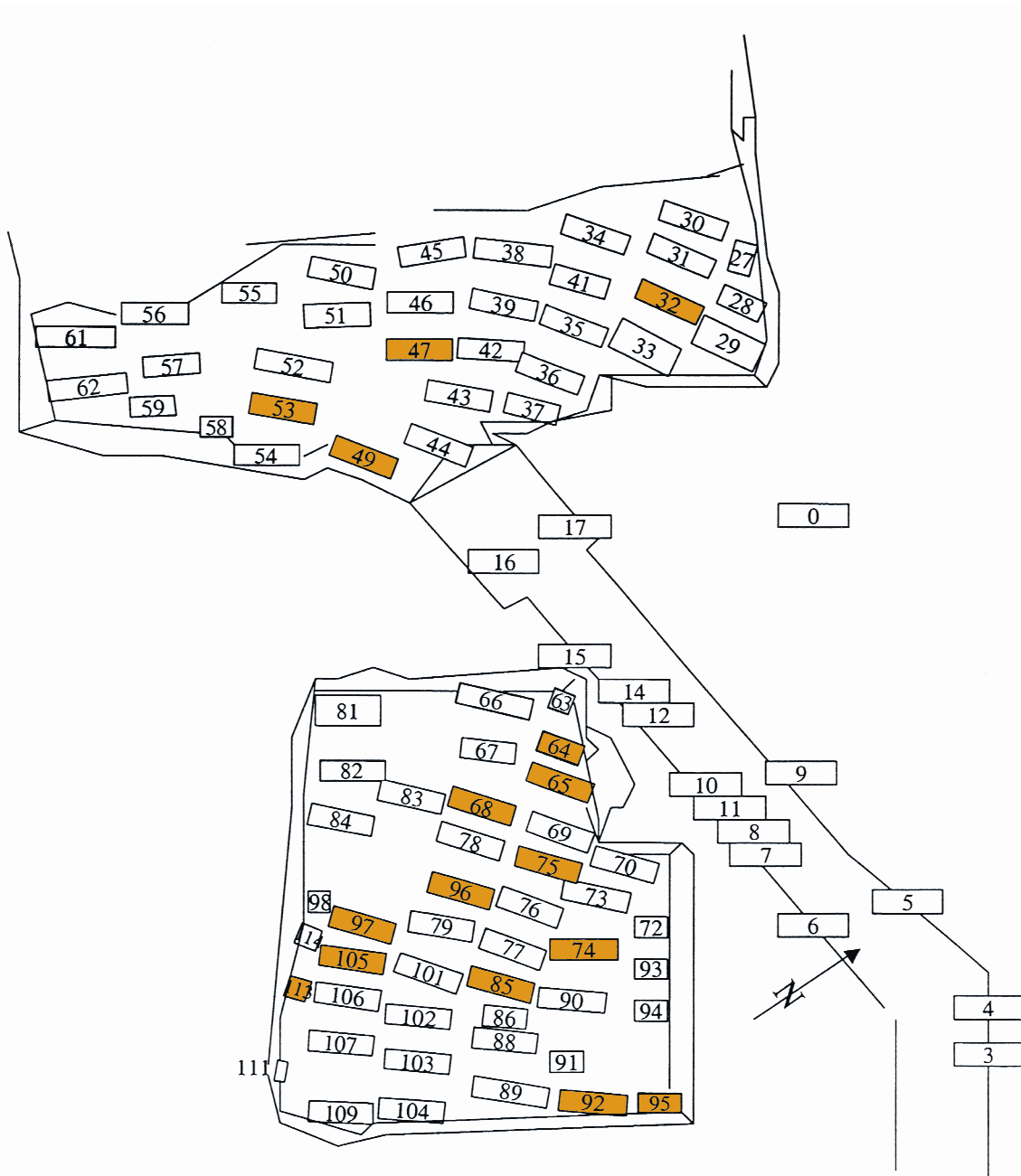


Abb. 3.1.2.A Skizze der archäologischen Ausgrabungsfläche „Hinter den Brüdern“ in Goslar. Eingezeichnet sind die ergrabenen Bestattungen, gelb markiert die Individuen, deren Knochen in dieser Arbeit untersucht wurden.

Anhand der geborgenen Skelette wurden in der Historischen Anthropologie zahlreiche Untersuchungen zur Struktur dieser Bevölkerung durchgeführt (z. B. Schutkowski et al. 2000a und 2000b). Dazu zählte auch eine Untersuchung der genetischen Variabilität der Bevölkerung (Bramanti 1999, Bramanti und Hummel 2000). Dieser Untersuchung wurden u.a. die Daten zur molekularen Geschlechtsbestimmung entnommen (vgl. Tab. 8.3.C). In der Studie wurden Variabilitäten von neun autosomalen STR-Genorten untersucht und dazu in einer Multiplex-PCR amplifiziert. Die von Bramanti (1999) im Detail wiedergegebenen

Amplifikationserfolge lassen einen direkten Rückschluß auf die Erhaltung der aDNA in den Knochen zu (ergänzt durch pers. Mitt. von S. Hummel, 2004). Die Erhaltung der DNA wird in Kap. 4.3.2 mit den Ergebnissen der Analysen dieser Arbeit verglichen, ebenso wie die Beurteilung der histologischen Dünnschliffpräparate, die im Rahmen der o. g. Projekte angefertigt wurden (vgl. 3.2.1.2 Histologie). Die histologische Altersbestimmung wurde nach der Methode von Hummel et al. (unveröff.) durchgeführt.

Dorste (Lichtensteinhöhle)

Der fundtragende Bereich der seit 1972 bekannten Klufthöhle im Lichtenstein (Osterode/Harz) wurde 1980 entdeckt. Bis zu diesem Zeitpunkt blieb dieser Teil der sogen. Lichtensteinhöhle unbeeinflusst durch menschliche Nutzung (Flindt 1996). Aufgrund der gefundenen Bronzen konnte die Höhle in die Urnenfelderzeit datiert und kulturell der thüringischen Unstrut-Gruppe zugeordnet werden. Die Knochenfunde haben demzufolge ein Alter von ca. 3000 Jahren (Flindt 1998). Die Höhle ist aus mehreren kleinen Kammern aufgebaut, die miteinander verbunden sind (Abb. 3.2.1.B). In den Kammern des Berndsaals, der Reinhardsgrotte, der Fiddi-Kluft, der Horstspalte und der Grabkammer wurden menschliche Knochen gefunden.

Aufgrund in die Höhle eingetretenem gipsgesättigten Sickerwassers wies die Sedimentoberfläche mit den Knochenfunden eine mehrere Millimeter bis Zentimeter starke Gipssinterschicht auf, die durch die Verdunstung des Wassers zurückbleibt (Kempe und Vladi 1988). Die Temperaturen in der Höhle lagen in den letzten 3000 Jahren vermutlich konstant bei ca. 6-8°C (Flindt 1996). Beide Umstände trugen wesentlich zum guten Erhaltungszustand der Knochen bei. Schultes (2000) berichtet, daß mehr als zwei Drittel aller Skelettelemente nahezu vollständig intakt geborgen werden. Die anderen wiesen einen leichten bis starken Fragmentierungsgrad auf. Vor allem der aufgelagerte Gipssinter stellt einen Schutz vor dekompositorischen Ereignissen am Knochen dar. Dieser äußert sich sowohl in der gut erhaltenen Makro- als auch Mikrostruktur des Knochengewebes. Knochen aus der Höhle ohne Gypsummantelung weisen tendenziell einen höheren Dekompositionsgrad auf (Herrmann 1988). Schultes (2000) betont, daß die Gipssinterschicht zusätzlich einen effektiven Schutz gegen Kontaminationen durch DNA rezenter Herkunft, die nachträglich von den Ausgräbern auf die Knochen gelangt sein könnte, bietet. Der gute (mikro-)morphologische und molekularbiologische Erhaltungszustand ist entscheidend für die Verwendung der Proben in dieser Untersuchung.

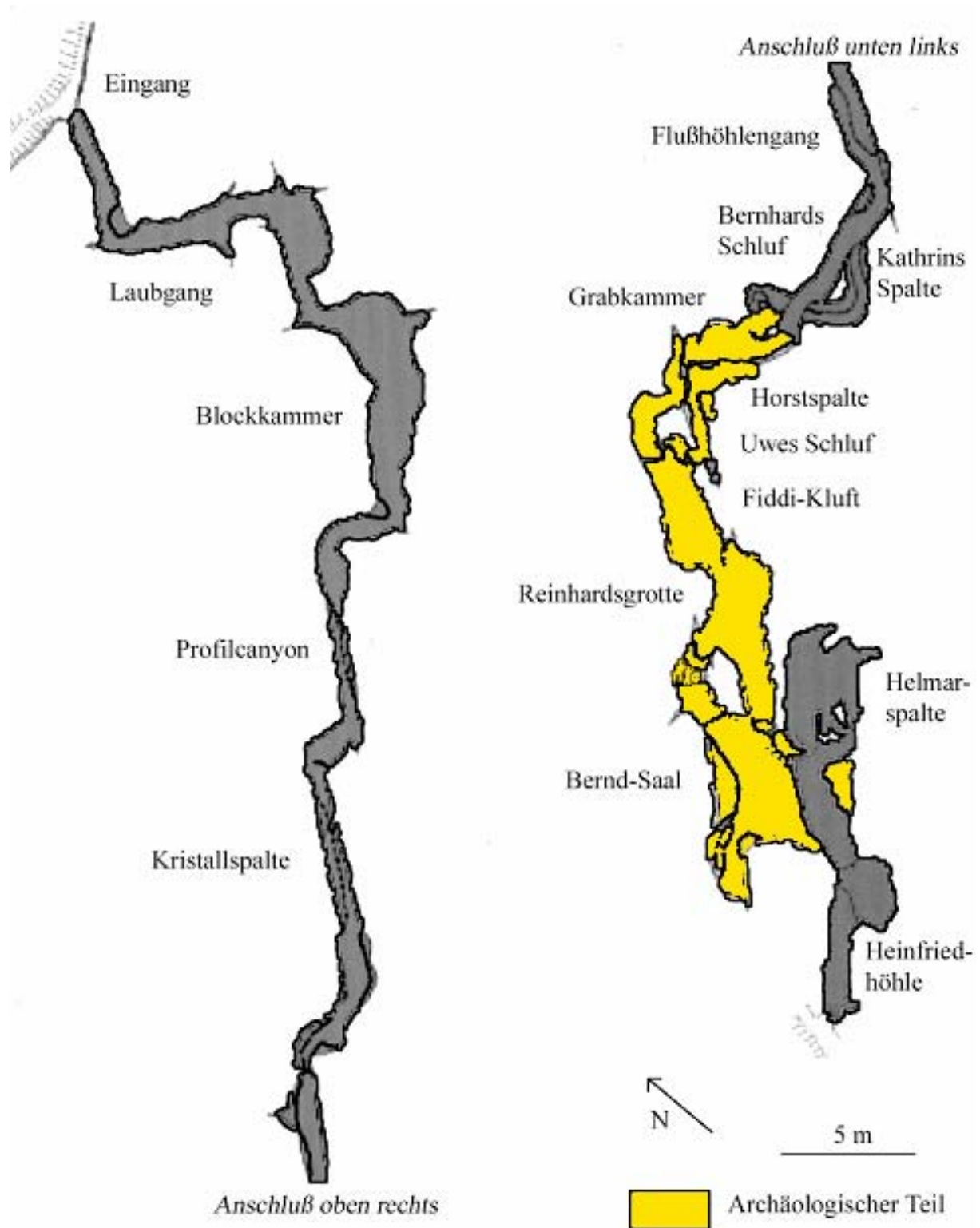


Abb. 3.1.2.B Grundriß der Lichtensteinhöhle (aus Schultes 2000, nach Flindt und Leiber 1998).

Die in dieser Arbeit herangezogenen histologischen Dünnschliffpräparate wurden im Rahmen des Projektes von Schultes (2000) angefertigt (vgl. 3.2.1.2 Histologie) und beurteilt.

Die Einschätzungen zur Erhaltung der aDNA entstammen ebenfalls der Arbeit von Schultes (2000) und Anschlußarbeiten von F. Schilz (2004, pers. Mitt.); ebenso die molekularen Geschlechtsbestimmungen, die von Schultes (2000), D. Schmidt und F. Schilz (2004, pers. Mitt.) erarbeitet wurden.

Bordesholm (Anna von Brandenburg)

Knochen einer historischen Persönlichkeit standen in einem Fall zur Verfügung. Dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um Knochenreste der während der Schwangerschaft verstorbenen Herzogin Anna von Brandenburg. Aufgrund des Todes während der Schwangerschaft erscheinen diese Knochen besonders interessant für die Analytik der weiblichen Sexualhormone.

Anna von Brandenburg wurde 1487 als Tochter des Kurfürsten Johann Cicero von Brandenburg und der Margarete von Sachsen geboren. Sie war die Schwester des Kurfürsten Joachim von Brandenburg. Sie hinterließ nur wenige Spuren in zeitgenössischen Dokumenten (Fouquet 2001). Anna heiratete am 10. April 1502 Herzog Friedrich I. von Schleswig-Holstein. Am 17. August 1503 bekam Anna mit sechzehn Jahren ihr erstes Kind, den Sohn Christian, später König Christian III. von Dänemark; am 1. August 1504 wurde ihr ein zweites Kind geboren, die Tochter Dorothea, die 1526 Herzog Albrecht von Preußen heiratete (Andresen 1930). Nach den beiden Schwangerschaften in Annas noch recht jungem Alter und dem ungewöhnlich kurzen Geburtenintervall von nur 11,5 Monaten wurde ihr Gesundheitszustand der Überlieferung nach sehr schlecht, sie war über Jahre hinweg kränklich. Der Zeit und ihrem Stand entsprechend wurde sie von ihrem Ehemann wohl nicht geschont und sollte weitere Kinder zur Welt bringen. Im Jahr 1513 ging es ihr offenbar wieder gesundheitlich besser, und Ende des Jahres wurde sie erneut schwanger. Dieses gesundheitliche Glück war nur von kurzer Dauer, in der Folge ist sie am 3. Mai 1514 wahrscheinlich in der 28. Schwangerschaftswoche an „Unterleibskrämpfen“ in Gottdorf bei Schleswig verstorben.

Bekannt wurde Anna vor allem durch den außergewöhnlichen Bronzekenotaphen in der Kirche der Augustiner Chorherrn zu Bordesholm, den Friedrich I. zum Gedächtnis seiner Frau errichten ließ (Völkel 1973). Bestattet wurde Anna in einem ausgemauerten Grabgewölbe zwischen den beiden westlichen Pfeilern im Mittelschiff der Kirche (Abb. 3.2.1.C). Der Kenotaph wurde ursprünglich über dem Grabgewölbe platziert, wechselte danach mehrfach den Platz in der Kirche (Kähler 1996).

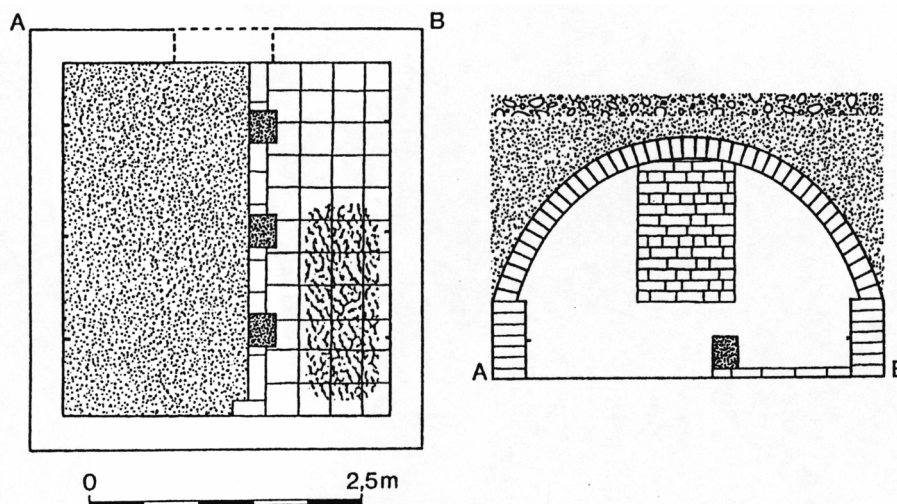


Abb. 3.1.2.C Gemauerte Gruft der Herzogin Anna von Brandenburg im Mittelschiff der Klosterkirche zu Bordesholm. Nach dem Stand von 1966 aus Bauch (1997). Grablage auf dem Ziegelstein-Boden auf Seite B der Gruft.

Das Grabgewölbe mit den sterblichen Überresten der Anna wurde 1966 bei der letzten umfangreichen Restaurierung der Klosterkirche erstmals untersucht, später bei den Ausgrabungen von 1997 (Bauch 1997, 1998). Das Gewölbe war bereits 1966 in leerem Zustand vorgefunden worden, mit Ausnahme der Überreste des Sarges und der Knochen der Anna auf einem Ziegelfußboden auf einer Seite der Gruft (vgl. Abb. 3.2.1.C). Die Knochen befanden sich bereits zu diesem Zeitpunkt nicht mehr im anatomischen Verband. Erst 1997 wurden die Überreste des Sarges und die Knochen in unverändertem Zustand geborgen (Bauch, pers. Mitt. 2005). Völkel (1973) berichtet über mindestens 16 ausgemauerte Bestattungen in der Kirche, daneben von einer großen Zahl „im Sande“ Bestatteter. Die in Grabkammern und Särgen Bestatteten konnten mittlerweile größtenteils Personen zugeordnet werden (Bauch 1999), die Lokalisation der Grabkammern ist eindeutig, damit auch die Zuordnung der Anna von Brandenburg.

In der Historischen Anthropologie wurden die in der betreffenden Gruft geborgenen Knochen, die der Anna von Brandenburg zuzuordnen sind, zunächst morphologisch untersucht. Es handelt sich dabei um Knochen einer weiblichen erwachsenen Person (ursprünglicher Fundname: BO 9), darunter Mittelfußknochen (Abb. 3.2.1.D), sowie Knochen eines Fötus (ca. 38-39 cm Körperhöhe, korrespondierend zur 28. SSW). Vorläufig durchgeführte Verwandtschaftsanalysen mit Hilfe der aus den Objekten extrahierten DNA konnten eine Mutter-Kind-Beziehung der Individuen noch nicht eindeutig belegen, aber auch nicht ausschließen (pers. Mitt. S. Hummel).



Abb. 3.1.2.D Proximales Ende eines der beiden Ossa metatarsalia von BO 9. Größe entspricht der Anteils, der homogenisiert und in den chemischen Aufschluss eingesetzt wurde.



Abb. 3.1.2.E Vergleich der beiden Ossa metatarsalia von BO 9. Man beachte den an der Färbung der Knochen zu erkennenden unterschiedlichen Erhaltungszustand (vgl. Kap. 5.1.5) Oben Knochen BO0001, unten Knochen BO0002.

3.1.3 Material für Validierungsexperimente

Rezente menschliche Blutproben (Leichenblut)

Von einigen wenigen Individuen konnte neben Knochenproben auch Leichenblut gewonnen werden. Da Blut ein in der klinischen Praxis etabliertes Gewebe für den Nachweis von Estradiol ist, erscheint es als bevorzugtes Vergleichsgewebe (s. Kap. 4.4.1). Eine Übersicht der Proben gibt Tab. 8.3.B im Anhang wieder.

Das Blut wurde einen bis mehrere Tage nach dem Tod der Individuen entnommen und in Kunststoffröhrchen überführt, die innen mit Tetracyclinen beschichtet sind, um mikrobielles Wachstum zu unterbinden. Die Lagerung des Leichenblutes erfolgte bei 4° C im Kühlschrank.

Tierexperimentelles Material (Rattenknochen)

Für einzelne Fragestellungen der Validierung wurden Tierexperimente durchgeführt (s. Kap. 3.2.1.3 und 4.4.2). Für die Experimente kamen Laborratten zum Einsatz (Wistar-Auszuchtratten, ca. 6 Monate alt, männlich). Die Tierexperimente wurden vollständig in der Abteilung für Klinische und Experimentelle Endokrinologie der Universitäts-Frauenklinik Göttingen und mit Unterstützung des zuständigen Personals durchgeführt. Sie waren im Rahmen eines Projektes dieser Abteilung ordnungsgemäß genehmigt. Die Tiere wurden von dafür autorisierten Mitarbeitern der Abteilung getötet und anschließend gemeinsam sezirt. Allen Tieren wurden jeweils beide Humeri und beide Femora entnommen und tiefgefroren. Eine Übersicht der Proben gibt Tab. 8.3.D im Anhang wieder.

Knochenasche

Als Negativkontrollen wurden Proben von Knochenasche mitgeführt. Die Veraschung von Knochenproben kann als vollständige Reduktion der Knochen auf die anorganische Matrix, d. h. die mineralischen Komponenten, angesehen werden. Für Spurenelementanalytische Untersuchungen, wie z. B. von Fabig (2002) durchgeführt, ist die standardisierte Veraschung der Knochen notwendig. In dieser Untersuchung diente Knochenasche lediglich als Negativ- oder Nullkontrolle (mit einer gegenüber Negativkontrollen mit reinem Lösungsmittelanteil enthaltenen Matrix, vgl. 3.2.1.3). Für die Untersuchung wurde Knochenasche eines rezenten Knochens herangezogen (Individuum A01, männlich, 67 Jahre), sowie Knochenaschen mehrerer rezenter Knochen, die gepoolt und anschließend aliquotiert wurden (Individuum A02).

Experimentell veraschte Knochen wurden Leichenbrand als Negativkontrollen vorgezogen, da bei Leichenbrand eine Kontamination mit Mikroorganismen aus dem Boden oder der Lagerungsumgebung nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann.

Bodenproben

Bodenproben für ein Pilotexperiment wurden an zwei Stellen in der Umgebung des Institutes, Göttingen, Bürgerstr. 50, entnommen. Dabei handelte es sich nicht um anstehenden Boden, der auch nicht bodenkundlich klassifizierbar war. Nach Abtragung einer ca. 10 cm starken Oberflächenschicht wurden unter Vermeidung von Pflanzenteilen ca. 200 g Boden entnommen, der homogenisiert und auf sechs Aliquots aufgeteilt wurde.

Für nachgeordnete Untersuchungen (vgl. Kap. 3.2.1.3 und 4.4.3) wurden Bodenproben aus standardisierten Entnahmestellen gewählt, die verschiedenen Bodentypen entsprechen. Die Bodenproben wurden bereits für ein vorangegangenes Projekt am Institut ausgewählt Schmerer (2000). Sie wurden vom Institut für Bodenwissenschaften der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt und in der Region Göttingens auf Untersuchungsflächen des Institutes gesammelt. Die Bodenproben wurden bei der Entnahme in Ober- und Unterboden getrennt, mit Ausnahme des Sandbodens, der nicht stratifizierbar ist. Die Böden wurden ebenfalls homogenisiert und anschließend in kleinere Mengen aufgeteilt. Eine Übersicht der Proben und der Eigenschaften der Böden gibt Tab. 8.3.E im Anhang wieder.

Pflanzenproben

Zur Abschätzung von unspezifischen Reaktionen des im RIA verwendeten Antikörpers wurden Extrakte verschiedener Pflanzensamen und Samenmischungen getestet (vgl. Kap. 3.2.1.3 und 4.4.4).

Roggen aus biologischem Anbau (*Secale cereale*, Ernte 2001) wurde vom Reinshof bei Göttingen erworben, einem Versuchsgut der Universität Göttingen. Rotklee-Samen (*Trifolium pratense*, Spinnrad®, Artikel-Nr. 2263754) und Soja (*Glycine max*, Hensel Bio-Gelbe Sojabohnen) wurden im Reformhaus erworben. Sklerotien des Mutterkorn-Pilzes (*Claviceps purpurea*, aus *Triticale secale*), Ernte 2001, wurden von Prof. Dr. Rolf Rauber, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Göttingen, zur Verfügung gestellt.

Die für die Mischung von Ackerunkraut-Samen notwendigen Proben stammen aus dem Neuen Botanischen Garten der Universität, Göttingen: *Vicia sativa* (Saatwicke), *Lolium temulentum* (Taumellolch), *Agrostemma githago* (Kornrade), *Trigonella foenum-graecum*

(Bockshornklee), *Centaurea cyanus* (Kornblume), *Delphinium consolida* (Rittersporn), *Chenopodium album* (Weißer Gänsefuß), *Fallopia* spec. ([Wiesen-]Knöterich), *Melilotus officinalis* (Echter Steinklee), alle Ernte 2001.

Eine detaillierte Übersicht der Proben gibt Tab. 8.3.F im Anhang wieder.

3.2 Methoden

3.2.1 Probenvorbereitung

Bei allen Lagerungs- und Bearbeitungsschritten wurde darauf geachtet, das Probenmaterial, insbesondere Knochengewebe, nicht mit Kunststoffen in Berührung zu bringen, um eine Kontamination mit Weichmachern in Hinblick auf die abschließende GC/MS-Analytik zu vermeiden.

Zur Vermeidung der Kontamination der Probenmaterialien mit z.B. Hautfetten, wurden bei allen Manipulationsschritten Einweghandschuhe aus Latex getragen, bei gleichzeitigem Kontakt mit Lösemitteln Baumwollhandschuhe. Zum Selbstschutz, z. B. gegen mögliches infektiöses Material in den rezenten Knochen- oder Blutproben, wurden während der Probenvorbereitung zusätzlich stets Laborkittel, Mundschutz und Schutzbrille getragen.

3.2.1.1 Vorbereitung der rezenten menschlichen Knochenproben

Mechanische Vorbehandlung

Die zur Konservierung bei -20°C tiefgefrorenen Rezentknochen wurden erst unmittelbar vor der Bearbeitung aus der Tiefkühlung entnommen, da sich die Knochen im gefrorenen Zustand wesentlich einfacher bearbeiten ließen.

Über 5 cm lange Teile von Femurdiaphysen oder ganze Femora wurden zunächst mit einer Bandsäge (Black & Decker DN330) in etwa 5 cm lange Stücke zerteilt, die Meta-, Epi- und Apophysen verworfen. Alle anschließenden Feinarbeiten wurden mit Hilfe einer Dentalsäge (KaVo K-10) mit Diamanttrennscheibe (Horico) durchgeführt. Noch in vollem Durchmesser befindliche Knochen wurden in der Längsachse mehrfach geteilt (resultierende Stückgrößen ca. 2×5 cm, longitudinal \times transversal), die Bereiche der Linea aspera verworfen. Anhaftende Weichgewebereste auf der periostalen Seite wurden, ebenso wie Knochenmark auf der Markhöhleseite, mittels Messern, Skalpellen und Löffeln entfernt. In den Markhöhlen wurden auch spongiöse Knochenanteile entfernt, anschließend Reste von Knochenmark mit Hilfe von Zahnbürsten soweit wie möglich beseitigt, ggf. durch oberflächliches Spülen mit isotonischer Kochsalzlösung unterstützt.

Gefriertrocknung

Im Anschluss an die mechanische Vorbehandlung wurden die Knochen wieder tiefgefroren, um die folgende Gefriertrocknung zu optimieren. Um den rezenten Knochen möglichst viel Feuchte zu entziehen, wurde eine Gefriertrocknung vorgenommen (Gefriertrocknungsanlage Christ Alpha 1-4). Durch das Einbringen bereits gefrorenen Knochens in die vorgekühlte Anlage läuft die Einfrierphase der Trocknung beschleunigt ab. Vorhandene Lösungen kühlen soweit ab, bis das Wasser vollständig auskristallisiert. Beim Übergang zur Haupttrocknung unter vermindertem Druck sublimieren die in der Einfrierphase entstandenen Eiskristalle, wobei durch die dann beheizte Stellfläche (nicht mehr als 37° C, um Körpertemperatur nicht zu überschreiten) die dazu nötige Energie zugeführt wird. Während der Endtrocknung sollte Restwasser, das in der Produktmatrix noch vorhanden ist, unter stärkerem Vakuum und erhöhten Temperaturen der Stellflächen entfernt werden.

Durch Vorversuche konnte festgestellt werden, dass die rezenten Knochen durch die Gefriertrocknung 20,5 – 21,0 % ihres Gewichtes verlieren. Fast 20 % Gewichtsverlust waren dabei schon nach 48 Stunden der Trocknungszeit erreicht, so dass die Dauer der Gefriertrocknungen standardmäßig auf 48 Stunden festgelegt wurde. 20 % Gewichtsverlust entsprechen einer für die noch nicht stark zerkleinerten Knochenstücke einer effektiven Trocknung, wenn man von 24-27 % Wasser im menschlichen Knochen ausgeht (Skalak und Chien 1987).

Homogenisation

Die eigentliche Homogenisation der rezenten Knochen erfolgte durch Mahlen der weiterhin tiefgefrorenen Knochen in einer Kugelschwingmühle (Retsch MM2) mit Zirkonium-Mahlbechern und -kugeln, die üblicherweise in der Mineralogie zum Mahlen von Gesteinen eingesetzt wird. Die Knochenstücke wurden dazu mit Hilfe eines Stahlmörseres soweit zerkleinert, dass sie in die Mahlbecher eingefüllt werden konnten. Je nach Festigkeit der Knochen wurde die Mahldauer zwischen 5 und 30 Minuten variiert, um eine grob mehlartige Konsistenz zu erreichen. Zu lange Mahldauern und –geschwindigkeiten wurden vermieden, um eine starke Aufheizung des Mahlgutes zu verhindern. Das Knochenmehl aus mehreren Mahlgängen wurde im Anschluss vermischt und in Einwaagen von ca. 3 g in 10-15 ml Glasröhrchen mit Normschliff und Glasstopfen überführt und wieder bei – 20° C tiefgefroren.

3.2.1.2 Vorbereitung der historischen menschlichen Knochenproben

Entnahme

Die Probenentnahme erfolgte wie bei den rezenten Knochen mit einer Dentalsäge mit Diamanttrennscheibe (vgl. 3.2.1.1). Die Knochenstücke wurden standardisiert aus der Mitte der anterioren Seite der Femur- bzw. Tibiadiaphyse entnommen. Eine Ausnahme bilden die Knochenproben MA0001 und MA0002 (Anna von Brandenburg), wo nur Ossa metatarsalia zur Verfügung standen, die einmal in der Transversalebene halbiert wurden (Einsatz einer Hälfte für die vorliegende Untersuchung). Die Größe der entnommenen Probenstücke von ca. $1-2 \times 3-5$ cm (transversal \times longitudinal) entspricht einer Knochenmasse von 1-10 g. Für die histologischen Präparate wurden von den entnommenen Knochenstücken durch einen transversalen Schnitt Teile von ca. $0,5 \times 1$ cm Größe abgetrennt.

Sollten die Skelettelemente für weitere Beprobung zur Verwendung in DNA-Analysen zur Verfügung stehen, wurde die Beprobung unter den für die DNA-Analytik notwendigen kontaminationsfreien Bedingungen durchgeführt.

Homogenisation

Die Homogenisation der historischen Knochen erfolgte analog zu den rezenten Knochen (vgl. 3.2.1.1) durch Mahlen in einer Kugelschwingmühle (Retsch MM2) mit Zirkonium-Mahlbechern und -kugeln. Die Knochenstücke wurden dazu mit Hilfe eines Stahlmörser soweit zerkleinert, dass sie in die Mahlbecher eingefüllt werden konnten. Je nach Festigkeit der Knochen wurde die Mahldauer zwischen 5 und 10 Minuten variiert, um eine grob mehllartige Konsistenz zu erreichen. Zu lange Mahldauern und -geschwindigkeiten wurden vermieden, um eine starke Aufheizung des Mahlgutes zu verhindern. Das Knochenmehl wurde im Anschluss in Einwaagen von ca. 3 g in 10-15 ml Glasröhrchen mit Normschliff und Glasstopfen überführt und bei -20° C tiefgefroren.

Histologie

Die histologischen Präparate der Skelettserien Goslar (GS) und Dorste/Lichtensteinhöhle (DO) wurden im Rahmen anderer Projekte von technischem Personal (GS: S. Becker) bzw. wissenschaftlichen Hilfskräften (DO: F. Donkor) angefertigt.

Dazu wurden die Knochenstücke jeweils einzeln in kleine Kunststoffgefäße (hierfür haben sich Dosen von Kleinbildfilmen als geeignet erwiesen) in Biodur™ Epoxidharz (100 Gewichtsanteile Harz E12 und 28 Gewichtsanteile Härter E1) eingebettet. Die frisch

eingebetteten Proben wurden vor der Aushärtung in einem Exsikkator unter Verwendung einer Wasserstrahlpumpe eine Stunde entgast und anschließend über drei Tage bei Raumtemperatur ausgehärtet.

Die ausgehärteten Proben-Blöcke wurden mit einer Schneidemaschine in die passende Form zur Montage in einer Innenlochsäge (Leitz® 1600) geschnitten. Mit dieser erfolgte anschließend die Anfertigung von Dünnschnitten (Transversalebene), deren Schnittdicke in Abhängigkeit von der Stabilität des Knochenmaterials zwischen 60 und 100 µm variiert wurde. Für die mikroskopische Begutachtung der Knochenbinnenstruktur sind diese Dünnschnitte mit Eukitt und einem Deckglas auf Objektträgern fixiert worden.

Die Dünnschliffpräparate wurden am Lichtmikroskop (Olympus BH-12) betrachtet und für die histologische Altersbestimmung sowie die Einschätzung der mikrostrukturellen Erhaltung (Einstufung in histologische Erhaltungsklassen) genutzt (vgl. Tab. 8.3.C im Anhang). Bei einer optischen Vergrößerung von $13,2 \times$ (Fotookular $3,3 \times$; Objektiv $4 \times$) wurden auf konventionellem Farbnegativ-Filmmaterial Fotografien angefertigt (vgl. Kap. 4.3.2).

Die Einordnung der Knochen in drei histologische Erhaltungsklassen (1-3) erfolgte für die Individuen aus Goslar im Rahmen früherer Arbeiten von A. Fabig, die Einordnung der Individuen aus Dorste im Rahmen der vorliegenden Arbeit selbst nach den Kriterien von Hedges et al. (1995) aus Fabig (2002).

3.2.1.3 Vorbereitung der Proben für Validierungsexperimente

Rezente menschliche Blutproben (Leichenblut)

Die Leichenblutproben waren aufgrund der langen Lagerungszeit von knapp zwei Jahren bei 4° C nicht mehr für die konventionelle E2-Analytik aus Serum vorzubereiten. Auch in einer Ultrazentrifuge war es nicht möglich, das Serum von den festen Blutbestandteilen abzutrennen. Die Proben wurden daher ohne weitere Vorbehandlung dem chemischen Aufschluss analog zu den rezenten Knochen zugeführt (vgl. 3.2.2).

Tierexperimentelles Material (Rattenknochen)

Bei der Sektion der Ratten wurden allen Tieren jeweils beide Humeri und beide Femora entnommen und tiefgefroren. Die Knochen wurden mit Hilfe von Skalpelln äußerlich vollständig von Weichgeweberesten befreit.

Aus einer Gruppe von 15 Laborratten wurde sieben Tieren vor der Tötung und der unmittelbaren Entnahme der Knochen über 2 Wochen täglich eine Dosis E2 verabreicht, um

festzustellen, ob kurzfristige Erhöhungen der E2-Konzentrationen im Körper sich auf die Messergebnisse im Knochen niederschlagen (Tiere R01-R07). Dazu wurden 2,8 mg 17 β -Estradiol 3-Benzooat in 2,8 ml Ethanol abs. gelöst und 1 ml der Lösung mit 13,3 ml Neutralöl gemischt. 500 μ l dieser Mischung wurden jeder Ratte subkutan injiziert (Endkonzentration pro Injektion 3,5 μ g). Den Kontrolltieren (Individuen R08-R15) wurden 500 μ l der reinen Ethanol/Neutralölmischung injiziert.

In einem Teil der Knochen wurde das Knochenmark belassen (Tab. 8.3.D, Tiere R05-R07 u. R12-R15), bei den restlichen Knochen wurde das Knochenmark mit Hilfe einer Sonde entfernt. Die Knochen wurden anschließend mit einer Einwegspritze mit isotonischer NaCl-Lösung durchgespült, um die Markreste vollständig zu entfernen. Daran anschließend wurden die Knochen analog den rezenten menschlichen Knochen gefriergetrocknet (vgl. 3.2.1.1). Zur Homogenisation in der Kugelschwingmühle (vgl. 3.2.1.1) mussten die Rattenknochen zuvor durch Einlegen in flüssigen Stickstoff tiefgefroren werden, da die Knochen durch ihren hohen Fett- und Collagengehalt bzw. das enthaltene Knochenmark in der Mühle sonst nur eine breiige Konsistenz bekommen hätten, nicht aber vermahlen worden wären. Das Knochenmehl wurde im Anschluss in Einwaagen von ca. 3 g in 10-15 ml Glasröhrchen mit Normschliff und Glasstopfen überführt und – 20° C tiefgefroren.

Ein Teil der Rattenknochen wurde (als Pilotexperiment) in der Klinischen und Experimentellen Endokrinologie von I. Balzer analog vorbereitet. Die Extraktion erfolgte hier durch einfaches Kochen der Knochen, Homogenisation in flüssigem Stickstoff, Extraktion in Ether, und anschließendem direkten Einsatz eines Aliquots eingeeengten Ethers in den RIA.

Knochenasche

Die Reduktion von Knochenmaterial auf seine mineralischen Komponenten erfolgte durch die Veraschung der Probenstücke in einem Muffelofen (Heraeus® KM 260) bei 500° C über 12 h. Die Veraschungsparameter wurden ursprünglich für spurenelementanalytische Untersuchungen standardisiert (Schutkowski 1994). Nach der Veraschung erfolgte die Homogenisierung der Knochenproben in einem Achatmörser. Die Knochenasche wurde im Anschluss in Einwaagen von ca. 3 g in 10-15 ml Glasröhrchen mit Normschliff und Glasstopfen überführt.

Bodenproben

Die bereits nach der Entnahme im Gelände homogenisierten Bodenproben wurden im Labor nochmals in einem Achatmörser homogenisiert und im Anschluss in Einwaagen von ca. 3 g in 10-15 ml Glasröhrchen mit Normschliff und Glasstopfen überführt.

Pflanzenproben

Alle Pflanzensamen, Getreidekörner sowie die Sklerotien des Mutterkorns wurden analog zu den rezenten Knochen zunächst gefriergetrocknet (vgl. 3.2.1.1) und anschließend in der Kugelschwingmühle vermahlen, bis eine grob-pulverige Konsistenz erreicht war. Eine Ausnahme davon bildeten die Rotkleesamen, die auch nach langer Mahldauer und hoher Schwingungszahl der Kugelmühle nicht zu zerkleinern waren. Die sehr widerstandsfähigen, nur wenige mm kleinen Samen mit ovoider, asymmetrischer Form konnten nur mit Hilfe eines Stahlmörser zerquetscht, nicht aber zu Pulver vermahlen werden.

Die Pflanzenproben wurden gemäß Tab. 8.3.F zu Proben zusammengestellt und in Mengen von ca. 3 g in 10-15 ml Glasröhrchen mit Normschliff und Glasstopfen überführt.

3.2.2 Chemischer Aufschluss des Probenmaterials

Exkurs: Reinheitsstandards

Für die Aufbewahrung aller Proben sowie sämtliche Manipulationen während der Extraktionen wurden, mit Ausnahme der im Handel gebrauchsfertig gekauften SPE-Kartuschen, ausschließlich Glaswaren verwendet, um den Eintrag von Weichmachern aus den Kunststoffen in die Analytik zu vermeiden.

Die Glaswaren wurden nach einem standardisierten Reinigungsverfahren in einen „chromatographisch reinen“ Zustand versetzt. Das Reinigungsverfahren umfasste folgende Schritte:

- Inkubation in 5 % Extran®-Lösung über Nacht
- manuelle mechanische Reinigung mit Extran®, um evtl. sichtbare Verunreinigungen zu entfernen
- maschinelle Reinigung mit Laborspülmittel oder Extran® als alkalischem Detergenz
- zwei Spülungen mit Leitungswasser
- Spülung mit Aqua bidest., Trocknung im Trockenschrank oder unter dem Abzug
- optische Kontrolle auf Rückstände

- Spülung mit Aceton p.a., Trocknung unter dem Abzug
- Spülung mit n-Hexan, Merck UniSolv® für die organische Spurenanalyse

Alle Lösungsmittel, die in den Extraktionen und der Aufnahme der Extrakte zur Verwendung kamen, gehörten zu Reinheitsgraden, die für die organische Spurenanalyse oder Rückstandsanalyse ausgewiesen waren. Eine Ausnahme bildete das für den Ansatz von Puffern verwendete Wasser. Hier wurde auf das im eigenen Hause hergestellte Aqua bidest. zurückgegriffen, nachdem sich bei chromatographischer Prüfung keine messbaren Rückstände und damit keine Unterschiede gegenüber der Verwendung von HPLC-Wasser feststellen ließen.

Extraktionsprotokolle

Die Entwicklung eines Extraktionsprotokolls zur Isolierung von E2 stellte den umfangreichsten Teil der experimentellen Arbeit dar. Neben der Berücksichtigung der Polarität von E2 ist bei der Auswahl des verwendeten Lösungsmediums idealer Weise zu erreichen, dass

- eine vollständige Lösung der Steroid-Protein-Bindung erreicht wird ¹⁾
- das E2 quantitativ, möglichst zu 100 %, aus der Matrix gelöst wird und dabei
- andere Steroide und Verunreinigungen in der Matrix zurückbleiben.

Anm. 1) Endogene Steroide sind im Plasma zu 98-99 % an SHBG gebunden. Freie Metabolite kommen in größerem Maße nur während der Schwangerschaft vor (Rosner 1991). SHBG wird konstitutionell im Plasma ausgeschüttet. Nur wenige Hormone haben selbst eine regulatorische Wirkung darauf.

Grundsätzlich wurden zwei Wege verfolgt, deren Grundprotokolle in zahlreichen Faktoren variiert wurden. Mit jeder Variation eines Grundprotokolls erfolgte eine „Erfolgsprüfung“ des neu entwickelten Protokolls mittels GC/MS-Untersuchung des resultierenden Extraktes.

Gemeinsame Struktur beider Grundprotokolle bildet die Kombination einer Flüssig-Fest-Extraktion mit anschließender Aufreinigung des Rohextraktes mittels Festphasenextraktion (SPE). Die Protokolle wurden alle zunächst nur auf rezentes Knochenmaterial angewendet, und erst im Erfolgsfall auf historischen Knochen (und die weiteren Probenmaterialien) übertragen.

a. Flüssig-Fest-Extraktion mit initialer Hydrolyse der Steroide (Puffer-basierte Protokolle)

Das Grundprotokoll unter Anwendung einer Flüssig-Fest-Extraktion im wässrigen Milieu fußt auf Extraktionsprotokollen aus der Lebensmittelchemie, in der die Bestimmung von hormonell wirksamen Stoffen in (Rind-)Fleisch eine der wichtigsten Anwendungen chemischer Analytik darstellt. Dazu wurde das nach § 35 LMBG in den Bekanntmachungen des Bundesgesundheitsamtes veröffentlichte Protokoll (Bundesgesundheitsamt 1989) in den von der Arbeitsgruppe um Steinhart fortentwickelten Formen (Fritsche 1998, Hartwig 1993, Hartwig et al. 1995 und 1997) herangezogen. Anzumerken ist, dass in Hartwig et al. (1995 und 1997) der Schwerpunkt abweichend auf der Analyse der Androgene und Gestagene liegt.

Nach der Homogenisation des Fleisches erfolgt zunächst eine Freisetzung der Steroide aus dem Gewebe durch eine enzymatisch unterstützte Hydrolyse, meist unter Verwendung eines Acetatpuffers und β -Glucuronidase/Arylsulfatase. Nach Inkubation erfolgt im Anschluss eine Extraktion mit Methanol und ein Entfettungsschritt mit n-Hexan. Zur Trennung der Estrogene von den übrigen Hormonsubstanzen erfolgt dann ein Dichlormethan-Extraktionsschritt. Die Dichlormethanphase (als Rohextrakt) wird schließlich zur Trockne eingengt, in MeOH/Wasser aufgenommen und über C18-SPE-Säulen einer Festphasenextraktion unterzogen. In den ursprünglichen Methoden schließen sich weitere SPE-Schritte unter Verwendung von Resin-gefüllten- (z.B. Amberlite XAD-2-) oder Al_2O_3 -Säulen an, um die Steroide weiter in ihre Untergruppen aufzutrennen. Diese Auftrennungsschritte sind bei Anwendung der Protokolle auf Knochen nicht notwendig und wurden daher nicht umgesetzt.

Grundprotokoll Extraktion mit initialer Hydrolyse der Steroide (Protokoll A):

- 3 g Knochenmehl in Glasröhrchen 15 ml mit Glasstopfen einwiegen
- mit 10 ml NaAc-Puffer (0,04 M, pH = 5,2) versetzen
- vortexen
- 2 min Ultraschallbehandlung
- Proben mit 20 μ l β -Glucuronidase (aus *Helix pomatia*)/Arylsulfatase-Stammlösung versetzen
- Inkubation über Nacht bei 37° C (Wärmeschrank auf Schüttler)
- vortexen
- 5 min Zentrifugation bei 4000 u/min (Hettich 30 RF)
- wässrige Phase in 25 ml Spitzkolben überführen, Knochenrückstand verwerfen

- 5 ml MeOH zugeben
- ausschütteln
- 5 ml n-Hexan zugeben
- ausschütteln
- Hexanphase verwerfen
- 5 ml DCM zugeben
- ausschütteln
- MeOH-Wasser-Phase verwerfen
- DCM-Phase zur Trockne einengen (Speedvac, niedrige Temperaturstufe, ca. 30° C)
- Aufnehmen in 2 ml Aqua bidest.
- Übergang zur SPE

Variationen des Grundprotokolls wurden in fast allen Schritten geprüft. Herauszugreifen sind Modifikationen, die über die Variation von Mengenverhältnissen, Inkubationsdauern, Konzentrationen und den Austausch von organischen Lösungsmitteln hinausgehen (farbige Markierung der korrespondierenden Variationspunkte):

Var. A.1: Zusatz von Triethylammoniumsulfat zum NaAc-Puffer (unterstützt die Hydrolyse, Vanluchene und Vandekerckhove 1988)

Var. A.2: Ersatz des NaAc-Puffers durch EDTA-Puffer, 1 M EDTA pH = 8,3; mit und ohne Einsatz von β -Glucuronidase, Inkubationen über 24 und 48 h

Var. A.3: Enzymatischer Aufschluss durch Proteinase K, ca. 750 U/Ansatz, Inkubation 1 h bei 65° C

b. Flüssig-Fest-Extraktion mit organischen Lösemitteln

Als zweite Variante wurde die direkte Extraktion der Steroide, insbesondere des E2, durch Einsatz organischer Lösemittel geprüft. Umfangreiche Voruntersuchungen zur Auswahl geeigneter Lösemittel, mit denen Steroide und einige der chemisch eng verwandten Sterole aus rezentem und historischem Knochen isoliert werden können, hat Wischmann mit Dotierungsexperimenten durchgeführt (Wischmann et al. 1998, 2000). Die höchsten Wiederfindungsraten von Estradiol in Extrakten dotierter Proben wurden mit 96 % unter Verwendung von angesäuertem Methanol erzielt. Mit Methanol war es auch möglich, bei Cholesterol Wiederfindungsraten von 230 % zu erzielen, was die Extraktion nicht unbedeutender Anteile endogener Substanz aus dem Knochen zeigt. Die Entwicklung der

Extraktion mittels organischem Lösemittel baut auf dem Methanol-basierten Protokoll von Wischmann et al. (2000) auf.

Grundprotokoll Extraktion mit organischen Lösemitteln (Protokoll B):

- 2-3 g Knochenmehl in Glasröhrchen 10-15 ml mit Glasstopfen einwiegen
- mit 10 ml MeOH versetzen
- vortexen
- 2 min Ultraschallbehandlung
- über Nacht bei Raumtemperatur schütteln
- vortexen
- 5 min Zentrifugation bei 4000 u/min (Hettich 30 RF)
- MeOH-Phase in 25 ml Spitzkolben überführen, Knochenrückstand verwerfen
- 5 ml n-Hexan zugeben
- ausschütteln
- Hexanphase verwerfen
- MeOH-Phase zur Trockne einengen (Speedvac, mittlere Temperaturstufe, ca. 42° C)
- Aufnehmen in 2 ml Aqua bidest.
- Übergang zur SPE (sofort)

Variationen dieses Grundprotokolls wurden in fast allen verfügbaren Parametern durchgespielt. Als besonders geeignete und hohe Ausbeuten erzielende Variante stellte sich die hier folgende Variante B.1 heraus. Insbesondere wurde hier ein zweiter Schritt zur Entfettung mit n-Hexan eingeführt. Um zu prüfen, dass durch die Entfettung nicht gleichzeitig auch wesentliche Anteile von E2 aus den Extrakten entnommen werden, wurden in einem Stufenexperiment (vgl. 4.1) alle Lösemittelphasen erhalten und einzeln einer Analyse im RIA zugeführt.

Mit Var. B.1 wurden alle Extraktionen, die für Messungen von Proben in den Tabellen in 8.4 gelistet sind, durchgeführt, soweit nicht abweichend vermerkt.

Extraktion mit organischen Lösemitteln (Protokoll B, Var. 1):

- 3 g Knochenmehl in Glasröhrchen 10-15 ml mit Glasstopfen einwiegen
- mit 8 ml MeOH (angesäuert mit 1 % HCl) versetzen
- vortexen
- 48 h bei Raumtemperatur schütteln
- vortexen

- 12 min Zentrifugation bei 4000 u/min (Hettich 30 RF)
- MeOH-Phase in 25 ml Spitzkolben überführen, Knochenrückstand verwerfen
- 7 ml n-Hexan zugeben
- ausschütteln
- Hexanphase verwerfen
- 7 ml n-Hexan zugeben (2. Zugabe)
- ausschütteln
- Hexanphase verwerfen
- MeOH-Phase zur Trockne einengen (Speedvac, niedrige Temperaturstufe, ca. 30° C)
- Aufnehmen in 3 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH = 7,0
- Übergang zur SPE

Festphasenextraktion (SPE)

Die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) kommt in ihrer heutigen Form häufig zur Anwendung, wenn Substanzen mit einer bestimmten Eigenschaft aus einem komplexen Gemisch, meist einer biologischen Matrix, extrahiert werden sollen. Die Verfügbarkeit einer großen Zahl von Sorbentien ermöglicht eine hohe Selektivität, da die zu untersuchende Komponente spezifisch angereichert und von der Säule eluiert werden kann. Die Ergebnisse sind reproduzierbar, weil die SPE auf spezifischen molekularen Interaktionen basiert. Die Handhabung ist mit dem großen kommerziellen Angebot fertig mit Adsorbens gepackter Trennsäulen (Kartuschen) einfach und kann mit unkomplizierten Hilfsmitteln automatisiert werden. Besonders in der Drogenanalytik hat die Methode daher eine weite Verbreitung gefunden (z. B. Gerhards und Szigan 1997). Einen umfassenden Überblick über die Technik, sowie detaillierte Anleitungen und Praxisbeispiele für verschiedenste Analyseerfordernisse geben Thurman und Mills (1998). Anhand der umfangreichen Beschreibungen dort wurden z.B. SPE-Säulen mit unterschiedlichen Adsorbentien und Lösemittel verschiedener Polaritäten auf ihre Eignung getestet, Detailanpassungen wurden u.a. aus Heikkinen et al. (1981) gewonnen.

Die praktische Durchführung der SPE läuft in mehreren Schritten ab. Zunächst wird das Adsorbens auf der Säule konditioniert, um die im trockenen Zustand nicht für die Interaktion mit dem Analyten freien Seitenketten zu aktivieren. Nach der Konditionierung kann eine Äquilibration notwendig sein, bei der die Säule auf das Lösemittel und den PH eingestellt wird, in dem auch die Proben aufgegeben werden. Anschließend wird die Probe auf die Säule

gebracht und mit leichtem Vakuum durchgesaugt. Praktisch wurde hierfür eine Apparatur verwendet, mit deren Hilfe bis zu zwölf Proben parallel bearbeitet werden können (Absaugeinheit für die Probenvorbereitung, Merck). Im vierten Schritt wird die Säule mit Wasser oder einem anderen geeigneten Lösemittel gespült, das selektiv alle Verunreinigungen auswäscht. Nach Trocknung der Säule unter stärkerem Vakuum wird der Analyt mit einem geeigneten Lösemittel eluiert. Eine Übersicht der Schritte zeigt das Schema in Abb. 3.2.2.A.

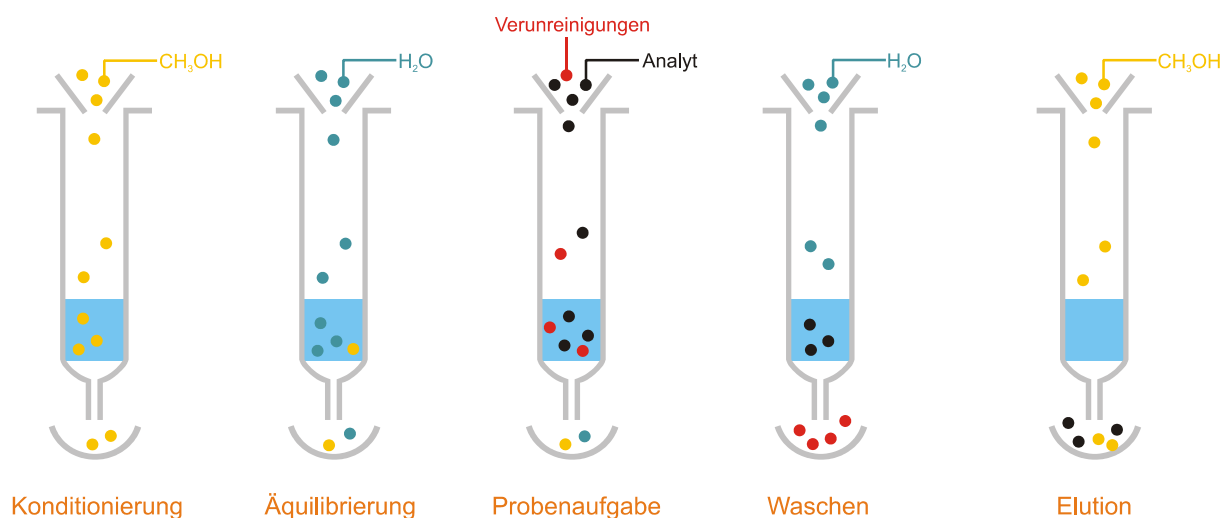


Abb. 3.2.2.A Schematischer Ablauf einer Festphasenextraktion (SPE) über eine gepackte Säule (Kartusche). Adaptiert nach einer Darstellung in einer Broschüre der Fa. Phenomenex

Nach der Festlegung auf C18-Phasen als geeignetes Adsorbens wurden verschiedene vorgefertigte SPE-Säulen mehrerer Hersteller (Merck, Phenomenex, Supelco, Varian) getestet (alle mit C18-Phasen). Als besonders geeignet und außerdem preiswert stellten sich schließlich die 2003 von Phenomenex neu in dem Markt eingeführten „Strata™“-Kartuschen heraus.

Zur Standard-Kartusche für alle folgenden Extraktionen wurde daher die Phenomenex Strata™ C18-E, $4,6 \times 100$ mm (5 ml, 500 mg Adsorbens); Adsorbens: $55 \mu\text{m}$ Partikeldurchmesser, 69 \AA Porengröße, Phase: C18, n-Octadecyltrichlorosilane, Trimethylchlorosilane. Auf diesen Säulentyp wurde das Protokoll der SPE eingestellt.

Protokoll SPE

- Konditionierung der Säulen:
 - Spülen mit 2 ml MeOH
 - $2 \times$ Spülen mit 2 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH = 7,0 (Säulen zwischen und nach den Spülgängen nicht trocken fallen lassen)

- Aufgabe der Proben (in 0,1 M Phosphatpuffer pH = 7,0), Durchlauf durch die Säulen (Säulen nicht trocken fallen lassen)
- 2 × Spülen mit 2 ml Aqua bidest.
- Säule unter Vakuum 10 min trocknen
- 1. Elution mit 1 ml MeOH
- 2. Elution mit 1 ml DCM
- 2. Elution zur Trockne einengen, in der ersten Elution aufnehmen
- Übergang zur GC/MS oder zum RIA

Die Lagerung der fertigen Extrakte erfolgte als Eluat (DCM/MeOH-Gemisch) in Braunglasfläschchen im Kühlschrank bei 4° C.

Ansätze aller für Extraktionen verwendeter Puffer erfolgten nach den Vorschriften in Sambrook et al. (1989).

3.2.3 Analytische Verfahren und Messparameter

3.2.3.1 Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Für die Gaschromatographie/Massenspektrometrie kam eine GC/MS-Gerätekombination von Finnigan MAT zum Einsatz, ein GC-Ofen Typ GCQ mit Temperatur-programmierbarem Injektor GCQ 119418A, sowie ein Ion-Trap Massenspektrometer Typ GCQ mit Edwards SI100 Diffusionspumpe. Die Gerätekombination wurde vollständig über einen angeschlossenen Personal Computer nach Industriestandard über die Software Finnigan MAT GCQ, Version 2.2, gesteuert.

Mit dieser Gerätekombination ist es möglich, über einen großen Massenbereich den Totalionenstrom (TOT) aufzuzeichnen, also die Summe aller Teilchen im Spektrum der vorhandenen Massen (SCAN-Mode). Mit der Analysen-Komponente der Software ist es möglich, an beliebigen Stellen des Chromatogramms (i.e. zu beliebigen Retentionszeiten) das Massenspektrum abzurufen und Substanzen über den Abgleich gegen Spektrenbibliotheken zu identifizieren (verwendete Bibliothek: NIST). Andererseits ist es auch möglich, im Nachhinein Chromatogramme einzelner Massen (oder von Kombinationen einzelner Massen) aus dem Totalionenstrom zu errechnen, also ein Selected-Ion-Monitoring (SIM) rechnerisch nachzuvollziehen (vgl. 3.2.4.1). Allerdings weist das verwendete Massenspektrometer im echten SIM-Modus eine höhere Messempfindlichkeit auf, so dass für Quantifizierungen bekannter Substanzen nur die signifikanten Massen aufgezeichnet werden sollten.

Die Analyse der Extrakte aus rezentem und historischem Knochen erfolgte unter standardisierten chromatographischen Bedingungen, die in Vorarbeiten von Wischmann et al. (2000) entwickelt und auf die Messung von Steroidhormonen adaptiert wurden. Wertvolle Informationen für die Anpassungen der Extraktions- und GC/MS-Techniken wurden der Übersicht von Makin et al. (1995) entnommen.

Chromatographische Materialien und Parameter für die Steroid-Analyse:

- Trennsäule: Fused-Silica Kapillarsäule, 30 m × 0,25 mm ID, 0,25 µm 5 % Phenylpolysiloxan-Beschichtung, Typ Zebron ZB-5, Phenomenex
- Injektion: 1 µl, splitlose Injektion (Schlusszeit des Split-Ventils – 0,10 min, Öffnung 1,00 min), Injektor-Temperatur 260° C, geradliniger Liner, Hochtemperatur-Septen (bleed-frei)
- Temperaturprogramm des GC-Ofens: Starttemperatur 130° C, 1 min 130° C Hold, Temperaturgradient 12° C/min bis 300° C, 5 min 300° C Hold (Gesamtlaufzeit 20,17 min); Transferline-Temperatur 320° C; der Temperaturgradient wurde über die Anpassung der Heizraten variiert, damit ändert sich ggf. auch die Gesamtlaufzeit
- Trägergas: Helium 5.5 (zusätzlich durch Kartuschensystem aufgereinigt, HP High Capacity Gas Purification System), konstante Flussrate 1,2 ml/min
- MS: SCAN-Mode (TOT-Aufzeichnung, Full Scan M 60-500), 0,5 s/Scan, 70 eV Ionisations-Energie

Gelegentlich wurden Proben zusätzlich im SIM-Modus gemessen. Die relevanten Massen sind in Kap. 3.2.4.1 tabelliert.

Die Auswertung der gewonnenen GC/MS-Daten mit Hilfe der GCQ-Software wird in Kap. 3.2.4.1 beschrieben.

Derivatisierung der Proben

Zur Steigerung der Empfindlichkeit und der Spezifität des Nachweises ist es sinnvoll, die Steroide vor dem Einsatz in die GC/MS zu derivatisieren. Derivatisierung wird gezielt so eingesetzt, dass die Molekül- bzw. Fragmentionen des derivatisierten Stoffes im Massenspektrum eine eindeutigere Identifikation gegenüber anderen Stoffen, vor allem aus dem Hintergrund, zulassen, als die Ionen des nicht derivatisierten Stoffes. Für Steroide bietet sich die Herstellung von TMS-(Tri-Methyl-Silyl-) Derivaten an (z.B. Brooks und Middleditch 1973, Sjövall und Axelson 1982). Dabei wird eine -OSi(CH₃)₃-Struktur an die

Steroidmoleküle angehängt, die dadurch 72 Masseneinheiten gewinnen. Vor allem im SIM-Modus lassen sich so Messungen mit geringen Nachweisgrenzen erzielen (Gaskell et al. 1986).

Trimethylsilylierung mit bis-(Trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) mit 1 % Trimethylchlorosilane (TMCS)

- in MeOH gelagerte Proben zur Trockne einengen (Speedvac)
- in 0,2 ml Toluol resuspendieren
- 100 µl BSTFA/TMCS zugeben
- bei 60° C und 400 rpm 50 min inkubieren
- > GC-Messung

3.2.3.2 Radioimmunoassay

Das verwendete Verfahren beruht auf dem Grundprinzip des Radioimmunoassays (RIA), wobei radioaktiv markierte Antigene (Tracer) und nicht radioaktiv markierte Antigene um eine begrenzte Zahl von Antikörperbindungsstellen konkurrieren. Die Menge des Tracers, der an die Antikörper gebunden wird, ist dabei umgekehrt proportional zur Konzentration der Antigene in der Probe. Die Trennung von freiem Antigen und Antigen-Antikörper-Komplex nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichts erfolgt durch Fällung mit Charcoal.

Während bei Radiorezeptorassays (RRA) Rezeptoren jeglicher Art vorliegen können und der konkurrierende Stoff auch ein Rezeptorblocker sein kann, handelt es sich beim RIA im engeren Sinne um eine rein immunochemische Reaktion zwischen Antikörper und Antigen (Tracer bzw. Antigen in der Probe). Eine weitreichende und detaillierte Übersicht über die Technik des RIA gibt Chard (1990).

Der in dieser Arbeit verwendete Assay wurde von M. Metten in der Klinischen und Experimentellen Endokrinologie der Universität Göttingen entwickelt. Dabei kommt ein ebenfalls selbst entwickelter Anti-E2-Antikörper (#22.2) zum Einsatz (vgl. *Eigenschaften des verwendeten Antikörpers*), sowie ¹²⁵I-markiertes E2 als Tracer (16 α-¹²⁵I 17 β-Estradiol, NEX 144, New England Nuclear).

Probenvorbereitung

Die nach der SPE (Kap. 3.2.2) in Braunglasfläschchen in MeOH bei 4° C gelagerten Extrakte werden zunächst im Vakuumkonzentrator zur Trockne eingeengt und anschließend im Assay-

Puffer (0,05 M Phosphat-Puffer pH = 7,2, 8 % w/v NaCl, 1 % w/v Gelatine, 0,350 % Thimerosal) resuspendiert.

Jede zu messende RIA-Probe wird auf ein Endvolumen von 100 µl in Assay-Puffer in Rundbodengläser überführt. Um im Assay die Verdünnbarkeit und damit die von möglichen Matrixeinflüssen aus dem Extrakt freie Funktion des Assays zu gewährleisten bzw. zu prüfen, werden von jedem Extrakt drei unterschiedliche Verdünnungen eingesetzt. Zusätzlich ergibt sich daraus eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass eine der drei Verdünnungen E2-Konzentrationen im linearen Messbereich des Assays besitzt (vgl. Bestimmung der Standardkurve, s. u.). Zur zusätzlichen Absicherung gegen Ausreißer bei der Messung wird jede Verdünnung doppelt eingesetzt. Insgesamt werden damit von einem Extrakt (mindestens) sechs RIA-Proben gemessen. Dazu wird der trockene Extrakt in 250 µl Assay-Puffer resuspendiert; aus der Suspension werden nach gründlichem Vortexen die RIA-Proben nach einem festen Schema verdünnt (Tab. 3.2.3.2.A).

Tab. 3.2.3.2.A Verdünnungsschema für die RIA-Proben (100 µl Endvolumen)

RIA-Probe	Anteil suspendierter Extrakt	Anteil Assay-Puffer
1	50 µl	50 µl
2	50 µl	50 µl
3	25 µl	75 µl
4	25 µl	75 µl
5	10 µl	90 µl ¹⁾
6	10 µl	90 µl ¹⁾

Anm. 1) Aus Gründen der einfacheren Handhabung (Verwendung einer Multipipette für die Verdünnungen) werden in der Praxis 100 µl Assay-Puffer statt der theoretisch korrekten 90 µl Puffer eingesetzt und in der späteren Konzentrationsrechnung berücksichtigt

Von den 250 µl Suspension jedes Extraktes werden für die RIA-Proben auf diese Weise 170 µl verbraucht, so dass für Wiederholungsmessungen noch 80 µl Suspension verbleiben. Aus diesem Rest können nach Beurteilung der ersten Messergebnisse auch andere Verdünnungen hergestellt werden, wenn die Konzentrationen von E2 in den ersten sechs RIA-Proben zu hoch gewesen sein sollten, also nicht in den linearen Messbereich des Assays gefallen sind. In der vorliegenden Arbeit wurden bei sehr hohen Messwerten noch 1:10, 1:20 und 1:100 weiterverdünnte RIA-Proben eingesetzt.

Die in den RIA einzusetzenden Extrakte müssen bei der Suspension in Assay-Puffer frei von groben Verunreinigungen sein, welche die immunochemische Reaktion stören könnten. Alle Extrakte wurden daher einer Sichtprüfung unterzogen; Extrakte mit sichtbarer Trübung

wurden nach Suspension in Assay-Puffer zunächst in 0,5 ml Eppendorf-Cups überführt, bei 14000 rpm zentrifugiert (Eppendorf 4515). Die Trübungen setzten sich dabei an der Oberfläche der Flüssigkeit ab, was darauf hindeutet, dass es sich um Fettrückstände handelt. Die notwendigen Volumina für den Einsatz in den RIA wurden vorsichtig mit einer Eppendorf-Pipette unterhalb der Fettschicht entnommen.

Bestimmung der Standardkurve

Parallel zum Ansatz der zu untersuchenden RIA-Proben wird für den Assay eine Reihe von standardisierten Proben angesetzt, die zur Erstellung einer Standard- oder Eichkurve genutzt werden (für jede einzelne Messreihe notwendig). Die Standardproben werden aus einer Stammlösung E2 mit $C=1 \text{ mg/ml}$ verdünnt. Von insgesamt 40 Teströhrchen (Rundbodengläser) werden vier Röhrchen für „Total Counts“ (TC), drei für eine unspezifische Bindung (UB), drei für eine spezifische Bindung (SB) und je drei für zehn Standardpunkte benutzt. Für die TC-Röhrchen werden 100 μl Tracer und 700 μl Assay-Puffer pipettiert, für die UB-Röhrchen 100 μl Tracer und 200 μl Assay-Puffer, und für die SB-Röhrchen 100 μl Tracer, 100 μl Assay-Puffer und 100 μl Antikörper. Für die Standardpunkte kommt ein festes Pipettierschema zur Anwendung. Zunächst werden drei Vorverdünnungen hergestellt, Verdünnung A aus 10 μl Stammlösung und 990 μl Assay-Puffer. 10 μl aus Verdünnung A und 10 ml Assay-Puffer ergeben Verdünnung B. Für die Verdünnung C werden 100 μl aus Verdünnung B wiederum in 10 ml Assay-Puffer gegeben. Die Endverdünnungen für die Standardpunkte gibt Tab. 3.2.3.2.A wieder. Aus den Endverdünnungen werden pro Standardpunkt $3 \times 100 \mu\text{l}$ eingesetzt.

Tab. 3.2.3.2.B Verdünnungsschema für die Standardpunkte zur Erstellung der Eichkurve des Assays

Standardpunkt	E2-Konzentration	Anteil Vorverdünnung	Anteil Assay-Puffer
1	1 pg/100 μl	100 μl C	900 μl
2	3 pg/100 μl	300 μl C	700 μl
3	5 pg/100 μl	500 μl C	500 μl
4	10 pg/100 μl	1000 μl C	
5	30 pg/100 μl	30 μl B	970 μl
6	50 pg/100 μl	50 μl B	950 μl
7	100 pg/100 μl	100 μl B	900 μl
8	300 pg/100 μl	300 μl B	700 μl
9	500 pg/100 μl	500 μl B	500 μl
10	1000 pg/100 μl	1000 μl B	

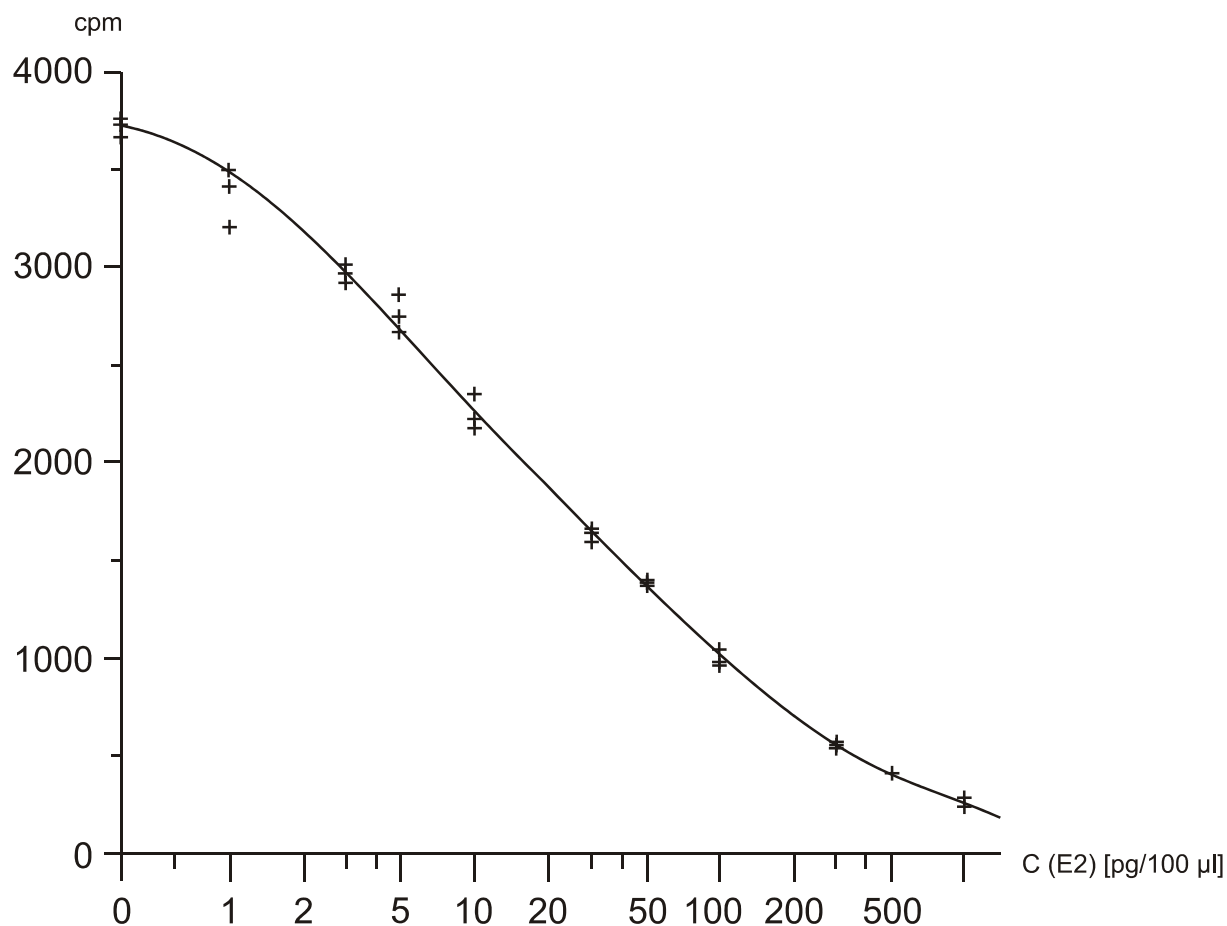


Abb. 3.2.3.2.A Beispiel für eine während einer E2-Messreihe dieser Arbeit erstellte Standardkurve

Assay

Nachdem die RIA-Proben und die Proben für die Standardkurve pipettiert wurden, werden 100 µl 1. Antikörper (Antikörper #22.2) in einer Verdünnung von 1:20000 mit Hilfe einer Multipette zugegeben. Anschließend werden alle Proben geschüttelt und über Nacht bei 4° C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgt die Fällung mit Charcoal im Eisbad. In alle Assay-Röhrchen, mit Ausnahme der TC-Röhrchen, werden mit einem Dilumat 500 µl eiskalte Charcoal zugegeben. Nach 15 Min. Inkubation werden die Röhrchen gevortext und in einer Kühlzentrifuge (Heraeus Cryofuge 5000) bei 3000 rpm 30 Min. zentrifugiert. Nach der Zentrifugation werden die Proben aus den Assay-Röhrchen (Rundbodenglasröhrchen) in vorher nummerierte Zählröhrchen (PS) dekantiert. Abschließend werden alle Zählröhrchen im Gamma-Counter (Typ 1470 Wizard, Wallac) mindestens 1 Min. gemessen und mit Hilfe des RIA-CALC-Programmes (Wallac) ausgewertet.

Das Programm RIA-CALC zieht automatisiert die Ergebnisse der zugehörigen Standardkurve zur Auswertung heran, so dass auf den Ergebnislisten die radioaktiven Counts (cpm) automatisch in die korrespondierenden Konzentrationen von E2 umgerechnet werden.

Eigenschaften des verwendeten Antikörpers #22.2

Der verwendete Anti-E2-Antikörper #22.2 wurde in der Abteilung Klinische und Experimentelle Endokrinologie von M. Metten entwickelt. Der Antikörper wurde durch die Immunisierung von Kaninchen (erstmalig von Beiser et al. 1959 demonstriert) gegen 17 β -Estradiol 17-Hemisuccinat-BSA-Konjugat (5 mg/34 Mol E2 pro Mol BSA in 0,5 % NaCl; 500 μ l) gewonnen. Aus der Struktur des 17 β -Estradiol 17-Hemisuccinats (Abb. 3.2.3.2.B) ergibt sich die Spezifität des Antikörpers auf die Bindung der freien C3-Stellung bzw. des phenolischen Anteils des E2-Moleküls, C1-C5-Ring (Abb. 3.2.3.2.C). Der Einsatz des BSA-Konjugats ist notwendig, weil das bei der Immunisierung verwendete Antigen eine bestimmte Mindestgröße aufweisen muss, die bei reinem E2 oder einem Derivat nicht gegeben ist. Darüber hinaus ist das BSA-Konjugat nicht membrangängig.

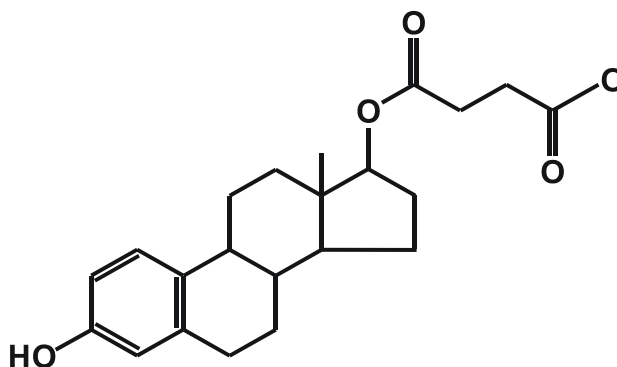


Abb. 3.2.3.2.B Struktur von 17 β -Estradiol 17-Hemisuccinat

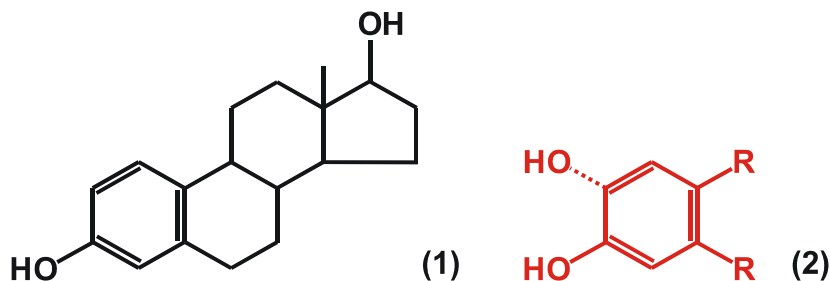


Abb. 3.2.3.2.C Struktur von 17 β -Estradiol (1). Rot herausgezeichnet ist der Anteil des Moleküls, der spezifisch den Antikörper #22.2 bindet, auch mit einer möglichen zweiten OH-Gruppe an C2 (unterbrochene Linie) (2)

Die Spezifität gegenüber verschiedenen in der klinischen Analysepraxis häufig untersuchten Hormonen wurde im Zuge der Antikörperentwicklung geprüft (vgl. Tab. 3.2.3.2.C).

Tab. 3.2.3.2.C Anti-E2-Spezifität des Antikörpers #22.2 (Metten, pers. Mitt.)

Substanz	Spezifität
17 β -Estradiol	100 %
Estron	10 % (bei 50 % der Standardkurve)
Estriol	2 % (bei 50 % der Standardkurve)
Corticosteron	keine Kreuzreaktion
Progesteron	keine Kreuzreaktion
Testosteron	keine Kreuzreaktion

3.2.3.3 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde im Rahmen von Experimenten zur Prüfung der Spezifität des E2-Antikörpers #22.2 (vgl. 3.2.3.2) eingesetzt.

Unter der Voraussetzung, dass der Antikörper #22.2 aufgrund mangelnder Spezifität auch mit anderen Substanzen als E2 aus den Knochenextrakten kreuzreagiert, ist es von großer Bedeutung, abschätzen zu können, ob eine Reaktion in einem bestimmten Extrakt auf der Bindung von E2 oder einer anderen Substanz beruht. Eine solche Abschätzung ist durch den Einsatz einer Auftrennung von Extrakten mittels HPLC vor dem Einsatz in den RIA möglich. Folgender experimenteller Ablauf ist dazu notwendig (vgl. Abb. 3.2.3.3.A):

1. Reines E2 wird in so hoher Konzentration in die HPLC injiziert (Standard 1 mg/ml), dass es im Chromatogramm sichtbar ist und sich die Retentionszeit (RT) einwandfrei feststellen lässt. Das chromatographische System sollte hierzu soweit optimiert werden, dass der E2-Peak eine nahezu ideale Form erreicht, E2 also sauber von möglichen anderen Substanzen getrennt eluiert. Während aller folgenden Läufe wird das Eluat beim Verlassen der Säule mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen, und zwar einige Minuten vor der RT von E2 bis einige Minuten nach der RT von E2. Die gesammelten Fraktionen werden als einzelne Proben in den RIA eingesetzt. Ein E2-Messsignal sollte idealerweise ausschließlich in der zur RT von E2 gesammelten Fraktion auftreten (bzw. in der darauffolgenden Fraktion, da das Fließmittel vom Detektor der HPLC bis zum Fraktionssammler noch eine Wegstrecke zurücklegt (im vorliegenden Fall ca. 30 s).
2. Die HPLC-Trennsäule wird nach dieser Standardmessung gegen eine neue, typgleiche Säule ausgetauscht, um die Verschleppung von E2 in die zu messenden Proben zu vermeiden. Eine Leerkontrolle (Lauf mit reinem Lösemittel) wird durchgeführt.
3. Extrakte von (Knochen-)Proben, die im RIA Messsignale ergeben haben, werden unter den gleichen chromatographischen Bedingungen wie der E2-Standard unter 1. in die HPLC injiziert und die Eluate in Fraktionen gesammelt. Jede gesammelte Fraktion wird

als einzelne Probe in den RIA eingesetzt. Ein E2-Messsignal würde wieder ausschließlich in der zur RT von E2 gesammelten Fraktion auftreten; treten im RIA Messsignale in anderen Fraktionen auf, so deutet dies auf die Kreuzreaktion des Antikörpers mit anderen Substanzen im Extrakt hin.

Um Verschleppungen von Substanzen zwischen Proben zu vermeiden, ist es notwendig, zunächst diejenigen Extrakte in die HPLC zu injizieren, die in den vorangegangenen RIAs die niedrigsten Messwerte aufwiesen. Extrakte mit hohen Messwerten sind in der späteren Folge zu injizieren. Zwischen jedem Lauf ist zusätzlich eine Spülung der HPLC mit Aufnahme einer Leerkontrolle durchzuführen. Eine Verschleppung von E2 oder anderen Substanzen zwischen den Läufen ist während der HPLC-Läufe nicht zu kontrollieren, da die Konzentrationen in den Extrakten so niedrig liegen, dass in den Chromatogrammen der HPLC in der Regel keine Signale (Peaks) zu beobachten sind.

4. Abschließend wird eine zu 1. analoge Positivkontrolle von E2 injiziert, die wiederum als Peak im Chromatogramm sichtbar ist und eine Kontrolle der RT zulässt. Diese sollte sich gegenüber der RT in 1. nicht verändert haben.

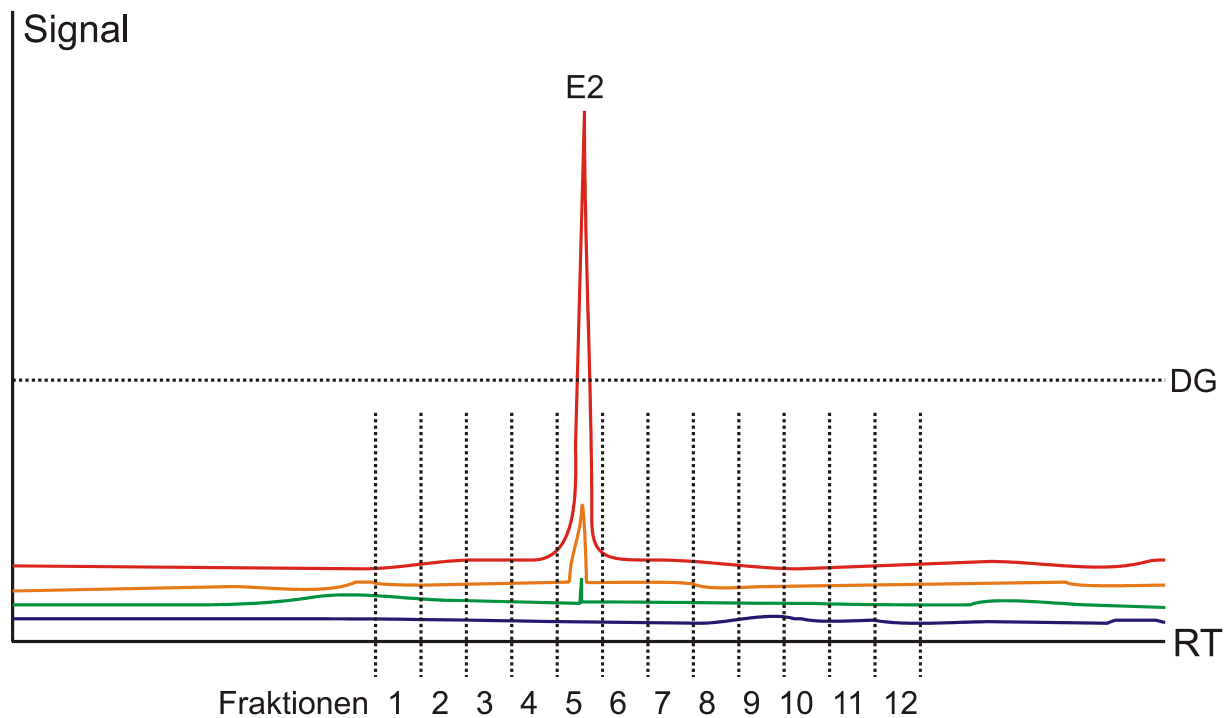


Abb. 3.2.3.3.A Prüfung der Spezifität des E2-Antikörpers, Schema zur Fraktionierung von Extrakten mittels HPLC. Aufgetragen sind die theoretischen Signalintensitäten bei der Detektion von E2 während HPLC-Läufen einer Leerkontrolle (ohne E2, blau), eines Extraktes aus historischem Knochen (grün), eines Extraktes aus rezemtem Knochen (orange) sowie einer E2-Positivkontrolle (reine Substanz, rot). Die gestrichelte Linie gibt die Detektionsgrenze der HPLC an, im realen Chromatogramm ist der E2-Peak also nur im Falle der Positivkontrolle sichtbar. Nicht maßstäblich.

Für die HPLC wurde eine Anlage der Fa. Hewlett-Packard (jetzt Agilent Technologies) eingesetzt. Es handelte sich um ein Modell der Serie 1100, bestehend aus einem Entgaser G1322A, einer Zweikanal-Pumpe G1312A, einem Autosampler/Injektor G1313A, einem Thermostatierten Säulenraum G1316A, und einem Dioden-Array-Detektor G1315A mit Deuterium-/Wolfram-Lampen $\lambda=190-950$ nm. Die Steuerung der Geräte, die Erfassung und die Auswertung der Daten erfolgte Computer-gestützt mit der Software HP Chemstation 1100, Rev. A.06.03 [509]. Die Fraktionen des Eluats wurden mit einem programmierbaren Fraktionssammler Typ FC 203B der Fa. Gilson direkt in Braunglasfläschchen gesammelt.

Chromatographische Bedingungen und Einstellungen des Instruments für die Auftrennung von E2:

- HPLC-Säule: Phenomenex Hypersil ODS 5 μ , C18, 300Å, 250 \times 4,6 mm ID; thermostatiert auf 22° C
- Fließmittel (A): Aqua bidest. (H₂O)
- Eluent (B): Acetonitril (CH₃CN)
- Flussrate: konstant 1,000 ml/min; Maximaldruck 250 bar
- Lösemittelverlauf (Gradienten):
 RT = 0 min – 100 % A, 0 % B
 RT = 5 min – 0 % A, 100 % B
 RT = 20 min – 0 % A, 100 % B
 RT = 22 min – 100 % A, 0 % B
 RT = 30 min – 100 % A, 0 % B, Stop
- Injektion: bei RT 0 min, 100,0 μ l, Aufzugsgeschwindigkeit 200 μ l/min, Injektionsgeschwindigkeit 200 μ l/min
- Detektion: $\lambda=208$ nm, 245 nm, 254 nm, 280 nm; Spektrum: $\lambda=190-400$ nm, Schrittweite 2 nm, Threshold 1,00 mAU
- Integrationseinstellungen: Gerätestandard; C-Kalibrierung: keine, da keine Quantifizierung erfolgt
- Fraktionierung: 1 Fraktion/min, Start: RT = 5 min

Die Fraktionen aus der HPLC (1 ml) wurden abschließend in der Speedvac zur Trockne eingengt, bevor sie in den RIA eingesetzt wurden. Die Trocknung sollte umgehend erfolgen, da E2 in wässrigen Lösungen vermutlich in wenigen Tagen einer nicht zu vernachlässigenden Rate des Abbaus zu Estron oder anderen bisher nicht bekannten Derivaten unterliegt (z.B. Schicksnus und Müller-Goymann 2001).

Analog zu den weiteren RIAs (vgl. 3.2.3.2) wurden die Fraktionen jeweils in 250 µl Assay-Puffer resuspendiert und in Einsätzen von 50 µl, 25 µl und 10 µl verwendet, um die Verdünnbarkeit prüfen zu können.

Die Extrakte aus Knochen, Boden und Pflanzenproben für den Einsatz in die HPLC wurden nach dem Standard-Protokoll B., Var. 1 (vgl. Kap. 3.2.2) angefertigt.

3.2.3.4 Leerkontrollen, Dotierungsexperimente und interne Standards

Leerkontrollen

In allen Phasen der chemischen Analytik wurden Leerkontrollen mitgeführt. Leerkontrollen zeichnen sich durch das Fehlen des Substrates bzw. des Analyten aus. Innerhalb jedes Probenansatzes, d.h. eines Sets von Proben, die gemeinsam oder in zeitlich geschlossener Abfolge untersucht werden, sind mindestens zwei Leerkontrollen notwendig. Bei Arbeiten, die in zeitlicher Abfolge ausgeführt werden, z.B. einer Anzahl aufeinander folgender Messungen mit GC/MS, ist eine Leerkontrolle vor und eine weitere nach der Abfolge der eigentlich zu untersuchenden Proben einzusetzen.

Bei den Leerkontrollen in GC/MS, HPLC und RIA sind die reinen Leerkontrollen (nur Verwendung von Lösemitteln u. Puffern) zu unterscheiden von der Messung leerer Extraktionsansätze. Im Einzelnen wurden folgende Leerkontrollen verwendet:

1. Leere Extraktionsansätze der Flüssig-Fest-Extraktionen, hier nur Lösemittel ohne Substrat; schließen Kontaminationen aus Chemikalien und Laborwaren aus; Überführung in SPE
2. Festphasenextraktionen (SPE), hier Verwendung der reinen Lösemittel ohne Substrat, dazu Verarbeitung der Leerkontrollen aus 1.
3. Leerkontrollen GC/MS, hier Aufgabe reinen Lösemittels (dazu Kontrolle aller im Labor verwendeten Lösemittel auf ihre Reinheit unter chromatographischen Gesichtspunkten); dazu Verarbeitung der Leerkontrollen aus 1., 1.-2. und 2.
4. Leerkontrollen HPLC, hier Aufgabe reinen Lösemittels (dazu Kontrolle des reinen Fließmittels); dazu ggf. Verarbeitung der Leerkontrollen aus 1., 1.-2. und 2.
5. Leerkontrollen RIA, hier Aufgabe reinen Puffers; dazu ggf. Verarbeitung der Leerkontrollen aus 1., 1.-2., 2., 1.-4. und 4.)

Die Messergebnisse der Leerkontrollen sind bis auf einige Ausnahmen nicht dokumentiert, da Probenansätze, bei denen Signale von Verunreinigungen in den Leerkontrollen festgestellt werden konnten, verworfen wurden.

Standards

Die Verwendung von Standards ermöglicht zu prüfen, ob eine chemisch-analytisches Experiment, z.B. eine Extraktion, fehlerfrei funktioniert („Positivkontrolle“). Dazu wird eine definierte Menge eines Standards entweder einer separaten Messung unterzogen (externer Standard) oder direkt zum verarbeiteten Substrat hinzugegeben (interner Standard). Die Wiederfindungsrate des verwendeten Standards gibt Auskunft über mögliche Verluste und damit direkten Rückschluss auf die Funktionalität des Experimentes. In der GC/MS-Analytik werden häufig deuterierte Formen des Analyten selbst als interner Standard verwendet, da sie sich in ihrem chemischen Verhalten während der Prozessierung nicht unterscheiden, aber im MS Molekülfractionen anderer Massen liefern.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kombination aus sieben verschiedenen Steroiden als Mess-Standard für die GC/MS verwendet: 5 α -Androstan-17 β -ol-3-one, 17 β -Estradiol, Testosterone, 5-Pregnen-3 β -ol-20-one, Progesterone, 5 β -Cholestanol und Cholesterol, zu je 20 ng/ μ l in 100 % EtOH. Für die Untersuchung von E2 wurde eine Stammlösung von 17 β -Estradiol, 1 mg/ml in 100 % EtOH, verwendet.

Dotierungen

Einzelne Proben für die GC/MS-Bestimmungen wurden mit den oben beschriebenen Standards unter Solvensverdampfung dotiert bzw. gespiked. Von „Spiking“ spricht man, wenn ein interner Standard einer Probe zugesetzt wird, in der die gleiche Substanz auch als Analyt zu erwarten ist, das Spiking im Idealfall also den Messwert des Analyten um die Menge des Standards erhöht. Diese Vorgehensweise ermöglicht es z.B., Matrixeinflüsse bei Extraktionen oder Messungen in GC/MS, HPLC oder RIA abzuschätzen (z.B. wenn die Matrix freie Substanz bindet). Allerdings ist die Aussagekraft der Methodik stark eingeschränkt durch den Umstand, dass der Zusatz reiner Substanzen zu den Proben nie die eigentliche Bindung der Analyten in der Matrix widerspiegeln kann.

Da für Steroide von Wischmann et al. (1998 u. 2000) umfangreiche Dotierungs- und Spiking-Experimente mit Bestimmung der Wiederfindungsraten durchgeführt wurden, beschränkt sich der Einsatz von Dotierungs- bzw. Spiking-Substanzen in dieser Arbeit auf die qualitative Prüfung der Experimente (unter Verwendung der o.a. Substanzen).

3.2.4 Datenauswertung und statistische Verfahren

3.2.4.1 Auswertung der Chromatogramme und Massenspektren

Chromatogramme und Massenspektren

Die Aufzeichnung und Auswertung der GC/MS-Daten erfolgte mit Hilfe der Software Finnigan MAT GCQ, Version 2.2, die neben Modulen zur Steuerung der Geräte ein entsprechendes Modul zur Bearbeitung der Daten enthält (GC Data Processing).

Die Software stellt die aufgezeichneten Daten als Chromatogramm, also Auftragung der Signalintensitäten gegen die Retentionszeiten (RT) im Totalionenstrom (TOT) dar (sofern die Daten im SCAN-Modus aufgenommen wurden, vgl. Kap. 3.2.3.1). Der TOT umfasst dabei den gesamten Massenbereich, der für die Datenaufnahme aktiviert wurde.

An jeder beliebigen Stelle kann das (sozusagen in der dritten Dimension) dahinter liegende Massenspektrum abgerufen werden, das dann mit Hilfe einer Spektrenbibliothek identifiziert werden kann. Außerdem ist es möglich, die Darstellung des Chromatogramms auf bestimmte ausgewählte Massen zu beschränken, um in einer Art virtuellem Selected-Ion-Modus (SIM) einen schnellen Überblick zu bekommen, ob eine gesuchte Substanz im Chromatogramm durch einen Peak repräsentiert wird. Diese Darstellungstechnik ist auch geeignet, um ein Grundrauschen bzw. einen Hintergrund, der durch Signale anderer Substanzen (z.B. Säulenbluten) hervorgerufen wird, in der Darstellung zu eliminieren.

Identifikation von Substanzen

Die Identifikation der Substanzen erfolgt über den Vergleich des zu einer bestimmten Retentionszeit erfassten Massenspektrums mit standardisierten Massenspektren der reinen Stoffe in einer Spektrenbibliothek. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Bibliothek NIST MS-Library für Finnigan, Vers. 1.15 mit Stand September 1992, eingesetzt. Die in der Bibliothek gespeicherten Spektren der in Kap. 4.2.1 und 4.2.2. dargestellten Substanzen sind in Abb. 3.2.4.1.A grafisch dargestellt, die relevanten Ionenmassen (M^+)¹⁾ der Substanzen sind in Tab. 3.2.4.1.A zusammengefasst.

Tab. 3.2.4.1.A Ionenmassen der in dieser Untersuchung mit Hilfe von GC/MS detektierten Substanzen (nach Bundesgesundheitsamt 1989, NIST 1992)

Substanz	M^+
β -Estradiol	272, 213, 172
bis-TMS-Estradiol	416, 285, 326, 232
Cholesterol	386, 275, 301, 368, 353
Cholesterol-TMS-Ether	458, 368, 329, 353

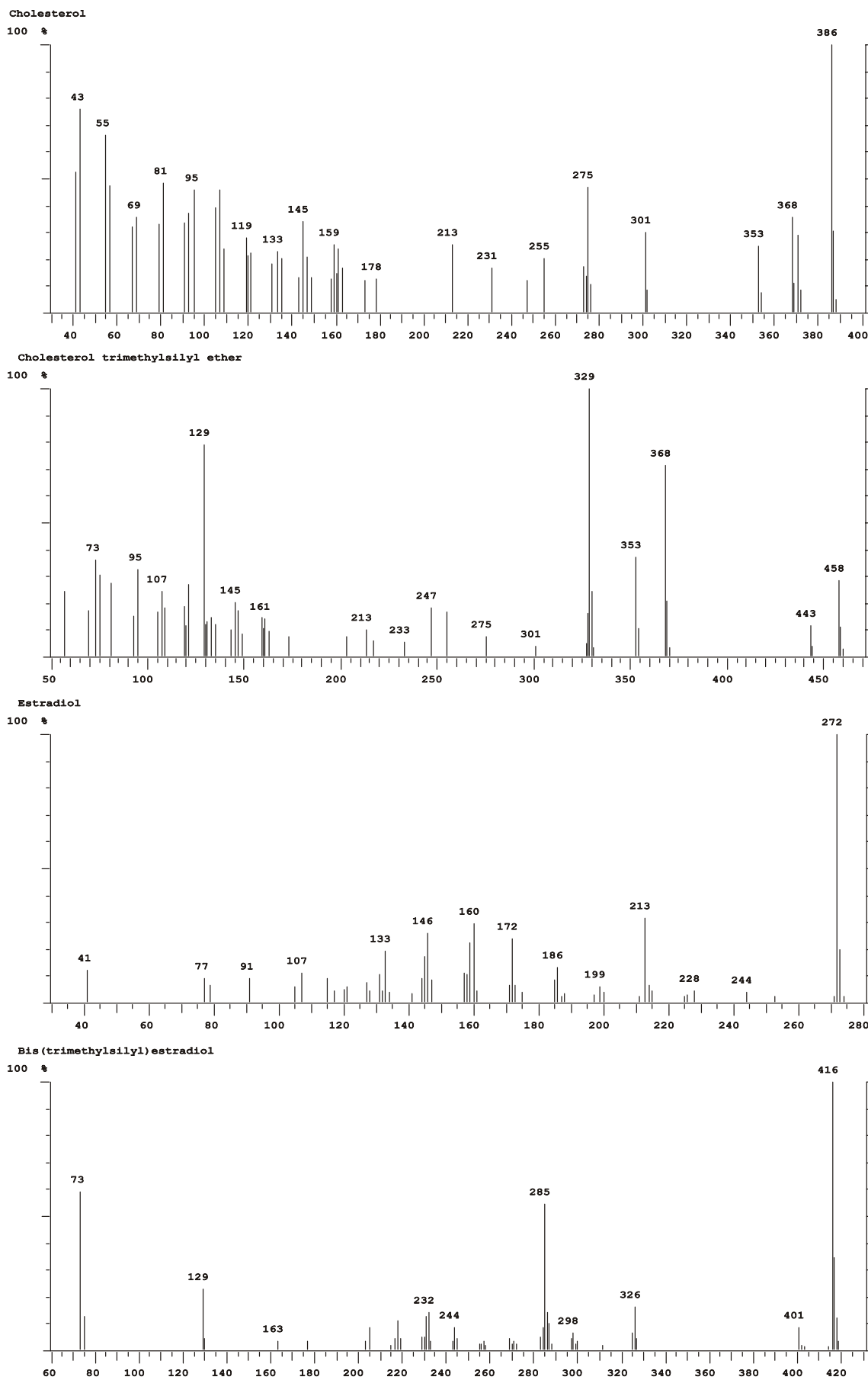


Abb. 3.2.4.1.A Massenspektren der in dieser Untersuchung mit Hilfe von GC/MS detektierten Substanzen (aus NIST 1992)

Quantifizierung von Substanzen

Die Quantifizierung von Substanzen ist ebenfalls direkt mit der verwendeten Analysen-Software möglich. Dazu werden definierte Mengen (eine Verdünnungsreihe) der zu quantifizierenden Substanz in die GC/MS injiziert und gemessen. Die einzelnen Signalintensitäten gegen die Substanzmengen aufgetragen ergeben eine Kalibriergerade, mit deren Hilfe die Software die gesuchte Substanzmenge zu beliebigen im Messbereich des Gerätes liegenden Signalintensitäten berechnet. Quantifizierungen wurden in der vorliegenden Arbeit nur für Cholesterol bzw. sein TMS-Derivat vorgenommen.

Anm. 1) Ionenmassen (M^+), weil durch die elektrische Ionisation im MS die Massen der Moleküle bzw. Molekülfragmente mit einem zusätzlich angelagerten Proton auftreten (im Gegensatz zu der Masse M des unzerstörten, nicht-ionisierten Moleküls)

3.2.4.2 Auswertung der Radioimmunoassays

Eine Übersicht der insgesamt durchgeführten RIAs (ohne Experimente mit gesonderten Randbedingungen) geben Tab. 8.4.A – 8.4.G im Anhang wieder. Dort sind zunächst alle Einzeldaten tabelliert, unabhängig davon, ob sie nach statistischer Prüfung in die weitere Auswertung übernommen wurden, oder nicht.

Die Umrechnung der vom Gamma-Counter ermittelten cpm-Werte (nicht tabelliert) in zugehörige Konzentrationen von E2 werden automatisiert von der RIA-CALC-Software vorgenommen. Ergebnis ist eine Liste von Konzentrationswerten, die die Menge des in der einzelnen RIA-Probe gefundenen E2 wiedergeben (Spalte „Messwert [pg]“). Diese Messwerte müssen zunächst geprüft werden, und anschließend in Konzentrationswerte umgerechnet werden, die sich direkt auf die untersuchten Extrakte beziehen.

- Erstes Prüfkriterium ist die Lage der Messwerte selbst in Relation zur zugehörigen Standardkurve (Standardwerte nicht tabelliert). Fallen Messwerte aus dem linearen Bereich der Standardkurve, so sind sie in der Spalte „Messwert [pg]“ in Fettschrift notiert und finden später keine Berücksichtigung mehr.
- Zweites Prüfkriterium ist die Intraassay-Präzision des RIAs. Bei der Auswertung von Daten aus RIAs wird neben der **Sensitivität** und **Spezifität** (Kreuzreaktivität) als wichtigster Parameter die **Präzision** des Assays bestimmt. Dabei wird die **Intraassay-Präzision** durch Mehrfachbestimmung derselben Probe in einem Ansatz ermittelt. Diese Ermittlung ist durch die Doppelbestimmung jeder in den einzelnen Assay eingesetzten Konzentration möglich (vgl. Tab. 3.2.3.2.A). Die Intraassay-Präzision

wird durch den Variationskoeffizienten der gemessenen Konzentrationen (in Prozent) ausgedrückt:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 [\%]$$

CV wurde für jedes einzelne Paar der in den Assay eingesetzten Konzentrationen der Extrakte bestimmt (Spalte „CV Messwert [%]“ der Tabellen). Ziel bei jedem RIA sollte ein möglichst niedriger CV sein, der allerdings für jede Testumgebung und Matrix separat bestimmt werden muss. In der klinischen Praxis werden in der Regel CV-Werte, die 25 % übersteigen, als mangelnde Präzision angesehen und führen zum Ausschluss der Werte aus der weiteren Analyse.

- Drittes Prüfkriterium in der vorliegenden Arbeit ist die Prüfung der Verdünnbarkeit der Extrakte im RIA, d. h. der Vergleich der Messergebnisse verschiedener Verdünnungen desselben Extraktes (vgl. Tab. 3.2.3.2.A). Dazu wird jeweils der Mittelwert (Spalte „Mittel Messwert [pg]“) der beiden Bestimmungen einer Verdünnungsstufe herangezogen, und auf die geringste Verdünnungsstufe normiert (Spalte „Mittel Messwert normiert [pg]“), damit alle drei Mittelwerte vergleichbar werden. Die drei Mittelwerte können als Mehrfachbestimmungen derselben Probe über mehrere Ansätze hinweg interpretiert und somit für die Ermittlung der Interassay-Präzision verwendet werden. Die Interassay-Präzision wird ebenfalls über den Variationskoeffizienten (in Prozent) ausgedrückt (vgl. o.). Die errechneten Werte wurden in der Spalte „CV Messw. normiert [%]“ tabelliert, und sollten auch hier möglichst niedrig liegen. Höhere Werte sind ein Indiz dafür, dass sich die drei getesteten Verdünnungen im RIA unterschiedlich verhalten, also die Matrix der Extrakte einen Einfluss auf die immunochemische Reaktion zwischen Antikörper und Antigen hat.

Reale Prüfungen der Interassay-Präzision wurden darüber hinaus durchgeführt (d.h. mehrfache unabhängige Assays verschiedener Extrakte der gleichen Individuen, vgl. 4.3.1 u. 4.3.2).

- Die **Spezifität** (Kreuzreaktivität) des Antikörpers #22.2 wurde durch qualitative Tests von Boden- und Pflanzenproben untersucht (vgl. 4.4.3 und 4.4.4).

4. Ergebnisse

Vorbemerkung: Nomenklatur der Proben

Vor der Darstellung der Ergebnisse soll hier die Nomenklatur der in dieser Arbeit untersuchten Proben zusammengefasst werden, die aufgrund der verschiedenen verwendeten Verfahren und z.T. aufeinander aufbauenden Analysen eindeutig zugeordnet werden müssen, um Verwechslungen oder Missverständnisse bei der Interpretation der Ergebnisse zu vermeiden.

Individuen-Bezeichnungen

In unterster Ebene sind zunächst die Knochen-, Blut- und Pflanzenproben zu benennen (Erläuterungen in 3.1, Tabellen in 8.3), hier als „Individuen“ bezeichnet. Hierfür findet jeweils eine Buchstaben-/Zahlenkombination Verwendung (Beispiele):

G01	Individuum Nr. 1, Rezentknochen Göttingen
M01	Individuum Nr. 1, Rezentknochen München
DO0901	Individuum Nr. 901, historischer Knochen Dorste
GS0035	Individuum Nr. 35, historischer Knochen Goslar
R01	Individuum Nr. 1, Rattenknochen
B01	Bodenprobe Nr. 1
C01	Pflanzenprobe Nr. 1

Diese Individuen-Bezeichnungen ersetzen die Original-Probenbezeichnungen aus den Grabungen, Sektionen usw.

Extrakt-Bezeichnungen

Von jedem Individuum können mehrere Extraktionen erfolgt sein (es stand unterschiedlich viel Material zur Verfügung). Die Extraktionen sind durch zweistellige Zahlen angegeben und einfach durchnummeriert (sie korrespondieren nicht mit einer bestimmten Extraktionsrunde). Sie werden mit einem Schrägstrich an die Nummer des Individuums angehängt. Die Kombination aus Individuen-Bezeichnung und Zahl der Extraktion kennzeichnen damit eindeutig die Extrakte (Beispiele):

G01/01	Erster Extrakt des Rezentknochens Göttingen G01
GS0035/01	Erster Extrakt des Individuums 35, hist. Knochen Goslar

Leerkontrollen, die bei den Extraktionen mitgeführt wurden, erhielten eine eigene Individuen-Bezeichnung, kombiniert aus dem Buchstaben L und einer zweistelligen Zahl (z.B. L01):

L01/01	Extrakt erste Leerkontrolle
--------	-----------------------------

L02/01 Extrakt zweite Leerkontrolle

Sowohl in die GC/MS, als auch die RIAs und die HPLC eingesetzte Proben (Extrakte) tragen daher eine eindeutige Extrakt-Bezeichnung.

Bezeichnungen der GC/MS-Analysen

Die einzelnen Analysen der Extrakte in der GC/MS werden, falls notwendig, durch separate Bezifferung dargestellt, da in der vorliegenden Arbeit nur ausgewählte Ergebnisse präsentiert werden, die Mehrzahl der (erfolglosen) GC/MS-Messungen jedoch nicht dokumentiert wird. Analysen von Standards und Leerkontrollen erhalten ebenfalls eine separate Bezifferung (GC/MS-Leerkontrollen = Injektion reinen Lösemittels, diese sind nicht gleich den Extrakt-Leerkontrollen!).

Bezeichnungen der RIAs

Die durchgeführten RIAs werden durch die Bezeichnung der Extrakte und das Datum identifiziert, verschiedene eingesetzte Konzentrationen eines Extraktes lediglich in der Messdatentabelle vermerkt und nicht separat ausgewiesen.

Bezeichnungen der HPLC-Analysen

Die in die HPLC eingesetzten Extrakte werden unter ihren Extrakt-Bezeichnungen geführt. Die gesammelten Fraktionen von 01 beginnend durchgezählt; für den Einsatz der Fraktionen in den RIA ergibt sich damit eine Benennung, die Proben-Bezeichnung und Fraktionsnummer kombiniert (Beispiele):

GS0035/01-01 Erste Fraktion der HPLC von Extrakt GS0035/10

GS0035/01-02 Zweite Fraktion der HPLC von Extrakt GS0035/10

Analysen von Standards und Leerkontrollen erhalten eine separate Bezifferung (HPLC-Leerkontrollen = Injektion reinen Lösemittels, diese sind nicht gleich den Extrakt-Leerkontrollen!).

4.1 Chemischer Aufschluss des Probenmaterials

Die Ergebnisse der Entwicklung und Optimierung eines Extraktionsprotokolles für Steroide, insbesondere für Estradiol, aus rezenten und historischen Knochen lassen sich weitgehend nur qualitativ beschreiben.

Extraktionen mit Hydrolyse der Steroide (Puffer-Systeme)

Die in nach Grundprotokoll A, Varianten 1-3 durchgeführten Extraktionen mit initialer Hydrolyse der Steroide in wässrigen Puffer-Systemen haben zu keinerlei Nachweis von Steroiden in den anschließenden GC/MS-Untersuchungen geführt (vgl. Kap. 4.2.1 u. 4.2.2). Weder der Wechsel des Puffer-Systems noch der Zusatz von Enzymen (β -Glucuronidase, Proteinase K) haben zu positiven Ergebnissen geführt.

Dabei hat sich der Aufschluss des rezenten Knochens als noch problematischer herausgestellt als der des historischen Knochens. Die hohen Fett- und Collagen-Anteile sind aus den Extrakten nicht zu entfernen, insbesondere, wenn sie teilweise oder ganz gelöst sind. Dieser Effekt trat vor allem bei der Verwendung von EDTA-basierten Puffern auf. Mit niedrig konzentriertem EDTA-Puffer (0,1 M) wird der Knochen durch die Chelatbildung des EDTA mit dem im Knochen enthaltenen Ca^{2+} zwar angelöst, aber nicht vollständig aufgelöst. Höhere Konzentrationen von EDTA (1 M) lösen den Knochen so weitgehend auf, dass der entstehende Extrakt in der Konsistenz Knochenleim entspricht, und auch mit organischen Lösungsmitteln nicht weiter zu verarbeiten ist. Bei allen EDTA-basierten Extrakten besteht außerdem die Schwierigkeit, EDTA wieder aus dem Extrakt zu entfernen. Da es sich z.B. in Methanol gut löst, geht EDTA mit in die weiteren Extraktionsschritte und letztendlich in den fertigen Extrakt über, der dann nicht mehr für die GC/MS-Untersuchung geeignet ist. Fällungen des EDTA im sauren Milieu scheiterten ebenfalls, da sie nicht vollständig erfolgten und ebenfalls die GC/MS-Analytik stören. Auch in den RIA dürfen keine Säuren verschleppt werden, da sie den Assay stören. Zur Vorbereitung von RIA kann ausschließlich Trifluoressigsäure verwendet werden, die beim Trocknen der Extrakte rückstandsfrei verdampft.

Eine abschließende Prüfung des Extraktionserfolges durch den Einsatz von Extrakten in den RIA blieb ebenfalls ergebnislos.

Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln

Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln, vor allem Methanol und anschließender Entfettung mit Hexan (Grundprotokoll B) zeigten die oben geschilderten Probleme mit der Knochenmatrix in nur sehr viel geringerem Umfang. Extrakte von rezenten wie historischen Knochen waren weitgehend klar und für die folgende Analytik in der GC/MS geeignet. Ausnahme bildeten teilweise vorhandene Fettrückstände, die erst bei Aufnahme der Extrakte in den Assay-Puffer des RIAs (vgl. Kap. 3.2.3.2 und 4.3.1) als Trübungen in Erscheinung

traten, sich aber durch Variation des Protokolls (Var. 1, zweite Entfettung mit Hexan) und Zentrifugation vor dem Einsatz in den RIA entfernen ließen.

Auch bei den Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln ist deutlich festzuhalten, dass die Extrakte in den zunächst durchgeführten GC/MS-Analysen keinen Nachweis von Steroiden erbracht haben (vgl. Kap. 4.2.1 u. 4.2.2). Allerdings konnte schon im Laufe der Entwicklung des Extraktionsprotokolls Cholesterol sowohl aus den rezenten als auch den historischen Knochen nachgewiesen werden. Da Cholesterol als Vorläufersubstanz der Steroidhormone (vgl. Kap. 2.1.3) strukturell und in seinem chemischen Verhalten diesen so ähnlich ist, konnte anhand des positiven Nachweises von Cholesterol die Optimierung des Extraktionsprotokolls vorgenommen werden. Variationen, die die Cholesterol-Ausbeute aus dem Knochen optimierten, führten schließlich zu Grundprotokoll B, Variante 1, das in der Folge für alle Extraktionen in dieser Untersuchung verwendet wurde. Der Cholesterol-Nachweis in rezenten und historischen Knochen erfolgte mit Hilfe der GC/MS, siehe Kap. 4.2.1 u. 4.2.2.

Das auf Cholesterol optimierte Protokoll wurde in der Folge in Pilotversuchen mit Hilfe des RIA geprüft, ob es für die Extraktion von E2 geeignet ist. In den Assays konnte E2 aus diesen Extrakten erfolgreich nachgewiesen werden (vgl. Kap. 4.3.1 u. 4.3.2).

Prüfung des Extraktionsprotokolls auf Analyt-Verluste

Anschließend wurde geprüft, ob die Protokoll-Anpassungen, vor allem die Einführung eines zweiten Entfettungs-Schrittes, eine negative Auswirkung auf die Wiederfindungsraten von E2 hatten. Da Steroide durchaus in der Fettfraktion enthalten sind, musste vor allem getestet werden, ob das Verwerfen der n-Hexan-Phasen in den beiden Entfettungsschritten zu Verlusten des Analyten E2 führen könnte. Dazu wurde eine Extraktion speziell angepasst (Grundprotokoll B, Var. 1, vgl. Kap. 3.2.2), Anpassungen rot markiert:

- 3 g Knochenmehl in Glasröhrchen 10-15 ml mit Glasstopfen einwiegen
- mit 8 ml MeOH versetzen
- vortexen
- 48 h bei Raumtemperatur schütteln
- vortexen
- 12 min Zentrifugation bei 4000 u/min (Hettich 30 RF)
- 1 ml MeOH-Phase entnehmen, zur Trockne einengen, Übergang zum RIA (Extraktionspunkt 1)
- MeOH-Phase in 25 ml Spitzkolben überführen, Knochenrückstand verwerfen
- 7 ml n-Hexan zugeben

- ausschütteln
- Hexanphase separieren
- 7 ml n-Hexan zugeben (2. Zugabe)
- ausschütteln
- Hexanphase separieren und mit 1. Hexanphase vereinigen, zur Trockne einengen, Übergang zum RIA (Extraktionspunkt 2)
- MeOH-Phase zur Trockne einengen (Speedvac, niedrige Temperaturstufe, ca. 30° C)
- Aufnehmen in 3 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH = 7,0
- Übergang zur SPE:
- Konditionierung der Säulen nach Vorschrift
- Aufgabe der Proben
- 2 × Spülen mit 2 ml Aqua bidest.
- Säule unter Vakuum 10 min trocknen
- 1. Elution mit 1 ml MeOH, separat auffangen, zur Trockne einengen, Übergang zum RIA (Extraktionspunkt 3)
- 2. Elution mit 1 ml DCM, separat auffangen, zur Trockne einengen, Übergang zum RIA (Extraktionspunkt 4)

Die Ergebnisse der im RIA gemessenen E2-Werte für verschiedene Proben (rezyklischer Knochen, historischer Knochen, Boden- und Leerproben) für die vier verschiedenen Extraktionspunkte sind in Tab. 4.1.A zusammengestellt (Einzeldaten der Messungen im Anhang, Tab. 8.4.H).

Tab. 4.1.A Ausbeuten einzelner Extraktionspunkte der vierstufigen Extraktion

Individuum	Extraktionspunkt	C (E2) [pg/g]		Bemerkungen
		Einzelne Punkte	Punkte 3+4	
M02	1	757,0		leichte Trübung
M02	2	164,1		leichte Trübung
M02	3	2207,5		leichte Trübung
M02	4	454,9	2662,5	
M03	1	489,4		leichte Trübung
M03	2	62,1		
M03	3	1433,7		leichte Trübung
M03	4	189,9	1623,6	
M08	1	1175,0		leichte Trübung
M08	2	120,6		leichte Trübung
M08	3	2964,9		Trübung
M08	4	790,7	3755,6	
M13	1	1293,2		leichte Trübung
M13	2	521,9		leichte Trübung

M13	3	3649,9		leichte Trübung
M13	4	407,4	4057,3	
B03	1	280,1		
B03	2	64,2		
B03	3	147,8		
B03	4	196,9	344,7	
B02	1	331,9		
B02	2	122,2		
B02	3	481,2		
B02	4	189,3	670,5	
B01	1	283,4		
B01	2	71,0		
B01	3	103,6		
B01	4	187,7	291,3	
DO0320	1	42,4		leichte Trübung
DO0320	2	18,0		
DO0320	3	19,0		
DO0320	4	22,5	41,5	
L10	1	15,6		
L10	2	27,8		
L10	3	22,1		
L10	4	53,6	75,7	
L11	1	39,1		
L11	2	60,7		
L11	3	81,3		
L11	4	85,1	166,4	

Die tabellierten Werte zeigen durchgängig, unabhängig von der Art des extrahierten Probenmaterials, höchste E2-Werte in den Extraktionspunkten 3 und 4, den beiden Eluaten der SPE. Sie sind in der dritten Spalte jeweils noch einmal zu einem Wert zusammengefasst, der den abschließenden Wert für die SPE darstellt. Die Messwerte für E2 in den 1. Extraktionspunkten, also für das ohne weitere Behandlung entnommene Extraktionsmittel MeOH, sind ebenfalls vergleichsweise hoch, repräsentieren sie doch den Rohextrakt. Zur genauen Vergleichbarkeit der Werte in der Tabelle müssten hier noch die auf das jeweilige Volumen bezogenen Konzentrationen berechnet werden. Zur Klärung der zentralen Frage, ob mit der Entnahme der Hexan-Phasen Analyt-Verluste einhergehen, ist das jedoch nicht notwendig, da die Messwerte der Extraktionspunkte 2 jeweils den gesamten E2-Gehalt dieser Phasen repräsentieren. Hier finden sich die niedrigsten E2-Messwerte überhaupt, was belegt, dass hier nur kleine Mengen E2 verloren gehen.

4.2 Nachweis von Steroiden durch GC/MS

4.2.1 Rezenter menschlicher Knochen

Standard-Nachweise

Zunächst wurde zur Einstellung des chromatographischen Systems eine Reihe von Messungen mit dem sieben Steroide umfassenden Standard durchgeführt (vgl. Kap. 3.2.3.4). Die Substanzen lassen sich chromatographisch auftrennen und sind im Chromatogramm als einzelne Peaks wiederzufinden (Abb. 4.2.1.A) und über die zugeordneten Massenspektren eindeutig zu identifizieren.

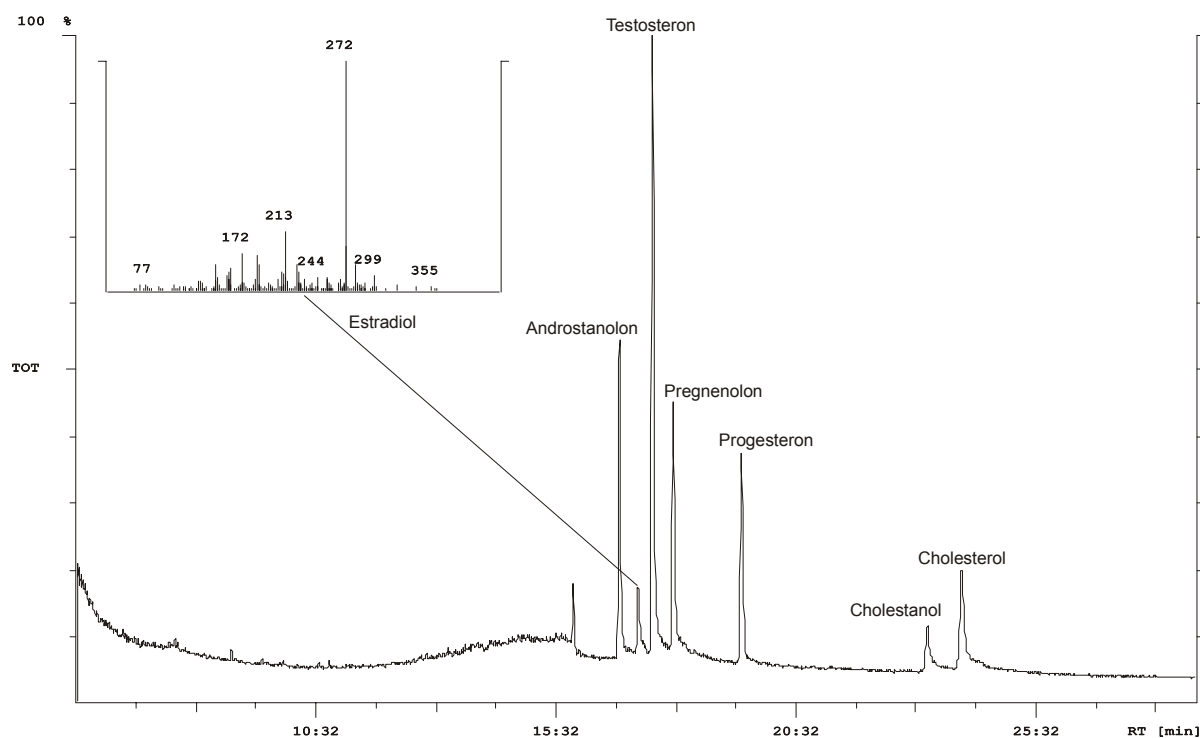


Abb. 4.2.1.A GC/MS-Chromatogramm des sieben verschiedene Steroide (einschließlich E2) umfassenden Standards (je 20 ng/Steroid absolut). Eingeblenet ist das für E2 aufgezeichnete Massenspektrum bei RT = 17:15 min. Totalionenstrom (TOT): 100 % = 2144722 MU

Da die Empfindlichkeit des Nachweises durch Derivatisierung der Steroide meist gesteigert werden kann, wurden die Steroide des Standards unter Verwendung von BSTFA derivatisiert (vgl. Kap. 3.2.3.1). Die chromatographische Trennung und Darstellung der Derivate wurde ebenfalls geprüft (Abb. 4.2.1.B, Chromatogramm des Sieben-Steroide-Standards, Abb. 4.2.1.C, Chromatogramm des E2-Standards).

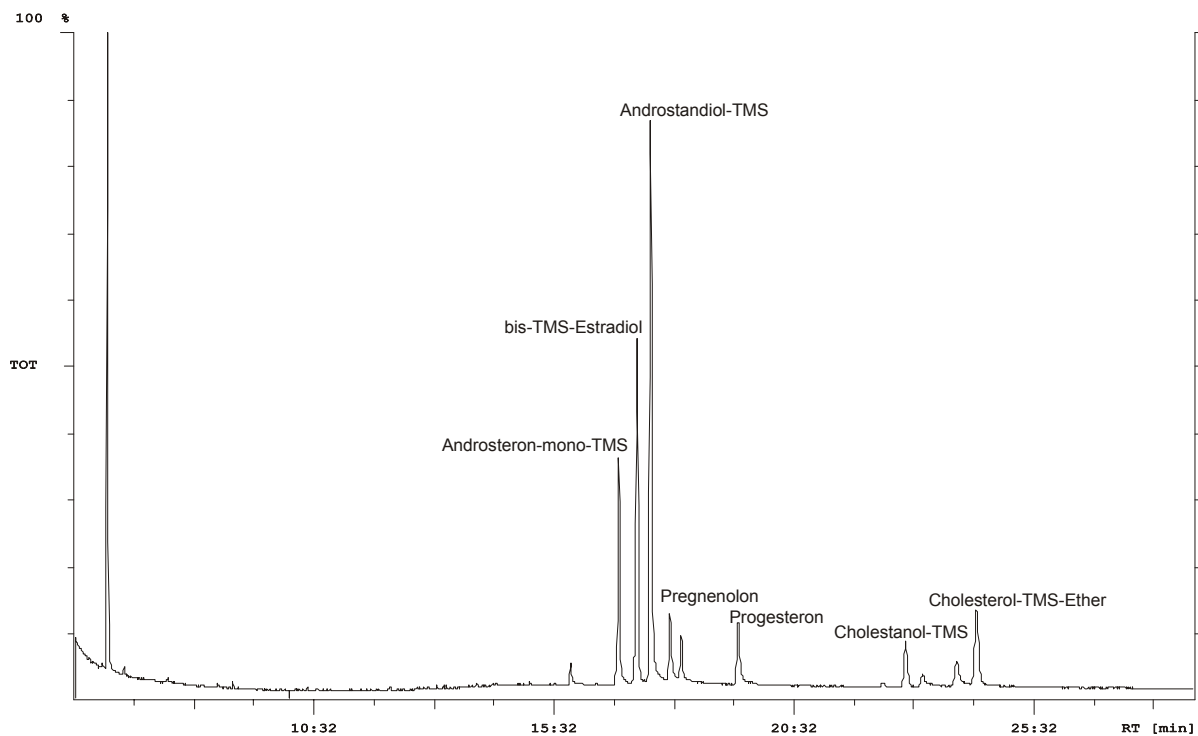


Abb. 4.2.1.B GC/MS-Chromatogramm des sieben verschiedene Steroide (einschließlich E2) umfassenden Standards (je 20 ng/Steroid absolut), mit BSTFA derivatisiert (TMS-Derivate). TOT: 100 % = 1729916 MU

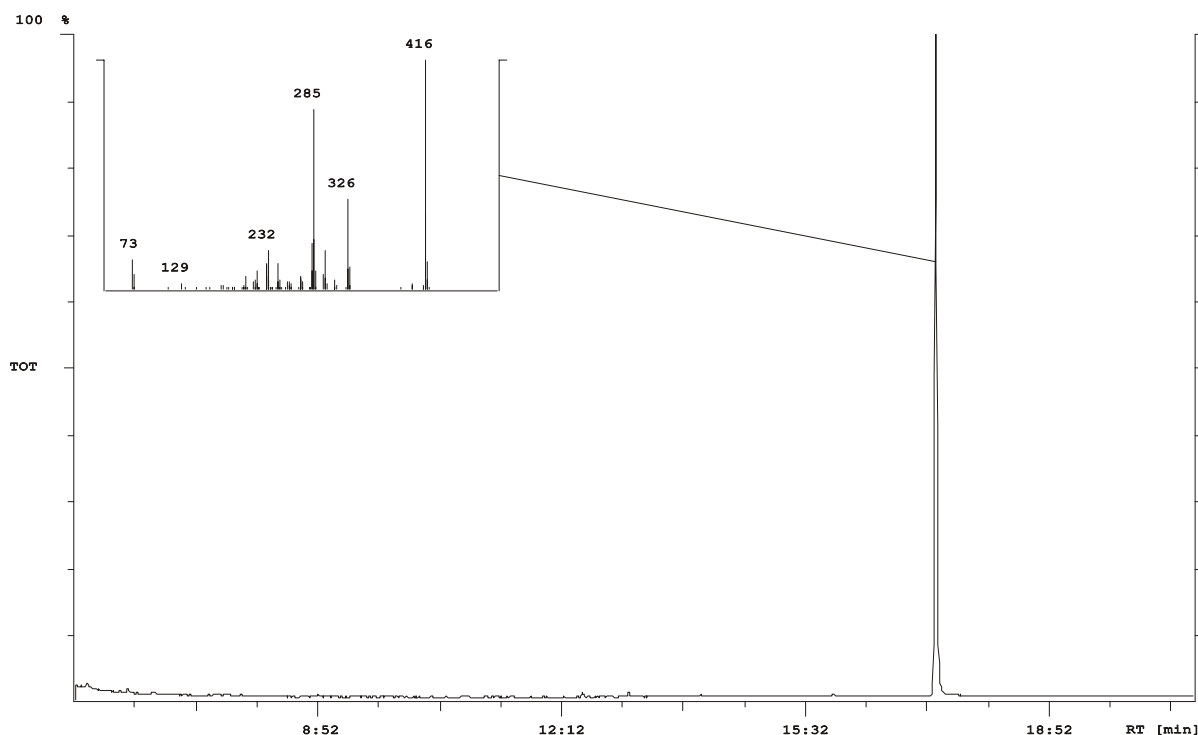


Abb. 4.2.1.C GC/MS-Chromatogramm des E2-Standards (50 ng abs.), mit BSTFA derivatisiert (TMS-Derivat). Eingebildet ist das für bis-TMS-Estradiol aufgezeichnete Massenspektrum bei RT = 17:20 min. TOT: 100 % = 1180366 MU.

Die gezeigten Chromatogramme belegen die grundsätzliche Nachweisbarkeit und Bestimmbarkeit (Quantifizierung) des Steroidhormons E2 im verwendeten chromatographischen System. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe wurde versucht, die Nachweisgrenze des E2 im System zu ermitteln (die Nachweisgrenze entspricht *per definitionem* mindestens der 2-fachen Standardabweichung des Rauschens). Die ermittelte Mindestmenge für den Nachweis von E2 (derivatisiert) entspricht ca. 0,2 ng abs., bei einer Injektion von 1 µl also einer Konzentration von 200 pg/µl = 200 ng/ml. In einem Knochenextrakt müsste mindestens diese Konzentration enthalten sein, um im System dargestellt werden zu können.

Steroid-Nachweise

Indigene steroidale Substanzen, die im rezenten Knochen nachgewiesen werden können, sind auf Cholesterol und einige Derivate des Cholesterols beschränkt. Estradiol oder andere Steroide konnten in den GC/MS-Untersuchungen rezenten Knochenmaterials nicht gefunden werden. Mit fortlaufender Anpassung der Extraktionsmethode (vgl. Kap. 4.1) konnte die Menge des extrahierten Cholesterols allerdings so weit gesteigert werden, dass es selbst in Verdünnungen der Extrakte zu einer Sättigung des MS-Messsystems führte, die gefundenen Mengen also nicht mehr quantifiziert werden konnten (vgl. Abb. 4.2.1.D). Der erfolgreiche Nachweis von Cholesterol wurde, wie in Kap. 4.1 beschrieben, zur Optimierung der Extraktionsmethode eingesetzt. Selbst in Extrakten mit maximaler Cholesterol-Ausbeute konnten jedoch keine anderen Steroide gefunden werden, auch nicht durch Einsatz von SIM-Technik.

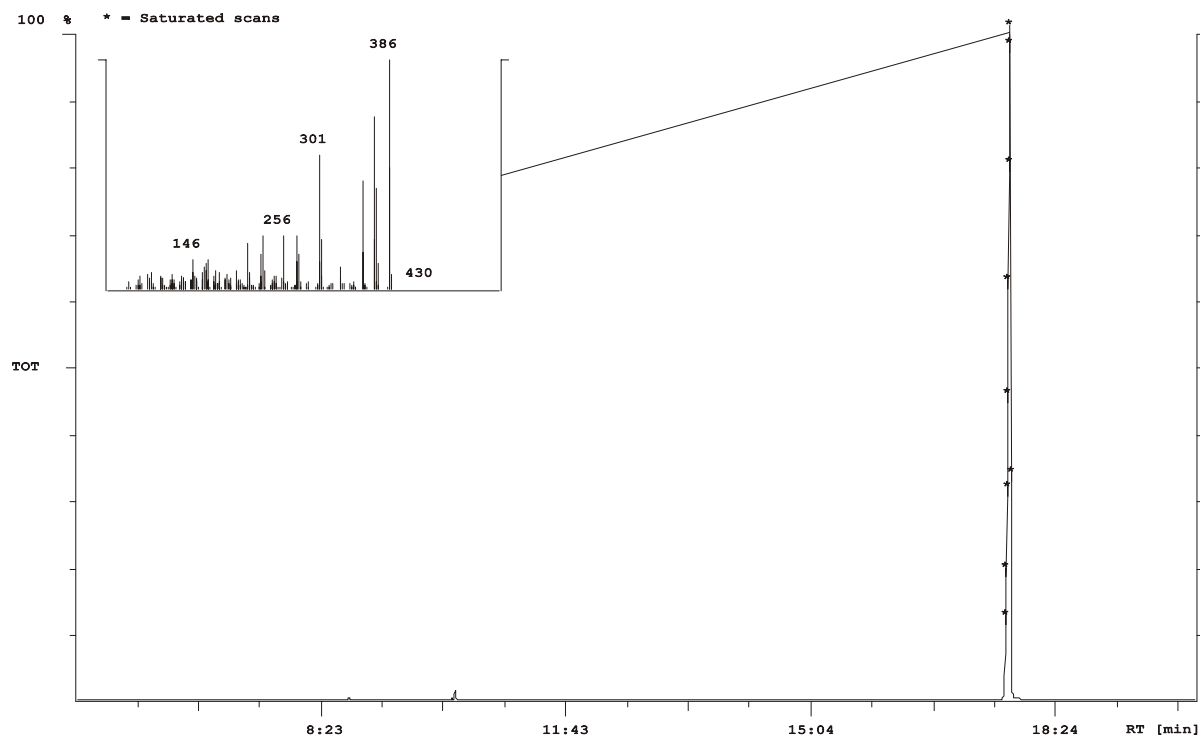


Abb. 4.2.1.D GC/MS-Chromatogramm eines rezenten Knochen-Extraktes (Individuum G22). Der Peak bei RT = 17:47 repräsentiert Cholesterin in so großer Menge, dass das MS-Messsystem gesättigt wurde (Sternchen). Eingebildet ist das für Cholesterin aufgezeichnete Massenspektrum. TOT: 100 % = 1190086502 MU.

4.2.2 Historischer menschlicher Knochen

Standard-Nachweise (Spiking)

Um festzustellen, ob die Matrix der historischen Knochen einen Einfluss auf die chromatographische Darstellung der Steroide hat, wurde der Standard mit sieben Steroiden vor der Extraktion Knochenmehl von historischen Knochen zugesetzt (50 µg pro Steroid abs.). Die Steroide sind mit einer Wiederfindungsrate von 85 % in der GC/MS-Analytik darstellbar. Ein Beispiel eines mit dem Standard gespikten historischen Knochens zeigt Abb. 4.2.2.A.

Steroid-Nachweise

In den untersuchten historischen Knochen ist wie im rezenten Material ebenfalls nur Cholesterin nachweisbar, Steroide konnten in keinem Knochen gefunden werden. Indigenes Cholesterin aus dem Knochenmaterial konnte in nur wenigen Fällen nachgewiesen werden, die Mehrzahl der Knochen blieb auch hier ohne Befund. Zudem sind die gefundenen Mengen erheblich kleiner als die aus dem rezenten Knochen (vgl. Abb. 4.2.2.B). Eine Quantifizierung wurde nicht vorgenommen.

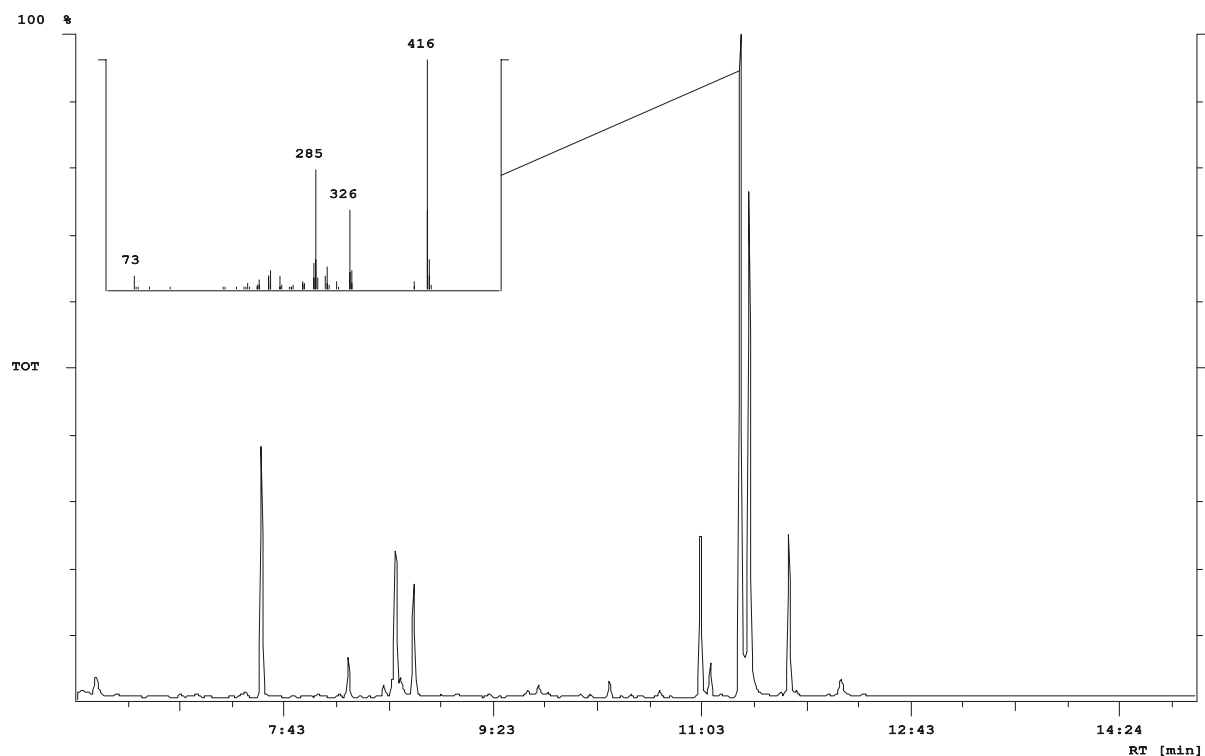


Abb. 4.2.2.A GC/MS-Chromatogramm des Standards von sieben Steroiden, mit BSTFA derivatisiert (TMS-Derivate, 20 ng abs.). Eingebildet ist das für bis-TMS-Estradiol aufgezeichnete Massenspektrum bei RT = 11:20 min. TOT: 100 % = 73630039 MU.

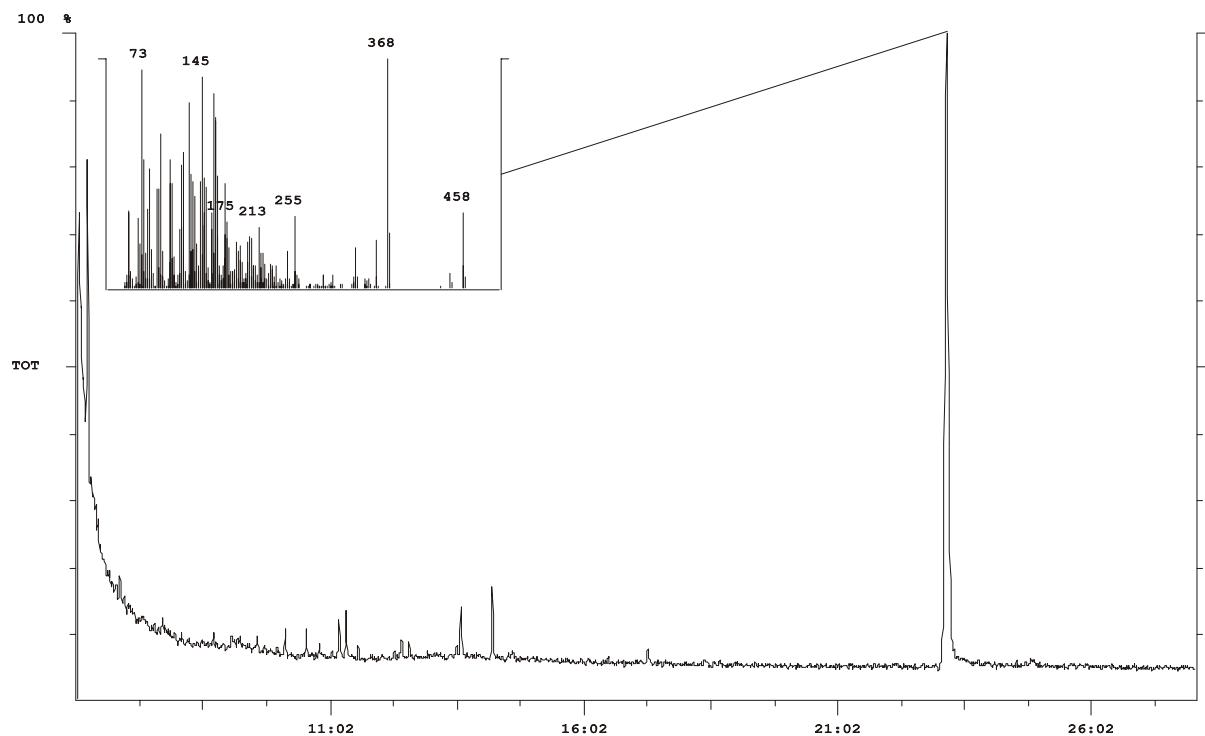


Abb. 4.2.2.B GC/MS-Chromatogramm eines Extraktes aus historischem Knochen (Individuum DO0229). Der Peak bei RT = 23:11 repräsentiert Cholesterol, mit BSTFA derivatisiert (TMS-Derivat). Eingebildet ist das für Cholesterol-TMS-Ether aufgezeichnete Massenspektrum. TOT: 100 % = 287687 MU.

4.3 Nachweis und Quantifizierung von Estradiol (E2) durch Radioimmunoassay

4.3.1 Rezenten menschlicher Knochen

Im rezenten Knochen lassen sich mittels RIA E2-Konzentrationen von einigen Hundert Picogramm bis über 80 Nanogramm pro Gramm Gewebe messen. Alle Extrakte wurden nach Extraktionsmethode B, Var. 1, angefertigt (vgl. Kap. 3.2.2).

Messwerteübersicht

Insgesamt wurden Messwerte von 116 Individuen gewonnen, die in einem Bereich von 230,4 pg (W07) bis 82,5 ng E2 (W63) pro Gramm Knochen liegen (Tab. 4.3.1.A).

Es wurden keine Werte gemessen, die in den Bereich des Grundrauschens fallen (vgl. Kap. 4.4.5, Knochenasche). Die höchsten Werte, die für W29, W42, W56, W60, W63, W68 und W69 gemessen wurden, liegen alle über 20 ng E2 pro Gramm Knochengewebe und fallen damit aus dem Streubereich der restlichen Messwerte nach oben heraus, insbesondere W63 mit 82,5 ng/g (türkis unterlegt). Die hohen Messwerte dieser Knochen werden separat einer Betrachtung unterzogen, da es sich um Knochen von Feten handelt, die zwischen der 17. und 39. SSW verstorben sind (Ausnahme: W60, SIDS in einem Alter von 8 Wochen). Die Werte finden bei der Altersunabhängigen Bildung statistischer Maßzahlen keine Berücksichtigung.

Ohne Berücksichtigung der genannten Werte der Feten und des Neugeborenen, zeigen die verbleibenden Individuen Messwerte im Bereich von 230,4 pg bis 10,1 ng E2 pro Gramm Knochen, bei einem Mittel von $2336,1 \pm 1764,3$ pg E2/g.

Tab. 4.3.1.A Messwerte für E2 in rezenten Knochen, für doppelt und mehrfach gemessene Individuen sind die Mittelwerte (z.T. aus Tab. 4.3.1.C) vermerkt. Messungen, deren Werte außerhalb des linearen Bereichs der Standardkurve liegen, wurden nicht berücksichtigt (vgl. Tab. 8.4.A). Von einem Individuum ist das Sterbealter nicht bekannt (gelb unterlegt). Der Wert findet bei Betrachtung altersabhängiger Fragestellungen keine Berücksichtigung.

Individuum	Geschlecht	Individualalter	C (E2) [pg/g Probe]
G04	m	60	1868,7
G05	m	70	506,2
G08	f	47	3263,9
G10	f	51	2790,9
G12	m	64	3547,9
G13	m	65	10073,0
G15	f	9	3034,8
G17	m	47	4463,9
G21	f	81	2760,0
G22	m	64	1597,8
G23	f	87	1558,1
G24	m	57	1040,4

G25	f	89	991,5
G26	f	69	2278,9
G27	m	59	2061,6
G28	f	81	1833,8
G29	m	52	2975,8
G30	m	78	1800,1
G31	f	71	2330,0
G32	f	75	2851,5
G34	f	n. d.	739,9
M01	m	27	2085,8
M02	m	21	1944,2
M03	m	37	2276,0
M04	m	46	1468,9
M05	f	37	2586,4
M06	f	33	2211,1
M07	m	24	2674,4
M08	f	22	1159,0
M09	m	24	1879,2
M10	m	45	2233,2
M11	m	41	4114,1
M12	m	34	1606,9
M13	f	45	1289,0
M14	m	33	2152,7
M15	f	24	2537,6
M16	f	43	2243,3
M17	f	25	2888,5
M18	m	16	2454,0
M19	f	33	3929,4
M20	m	18	1096,3
N01	f	73	1353,0
N03	m	61	2646,9
N04	f	82	2900,3
N07	m	73	1605,6
N09	m	78	2318,7
N10	f	80	1254,5
N12	f	49	2393,6
W01	f	96	1998,6
W02	m	72	1127,7
W03	f	51	1289,2
W04	f	50	657,7
W05	m	71	1251,3
W06	m	43	541,1
W07	m	40	230,4
W08	f	92	1778,1
W09	f	78	1671,8
W10	f	75	2599,8
W11	m	59	2592,9
W12	m	56	2749,9
W13	m	61	868,5
W14	f	71	1220,3
W15	m	1,5	9535,1
W16	m	2	2979,6
W17	m	57	858,5
W18	m	65	3148,5

W19	m	67	1209,8
W20	f	61	945,5
W21	f	2	6601,3
W23	m	89	1686,9
W24	m	36	1066,4
W25	f	1,5	5318,1
W26	f	86	3807,3
W27	f	81	1420,6
W28	f	1,3	9496,4
W29	f	27 SSW	27383,2
W30	f	29	1048,4
W31	m	28	713,4
W32	m	27	800,6
W33	m	81	1928,9
W34	m	50	1213,3
W35	m	60	853,3
W36	f	61	1122,7
W37	f	89	665,2
W38	f	55	3277,4
W39	f	92	863,2
W40	f	56	2343,0
W41	m	67	558,9
W42	m	33 SSW	28518,1
W43	m	34	2905,0
W44	f	33	1968,0
W45	m	81	2956,2
W46	f	39	1394,9
W47	m	73	1274,9
W48	f	48	2051,0
W49	m	22	2153,5
W50	f	28	1603,8
W51	f	43	2098,5
W52	m	92	2046,8
W53	f	36	1567,9
W54	m	18	1401,2
W55	m	17	1596,2
W56	m	39 SSW	24952,9
W57	m	20	566,9
W58	f	11	2639,9
W59	m	94	5658,8
W60	m	8 W	30188,2
W61	f	29	1884,9
W62	f	25	1431,5
W63	m	17 SSW	82498,2
W64	m	93	6419,0
W65	f	101	2177,0
W66	f	3	6497,2
W67	f	11	4626,6
W68	f	26 SSW	22136,5
W69	f	29 SSW	38693,5
Mittelwert (ohne farblich markierte)			2336,1
Standardabweichung			1764,3

Bildet man die Mittelwerte für die E2-Konzentrationen in beiden Geschlechtern getrennt, so werden bei weiblichen Individuen (n=54) $2393,4 \pm 1621,2$ pg E2/g gemessen, bei den männlichen Individuen (n=55) $2279,7 \pm 1907,7$ pg E2/g. Beide Werte unterscheiden sich statistisch nicht, mit Ausnahme der größeren Streuung der Werte der Männer. [Statistische Prüfung über T-Test für unabhängige Stichproben: $T = 0,335$ fällt bei der Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$ nicht in den Ablehnungsbereich der H_0 , die damit angenommen wird. H_0 nimmt an, dass die Mittelwertdifferenz $(\mu_1 - \mu_2) = 0$ ist. Kritische Werte von T tabelliert in Siegel (1985).]

Tab. 4.3.1.B Mittelwerte der E2-Messwerte nach Altersklassen (Lebensdekaden) für beide Geschlechter getrennt aufgliedert.

Altersklasse [Jahre]	f		m	
	n	MW E2 [pg/g]	n	MW E2 [pg/g]
-0	3	29404,4	4	41539,4
0-9	5	6189,6	2	6257,4
10-19	2	3633,3	4	1636,9
20-29	7	1793,4	8	1602,3
30-39	6	2276,3	5	2001,4
40-49	6	2223,2	6	2175,3
50-59	5	2071,6	7	1927,5
60-69	3	1449,0	10	¹⁾ 2637,3 (1811,1)
70-79	6	2004,4	7	1412,1
80-89	9	1910,1	3	2190,7
90-	4	1704,2	3	4708,2

Anm. 1) Der Mittelwert ist von einem Ausreißer stark beeinflusst. Nach Ausschluss des Ausreißers ergibt sich als Mittelwert der in Klammern gesetzte Wert.

Unter Bezug auf das Geschlecht und die Altersklassen, denen die Individuen zugehören, sollten sich deutliche Unterschiede zeigen (vgl. Kap. 2.1.3). Die erzielten Messwerte spiegeln jedoch die Erwartungen nicht wieder: Zwischen den Geschlechtern und innerhalb der Geschlechter zwischen den Altersklassen herrschen nicht jene Verhältnisse, die aus klinischen Daten aus Urin- bzw. Plasma-Bestimmungen zu antizipieren sind. In den Lebensjahren 10-49 liegen zwar stets die höheren Messwerte bei den Frauen, die Messwerte der Männer liegen aber im Mittel nur sehr knapp darunter. Die in jüngerem (reproduktiv besonders günstigem) Alter der Frauen zu erwartenden höheren Werte können ebenfalls nicht belegt werden. Ältere Frauen zeigen im Vergleich teilweise gleich hohe Messwerte (vgl. Kap. 5.1.3). Abb. 4.3.1.A zeigt, dass die Messwerte kaum gruppiert sind und keinem eindeutigen Trend folgen, selbst wenn Ausreißer eliminiert werden.

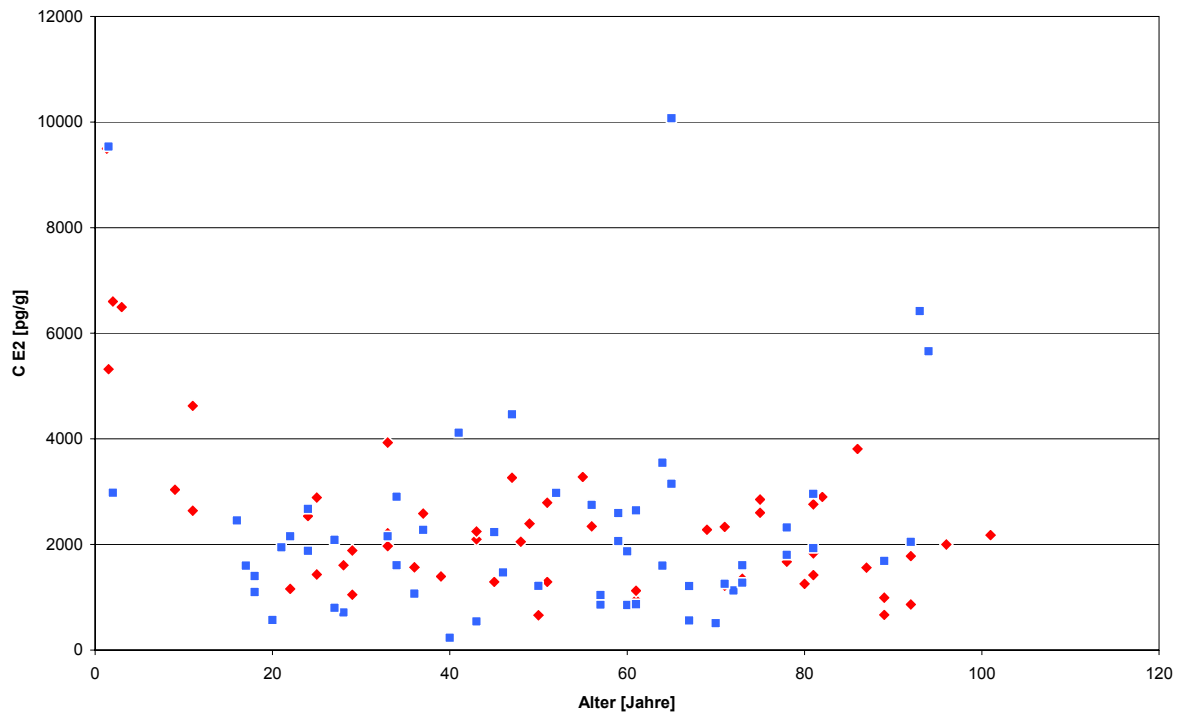


Abb. 4.3.1.A Messwerte der E2-RIAs gegen das Alter der Individuen aufgetragen. Rote Rauten = Messwerte weiblicher Individuen, blaue Quadrate = männliche Individuen.

4.3.2 Historischer menschlicher Knochen

In den historischen Knochen lassen sich pro Gramm Knochen mittels RIA E2-Konzentrationen im Pico- bis in den niedrigen Nanogramm-Bereich messen. Alle Extrakte wurden nach Extraktionsmethode B, Var. 1, angefertigt (vgl. Kap. 3.2.2).

Messwerteübersicht

Insgesamt wurden Messwerte von 24 Individuen gewonnen, die in einem Bereich von 22,0 pg (DO2263) bis 13,3 ng (BO0002) E2 pro Gramm Knochen liegen (Tab. 4.3.2.A).

Die niedrigsten Werte bis ca. 45 pg/g fallen in den Bereich des Grundrauschens (vgl. Kap. 4.4.5, Knochenasche) und repräsentieren „leere“ Proben ohne positiven E2-Befund (gelb unterlegt). Die beiden höchsten Werte, für BO0001 und BO0002, fallen aus dem Streubereich der restlichen Messwerte nach oben heraus, insbesondere BO0002 mit 13 ng/g (türkis unterlegt). Die hohen Messwerte dieser beiden Knochen werden separat einer Betrachtung unterzogen, da es sich mit den Knochen der Anna von Brandenburg um Knochen einer während der 27./28. SSW Verstorbenen handelt. Aufgrund der hohen Messwerte wurden die zugrundeliegenden Extrakte außerdem einer Fraktionierung mittels HPLC unterzogen, um die Spezifität des RIA zu prüfen (vgl. Kap. 4.4.6).

Lässt man die „leeren“ Proben ebenso wie die Proben der Anna von Brandenburg außer Acht, zeigen die verbleibenden Individuen Messwerte im Bereich von 62,9 bis 1696,1 pg E2 pro Gramm Knochen, bei einem Mittel von $661,5 \pm 494,9$ pg E2 pro Gramm Knochen.

Tab. 4.3.2.A Messwerte für E2 in historischen Knochen, für doppelt und dreifach gemessene Individuen sind die Mittelwerte aus Tab. 4.3.2.B vermerkt. Messungen, deren Werte außerhalb des linearen Bereichs der Standardkurve liegen, wurden nicht berücksichtigt.

Individuum	Geschlecht	C (E2) [pg/g Probe]
BO0001	f	2530,2
BO0002	f	13324,5
DO0035	m	541,3
DO0058	m	708,9
DO0199	f	87,9
DO0300	f	62,9
DO0901	f	41,0
DO0902	m	410,8
DO0903	f	170,3
DO0905	m	28,4
DO1585	f	347,2
DO2263	m	22,0
GS0032	f	112,7
GS0053	m	907,6
GS0064	f	802,5
GS0068	m	976,2
GS0074	m	542,5
GS0085	m	93,9
GS0092	m	890,5
GS0095	m	45,9
GS0096	m	1568,4
GS0097	m	1696,1
GS0105	m	1185,5
GS0113	n. d.	801,7
Mittelwert (ohne farblich markierte)		661,5
Standardabweichung (o. f. m.)		494,9

Berechnet man die Mittelwerte für die beiden Skelettserien getrennt, so ergeben sich für Knochen aus Dorste (n=7) 332,8 pg E2/g, für Knochen aus Goslar (n=11) 870,7 pg E2/g.

Nach Geschlechtern getrennt ergeben sich als Mittelwert für Knochen weiblicher Individuen (n=6) 263,9 pg E2/g, als Mittelwert für Knochen männlicher Individuen (n=11) 784,7 pg E2/g. Dies widerspricht den Erwartungswerten, nach denen die E2-Werte weiblicher Individuen erheblich höher liegen sollten, als die der männlichen.

Doppelbestimmungen/Interassay-Präzision

Zur Bestimmung der Interassay-Präzision werden die Messwerte der Knochen einiger Individuen betrachtet, die doppelt, in einem Fall dreifach extrahiert bzw. in den Assay eingesetzt wurden (Tab. 4.3.2.B).

Tab. 4.3.2.B Messwerte für E2 in historischen Knochen, Doppel- und Dreifachmessungen für ausgewählte Individuen.

Individuum	Extrakt	C (E2) [pg/g Probe]	CV [%]
BO0001	BO0001/01	3007,8	
BO0001	BO0001/01	2052,5	
BO0001 Mittelwert		2530,2	26,7
DO0058	DO0058/01	1465,0	
DO0058	DO0058/02	540,9	
DO0058	DO0058/03	120,7	
DO0058 Mittelwert		708,9	97,0
GS0053	GS0053/01	1410,2	
GS0053	GS0053/01	405,0	
GS0053 Mittelwert		907,6	78,3
GS0068	GS0068/01	1217,5	
GS0068	GS0068/01	734,8	
GS0068 Mittelwert		976,2	35,0

Bei Individuum DO0058 wurden drei unabhängige, technisch identische Extraktionen durchgeführt, die zu vollkommen unterschiedlichen Messwerten im RIA geführt haben. Der Wert von CV für die Interassay-Präzision liegt mit 97 % weit außerhalb der zulässigen Grenzen für einen präzisen Assay (i.d.R. max. 25 %). Die Messwerte der restlichen Individuen, die jeweils aus einem Extrakt in voneinander unabhängigen Assays gewonnen wurden, unterscheiden sich intra-individuell ebenfalls z.T. erheblich, die Differenzen sind teils sogar größer als die inter-individuellen Unterschiede. Auch hier liegen die CV-Werte für die Interassay-Präzision über den tolerablen 25 %.

Bezug zur histologischen Erhaltung der Knochen und der Erhaltung von aDNA

Dass der Erhaltungszustand historischer Knochen durch die Bewertung histologischer Dünnschliff-Präparate der Knochen abgeschätzt werden kann, ist in der Literatur mehrfach belegt (z. B. Hedges et al. 1995, Schoeninger et al. 1989). Fabig (2002) konnte zeigen, dass spurenelementanalytische Messergebnisse in historischem Knochen eher die diagenetischen Veränderungen der Knochensubstanz, als ernährungsbedingte Variabilitäten der Elementverteilung widerspiegeln. Er verwendete eine an Hedges et al. (1995) angelehnte Einteilung der Erhaltung in drei Histologiegruppen nach dem geschätzten prozentualen Flächenanteil intakter Knochenbinnenstruktur im Kompaktaquerschnitt. Knochen mit einem

Anteil intakter Knochenstruktur größer 85 % werden dabei als „gut“ eingeschätzt, mit einem Anteil intakter Knochenstruktur von 15 % bis 85 % als „mittel“, sowie mit einem Anteil intakter Knochenstruktur unter 15 % als „schlecht“. Abb. 4.3.2.A bis C zeigen exemplarisch drei Knochendünnschliffe, die in die genannten Erhaltungsgruppen eingeordnet wurden (Herstellung der Dünnschliffe s. Kap. 3.2.1.2).

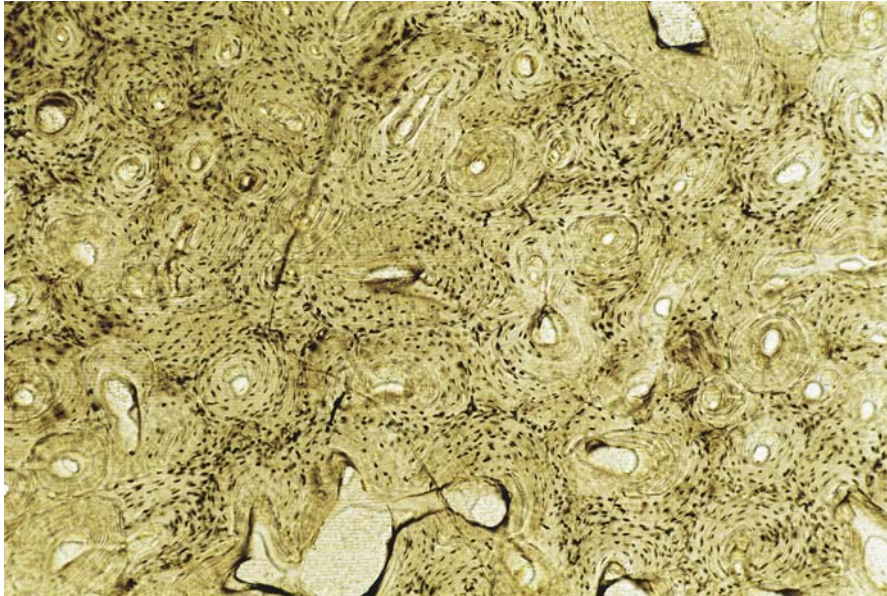


Abb. 4.3.2.A Lichtmikroskopische Aufnahme eines Dünnschliffpräparates der Femurkompakta des Individuums GS0095. Der Erhaltungszustand ist mit Zuordnung zu Gruppe 1 als „gut“ zu bezeichnen. Vergrößerung ca. 55 ×

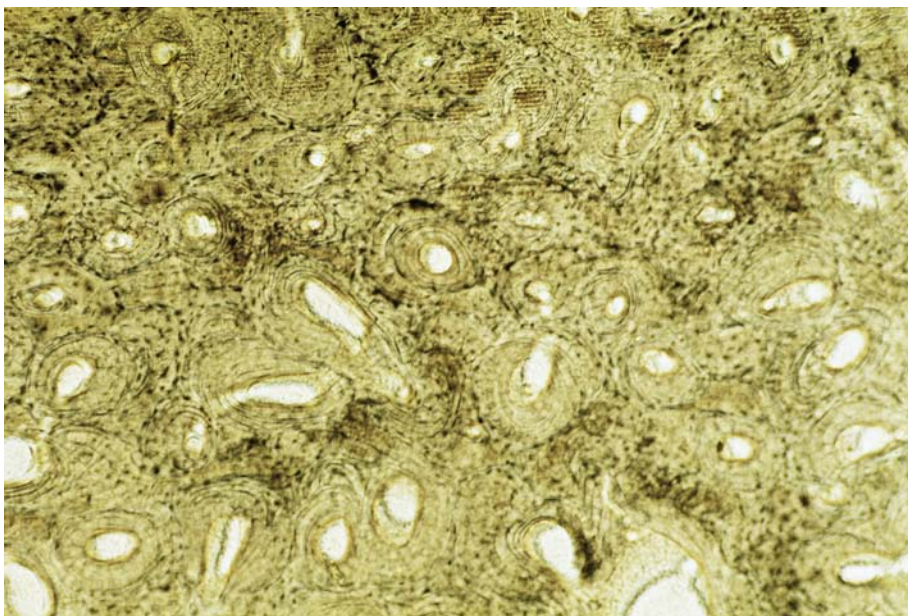


Abb. 4.3.2.B Lichtmikroskopische Aufnahme eines Dünnschliffpräparates der Femurkompakta des Individuums GS0105. Der Erhaltungszustand ist mit Zuordnung zu Gruppe 2 als „mittel“ zu bezeichnen. Vergrößerung ca. 55 ×

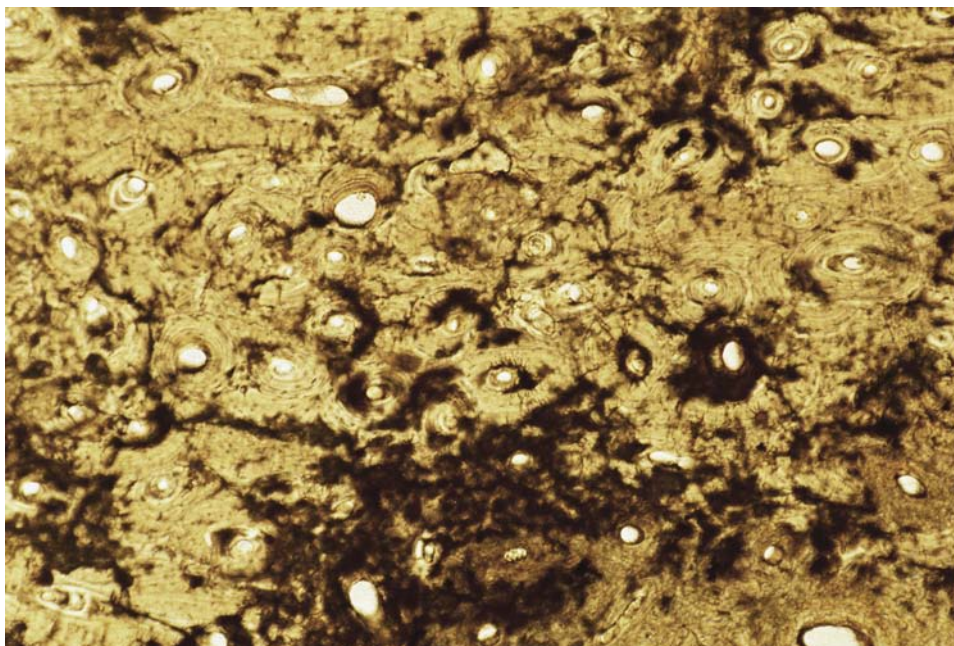


Abb. 4.3.2.C Lichtmikroskopische Aufnahme eines Dünnschliffpräparates der Femurkompakta des Individuums GS0064. Der Erhaltungszustand ist mit Zuordnung zu Gruppe 3 als „schlecht“ zu bezeichnen. Vergrößerung ca. 55 ×

In dieser Untersuchung soll geprüft werden, ob die erzielten Messergebnisse für die E2-Konzentrationen in den historischen Knochen mit ihrem Erhaltungszustand, phänomenologisch am histologischen Bild ermittelt, in einem Zusammenhang stehen. Dazu sind in Tab. 4.3.2.C Messwerte und Histologiegruppen gegenübergestellt. Ergänzt wird die Tabelle durch Angaben zur Erhaltung von aDNA, die aus der PCR-Amplifikationsfähigkeit der DNA aus Extrakten der Knochen im Rahmen von Untersuchungen von Bramanti (1999) und Schultes (2000) (sowie pers. Mitt. von Hummel, 2004) gewonnen wurden. Auch die Erhaltung von aDNA wird hier in drei Gruppen von „gut“, „mittel“ und „schlecht“ eingeteilt.

Tab. 4.3.2.C Gegenüberstellung der Messwerte für E2 in historischem Knochen zur Einordnung der Knochenhistologien und der Erhaltung von aDNA in Erhaltungsgruppen „gut“ (= 1), „mittel“ (= 2) und „schlecht“ (= 3). Gelb unterlegte Individuen liefern E2-Messwerte im Bereich der Leerkontrollen.

Individuum	Histologie	DNA-Erhaltung	C (E2) [pg/g Probe]
DO0035	2	3	541,3
DO0058	3	1	708,9
DO0199	2	1	87,9
DO0300	2	2	62,9
DO0902	1	1	410,8
DO0903	2	3	170,3
DO0905	2	1	28,4
DO1585	2	2	347,2
GS0032	1	3	112,7
GS0053	2	1	907,6
GS0064	3	1	802,5

GS0068	1	1	976,2
GS0095	1	1	45,9
GS0096	1	1	1568,4
GS0097	1	1	1696,1
GS0105	2	1	1185,5

Die statistische Prüfung mittels linearer Regression ergibt keinen Zusammenhang für den mikroskopischen Erhaltungszustand der Knochen anhand der Histologien und die in den Knochenextrakten gemessenen Konzentrationen von E2 ($r_{xy} = -0,158$). Auch der Zustand der aDNA korreliert nicht mit den gemessenen E2-Konzentrationen ($r_{xy} = -0,413$). Vergleicht man die für Abb. 4.3.2.A bis C ausgewählten Knochenhistologien mit den tabellierten Werten, so werden die statistischen Ergebnisse unterstützt: GS0095 (Abb. 4.3.2.A) zeigt sowohl eine gut erhaltene Knochenbinnenstruktur, als auch gute aDNA-Erhaltung, jedoch einen E2-Messwert, der in den Bereich der Leerkontrollen fällt, somit strenggenommen keinen Nachweis für die Erhaltung von E2. Der histologisch als „mittel“ eingestufte Knochen von GS0105 (Abb. 4.3.2.B), der ebenfalls eine gute DNA-Erhaltung aufweist, liefert dagegen einen sehr hohen Messwert für E2. Der als histologisch „schlecht“ einzustufende Knochen von Individuum GS0064 liefert letztendlich einen mittleren Messwert für E2 im RIA, bei guter aDNA-Erhaltung.

4.4 Ergebnisse der Validierungsexperimente

4.4.1 Vergleich der E2-Messungen in Blutproben und rezentem Knochen

Für einige Individuen lagen neben den rezenten Knochenproben auch Proben von Leichenblut vor (Tab. 4.4.1.A). In den betreffenden Knochen wurden im Mittel $1690,8 \pm 394,7$ pg E2 pro Gramm Knochen gemessen, in den Blut- bzw. Knochenmarksproben im Mittel $2019,0 \pm 985,2$ pg E2 pro Gramm Blut/Knochenmark (Tab 4.4.1.B).

Tab. 4.4.1.A Rohdaten der RIA-Messwerte für die Messung von E2 in rezenten menschlichen Knochen und Leichenblut bzw. Knochenmark der selben Individuen. Orange unterlegte Messwerte fallen aus dem linearen Bereich der Standardkurve und können nicht zum Vergleich herangezogen werden. Grün unterlegte Werte fließen in Tab. 4.4.1.B ein.

Extrakt	Probenart	C (E2) [pg/g Probe]
W34/01	Rezentknochen	1720,2
W34/01	Rezentknochen	706,4
W34/01 Mittelwert		1213,3
W34B/01	Leichenblut	4194,5
W34B/01	Leichenblut	2976,2
W49/01	Rezentknochen	5264,2
W49/01	Rezentknochen	2349,7
W49/02	Rezentknochen	2451,0

W49/02	Rezentknochen	1659,8
W49 Mittelwert	Rezentknochen	2153,5
W49B/01	Leichenblut	1609,8
W50/01	Rezentknochen	2355,9
W50/01	Rezentknochen	1603,8
W50B/01	Leichenblut	2778,9
W50B/01	Leichenblut	2728,7
W50B/01 Mittelwert	Leichenblut	2753,8
W54/01	Rezentknochen	2377,8
W54/01	Rezentknochen	1401,2
W54B/01	Leichenblut	2989,0
W54B/01	Leichenblut	2866,1
W54B/01 Mittelwert	Leichenblut	2927,6
W55/01	Rezentknochen	2650,6
W55/01	Rezentknochen	1596,2
W55B/01	Leichenblut	958,0
W65/01	Rezentknochen	2376,2
W65/01	Rezentknochen	2177,0
W65KM/01	Knochenmark	888,3

Tab. 4.4.1.B Gegenüberstellung der RIA-Messwerte für die Messung von E2 in rezenten menschlichen Knochen und Leichenblut bzw. Knochenmark der selben Personen.

Personen	C (E2) [pg/g Knochen]	C (E2) [pg/g Blut]
W34	1213,3	2976,2
W49	2153,5	1609,8
W50	1603,8	2753,8
W54	1401,2	2927,6
W55	1596,2	958,0
W65	2177,0	888,3
Mittelwert	1690,8	2019,0
Standardabweichung	394,7	985,2

Der für die einzelne Knochenmarkprobe gemessene Wert von 888,3 pg E2 pro Gramm fällt zwar niedriger aus als die meisten anderen Messwerte für das Leichenblut, ist aber nicht allein verantwortlich für die hohe Standardabweichung, auf Grund deren die Mittelwerte kaum vergleichbar sind. Tendenziell können im Leichenblut höhere E2-Messwerte beobachtet werden als im Knochen, statistisch unterscheiden sich die beiden Mittelwerte jedoch nicht [Statistische Prüfung über T-Test für unabhängige Stichproben: $T = -0.7575$ fällt bei der Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$ nicht in den Ablehnungsbereich der H_0 , die damit angenommen wird. H_0 nimmt an, dass die Mittelwertdifferenz $(\mu_1 - \mu_2) = 0$ ist.].

Die gemessenen Werte von Knochen und Blut korrelieren auch nicht miteinander ($r_s = -0,14$, geprüft durch einen Rangkorrelationstest nach Spearman; kleine Stichprobe, keine Normalverteilung).

4.4.2 RIA-E2-Messungen in rezenten Tierknochen

Nicht alle Messungen, die an den Rattenknochen erfolgten, konnten ausgewertet werden, da bei einem Assay hohe Messwerte (über den Werten der Knochenasche, vgl. 4.4.5) in den Leerkontrollen festgestellt wurden. Die Messwerte des betroffenen Assays wurden verworfen. Die verbleibenden Ergebnisse erlauben den Vergleich der Messwerte von jeweils n=4 Individuen.

Auswirkungen der Extraktion von Estradiol aus Knochen mit und ohne Entfernung des Knochenmarks

Die Messwerte in Tab. 4.4.2.A wurden in einer Pilotstudie zusammen mit I. Balzer in der Experimentellen und Klinischen Endokrinologie ermittelt.

Sie wurden aus Extrakten, die von I. Balzer angefertigt wurden, gemessen, und sind daher mit den Werten in Tab. 4.4.2.B nicht direkt vergleichbar. Die Extraktion erfolgte hier durch einfaches Kochen der Knochen, Homogenisation in flüssigem Stickstoff, Extraktion in Ether, und anschließendem direkten Einsatz eines Aliquots eingengten Ethers in den RIA (vgl. 3.2.1.3).

Tab. 4.4.2.A Gemessene E2-Konzentrationen in Rattenknochen mit und ohne Entfernung des Knochenmarks.

Extrakt	Knochenmark	C E2 [pg/g]
R08/99	entfernt	1308,9
R09/99	entfernt	2823,4
R10/99	entfernt	413,4
R11/99	entfernt	553,7
Mittelwert	entfernt	1274,9
Standardabweichung	entfernt	1104,7
R12/99	belassen	2026,6
R13/99	belassen	2933,4
R14/99	belassen	3360,0
R15/99	belassen	777,3
Mittelwert	belassen	2274,3
Standardabweichung	belassen	1142,4

Der Mittelwert der E2-Konzentrationen in Knochen, bei denen das Knochenmark nicht entfernt wurde, liegt deutlich höher als bei jenen, bei denen das Knochenmark entfernt wurde. Die Standardabweichungen beider Wertereihen sind allerdings sehr groß, die Wertebereiche überlappen weit. Daher unterscheiden sich die Mittelwerte statistisch nicht [Statistische Prüfung über T-Test für unabhängige Stichproben: $T = -1.2578$ fällt bei der Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$ nicht in den Ablehnungsbereich der H_0 , die damit angenommen wird. H_0 nimmt an, dass die Mittelwertdifferenz $(\mu_1 - \mu_2) = 0$ ist.]

Auswirkungen der intentionalen Verabreichung von E2 im Tierversuch

Für vier der Tiere, denen zwei Wochen lang täglich E2 subkutan injiziert wurde, können die Messwerte zum Vergleich mit den Kontrollen herangezogen werden (Tab. 4.4.2.B). Bei den untersuchten Knochen handelt es sich ausschließlich um solche, bei denen das Knochenmark entfernt wurde.

Tab. 4.4.2.B Gemessene E2-Konzentrationen in Rattenknochen mit und ohne Gabe von E2 *in vivo*. Der gelb unterlegte Messwert fließt nicht in die Berechnung des Mittelwertes ein, da im betreffenden Assay Werte außerhalb des linearen Bereichs der zugehörigen Standardkurve auftraten.

Extrakt	E2-Gabe	C E2 [pg/g]
R01/01	ja	2313,0
R02/01	ja	7377,1
R03/01	ja	9437,7
R04/01	ja	11760,4
Mittelwert	ja	7150,2
Standardabweichung	ja	4727,8
R08/01	nein	2519,4
R09/01	nein	3694,0
R10/01	nein	3229,3
R11/01	nein	7765,5
Mittelwert	nein	4302,1
Standardabweichung	nein	2358,9

Die aus der Tabelle ersichtlichen Mittelwerte unterscheiden sich statistisch nicht signifikant, wobei wiederum sehr hohe Standardabweichungen für die Strichproben bestimmt werden [Statistische Prüfung über T-Test für unabhängige Stichproben: $T = 1.0642$ fällt bei der Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$ nicht in den Ablehnungsbereich der H_0 , die damit angenommen wird. H_0 nimmt an, dass die Mittelwertdifferenz $(\mu_1 - \mu_2) = 0$ ist.]. Trotzdem weisen Tiere mit zusätzlicher E2-Gabe im Mittel höhere Messwerte bei E2-Bestimmungen im Knochen auf. Bei näherer Betrachtung der Einzelwerte fällt auf, dass vor allem der Messwert für Individuum R04 den Mittelwert und die Standardabweichung stark anhebt (Berechnung ohne Extrakt R04/01: Mittelwert 4845,1 pg/g). Zieht man allerdings den (orange unterlegten) Wert für R03 mit in die Betrachtung ein, so scheint mehr der niedrige Wert von R01 ein Ausreißer zu sein.

Extraktionseffizienz

Je zwei Knochen der Individuen R08 – R11 wurden mit der vereinfachten Extraktion über Ether von I. Balzer und mit der Standard-Extraktion dieser Untersuchung (Grundprotokoll B,

Var. 1, vgl. Kap. 3.2.2) aufgeschlossen, so dass ein grober Vergleich der beiden Methoden möglich ist (Tab. 4.4.2.C).

Tab. 4.4.2.C Gemessene E2-Konzentrationen in Rattenknochen nach vereinfachter Extraktion mit Ether und komplexer Extraktion mit SPE nach Grundprotokoll B, Var. 1

Individuum	C E2 [pg/g] Ex Ether	C E2 [pg/g] Ex B Var. 1
R08	1308,9	2313,0
R09	2823,4	7377,1
R10	413,4	9437,7
R11	553,7	11760,4
Mittelwert	1274,9	7722,1
Standardabweichung	1104,7	4026,1

Die durchgängig höheren Werte für E2 werden nach der komplexen Extraktionsmethode, die im Rahmen dieser Art entwickelt wurde, erzielt. Somit liegt auch der Mittelwert der E2-Konzentrationen für diese Methode erheblich höher. Auch statistisch unterscheiden sich die beiden Mittelwerte signifikant [Statistische Prüfung über T-Test für unabhängige Stichproben: $T = -3,0885$ fällt bei der Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$ in den Ablehnungsbereich der H_0 , die damit verworfen wird. H_0 nimmt an, dass die Mittelwertdifferenz $(\mu_1 - \mu_2) = 0$ ist.]. Bemerkenswert ist allerdings, dass hohe Messwerte innerhalb einer Extraktionsreihe, z.B. der höchste Wert für die Ether-Extraktion für R09, nicht mit den Werten in der anderen Extraktionsreihe korrelieren ($r_s = -0,600$), die Messergebnisse statistisch gesehen also zufällig sind.

4.4.3 RIA-E2-Messungen in Bodenproben

Alle Extrakte wurden nach Extraktionsmethode B, Var. 1, angefertigt (vgl. Kap. 3.2.2).

Die Proben verschiedener Böden (Sandboden, Schwarzerde, schwach saurer und saurer Boden) unterschiedlicher Standorte (vgl. 3.1.3) liefern im RIA alle „E2“-Messergebnisse, die im Mittel bei $401 \pm 72,3$ pg „E2“ pro Gramm Boden liegen. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Bodentyp und Messwerten lässt sich in der vorliegenden Stichprobe nicht feststellen.

Da in Bodenproben kein Estradiol des menschlichen Endokriniums zu erwarten ist, belegen die Messwerte eine mangelnde Spezifität des verwendeten Antikörpers #22.2. Zur Prüfung dieses Sachverhaltes wurden zwei Extrakte von Bodenproben über HPLC fraktioniert und die „E2“-Messwerte für die einzelnen Fraktionen bestimmt (4.4.6, Prüfung der Spezifität).

Tab. 4.4.3.A RIA-Messwerte der Bodenproben. Keine der Bodenproben liefert Messwerte, die aus dem linearen Bereich der korrespondierenden Standardkurve im Assay herausfallen, so dass alle in den Assay eingesetzten Extrakte gelistet sind.

Extrakt	Bodentyp	pH	C („E2“) [pg/g Probe]
B01/02	Schwarzerde, Oberboden	ca. 7	472,4
B02/01	Schwarzerde, Unterboden	ca. 7	474,5
B03/02 ¹⁾	Sandboden	ca. 5	1814,2
B03/02	Sandboden	ca. 5	449,1
B04/01	saurer Boden, Unterboden	ca. 5	335,8
B05/01	schwach saurer Boden, Unterboden	ca. 6,5	316,1
B06/01	schwach saurer Boden, Oberboden	ca. 6,5	358,0
Mittelwert			401,0
Standardabweichung			72,3

Anm. 1) Der Wert für B03/02, RIA vom 05.05., fließt in die Berechnung des Mittels und der Standardabweichung nicht ein, da der CV der Messwerte für die höchste Verdünnung (Einsatz von 10 µl in den Assay) mit 67,5 % weit über der 25 %-Grenze liegt (Grund: Ausreißer in einer Messung, vgl. Tab. 8.4.E)

4.4.4 RIA-E2-Messungen in Pflanzenproben

Die Proben verschiedener Pflanzen (Roggenmehl, Roggenmehl mit Zusatz von Mutterkorn und Ackerunkräutern, Soja-Mehl, Rotklee-Samen, Saatwicke) liefern im RIA alle E2-Messergebnisse, die wesentlich höher als die durchschnittlich im historischen Knochen gefundenen Konzentrationen liegen. Keiner der gemessenen Pflanzen-Extrakte liefert Werte unter 950 pg „E2“ pro Gramm Mehl bzw. Samen (Tab. 4.4.4.A). Alle Extrakte wurden nach Extraktionsmethode B, Var. 1, angefertigt (vgl. Kap. 3.2.2).

Reines Roggenmehl in fein gemahlenem Zustand liefert Messwerte von 1652 pg „E2“ pro Gramm, woran auch der Zusatz von Mutterkorn nichts ändert (Mittelwert 1617,2 pg „E2“ pro Gramm Mehl), was ein Indiz dafür ist, dass in den Sklerotien des Mutterkorns keine hier nachweisbaren Mengen Substanzen enthalten sind, die mit dem Antikörper #22.2 unspezifisch reagieren.

Ein ganz anderes Bild ergeben Extrakte der weiteren Pflanzenproben. Sowohl die mit der Ackerunkraut-Mischung versetzten Roggenmehlproben, als auch Soja, Rotklee und Saatwicke liefern so hohe Messwerte, dass diese in der eingesetzten Menge aus dem linearen Messbereich der im Assay routinemäßig erstellten Standardkurve herausfallen. Drei ausgewählte Proben wurden mit niedrigerem Einsatz in den Assay nochmals gemessen, um technisch korrekte Konzentrationsbestimmungen zu gewinnen. Dennoch zeigen die sehr hohen „E2“-Messwerte auch der nicht korrekt bestimmbareren Proben die gleiche Tendenz. Alle diese Pflanzen zeigen (C05-C12) im Mittel Messwerte von $5001,7 \pm 1406,7$ pg „E2“ pro Gramm Samenmaterial. Für alle getesteten Pflanzenarten sind Inhaltsstoffe mit estrogenem

Wirkung bzw. Struktur bekannt. Diese Messwerte belegen wiederum eine mangelnde Spezifität des verwendeten Antikörpers #22.2. Zur Prüfung dieses Sachverhaltes wurden drei ausgewählte Extrakte der Pflanzenproben über die HPLC fraktioniert und die „E2“-Messwerte für die einzelnen Fraktionen bestimmt (4.4.6, Prüfung der Spezifität).

Tab. 4.4.4.A RIA-Messwerte der Pflanzenproben. Die orange unterlegten Extrakte liefern Messwerte, die aus dem linearen Bereich der korrespondierenden Standardkurve im Assay herausfallen.

Extrakt	Art der Pflanzenprobe	C (E2) [pg/g Probe]
C01/01	Roggen, fein gemahlen	1651,9
C02/01	Roggen, grob gemahlen	953,2
C03/01	Roggen, fein, mit 5 % Mutterkorn-Besatz	1803,2
C04/01	Roggen, fein, mit 10 % Mutterkorn-Besatz	1431,2
C05/01	Roggen, fein, mit 5 % Ackerunkraut-Besatz	4944,1
C06/01	Roggen, fein, mit 10 % Ackerunkraut-Besatz	2715,0
C07/01	Soja, fein gemahlen	3992,2
C08/01	Soja, fein gemahlen	4082,2
C09/01	Rotklee-Samen, fein gemahlen	6549,4
C09/01	Rotklee-Samen, fein gemahlen	4599,5
C10/01	Rotklee-Samen, grob gemahlen	5231,6
C10/01	Rotklee-Samen, grob gemahlen	3608,5
C11/01	Saatwicke, fein gemahlen	6495,5
C12/01	Saatwicke, grob gemahlen	7399,5
C12/01	Saatwicke, grob gemahlen	5401,4

4.4.5 E2-Bestimmungen mit RIA in Knochenasche

In insgesamt vier Extrakten (alle Extrakte wurden nach Extraktionsmethode B, Var. 1, angefertigt, vgl. Kap. 3.2.2) aus Knochenasche wurden E2-Werte im RIA bestimmt (Tab. 4.4.5.A). Alle Werte liegen im Bereich der in den RIAs erzielten Werte der Leerkontrollen, geben also Werte für Proben wieder, in denen der Antikörper weder spezifisch E2 noch unspezifisch andere Substanzen bindet. Die Knochenasche ist E2-frei, was der Erwartung entspricht, keinerlei organische Substanz in den veraschten Proben zu detektieren.

Die im Mittel mit $33,4 \pm 6,3$ pg E2 pro Gramm Knochenasche festgestellten Werte geben das Grundrauschen des verwendeten Assays wieder. Proben, deren Messwerte ebenfalls in diesen Bereich fallen, können als „leer“ bzw. frei von E2 angesehen werden (vgl. 4.3.2).

Tab. 4.4.5.A Messwerte für E2 in Knochenasche. Keine der Knochenascheproben liefert Messwerte, die aus dem linearen Bereich der korrespondierenden Standardkurve im Assay herausfallen, so dass alle in den Assay eingesetzten Extrakte gelistet sind.

Extrakt	Typ	C (E2) [pg/g Probe]
A01/01	Knochenasche, rezenter Knochen, m, 67 Jahre	42,2
A01/02	Knochenasche, rezenter Knochen, m, 67 Jahre	32,5
A01/03	Knochenasche, rezenter Knochen, m, 67 Jahre	27,3
A02/01	Knochenasche, gepoolt	31,5
Mittelwert		33,4
Standardabweichung		6,3

4.4.6 Prüfung der Spezifität der E2-Bestimmungen mit RIA durch HPLC

Durch die Fraktionierung von Extrakten mittels HPLC mit anschließender Bestimmung der Fraktionen, in denen der RIA positive Signale für E2 zeigt, lässt sich die Spezifität des Antikörpers im RIA testen (vgl. Kap. 3.2.3.3).

Zunächst wurde das chromatographische System auf die Darstellung hoher E2-Mengen optimiert. Vor der Bestimmung der Proben auf einer neuen HPLC-Säule wurde zunächst der Standard gemessen (Injektion 100 µl Stammlösung 1 mg E2/1 ml MeOH, d.h. 100 µg E2 absolut). Das in dieser Menge während des HPLC-Laufs detektierbare E2 eluierte bei $RT = 7,290$ min (Abb. 8.5.A im Anhang). Nach den erfolgten Messungen der Proben wurde erneut ein E2-Standard aufgetrennt, bei dem der E2-Peak bei einer Retentionszeit von $RT = 7,291$ min bestimmt werden konnte (Abb. 8.5.B im Anhang). Das chromatographische System befand sich damit von der ersten Standard-Messung auf der ersten Säule bis zum Abschluss mit der zweiten Standard-Messung in einem sehr stabilen, einheitlichen Zustand. Der E2-Anteil der Probenextrakte ist somit in der Fraktion der 7.-8. und der 8.-9. Minute zu erwarten, so dass in diesen Fraktionen die jeweils höchsten Messwerte im RIA beobachtet werden sollten. Die Messwerte sind in Tab. 4.4.6.A zusammengefasst. Die zugrundeliegenden Werte stammen aus einem einzelnen Einsatz in den RIA (25 µl), die weiteren zur Verfügung stehenden Werte (aus 50 µl und 10 µl Einsatz) wurden lediglich zur Prüfung der Linearität der Messwerte/Verdünnbarkeit der Proben herangezogen (vgl. 3.2.3.2). Nicht verdünnbare Proben oder außerhalb der Standardkurve des Assays liegende Messwerte wurden verworfen).

In Abb. 4.4.6.A sind die E2-Messwerte der einzelnen Fraktionen des Standards grafisch in das HPLC-Chromatogramm eingetragen. Die Fraktionen sind dabei zeitgleich zur RT angeordnet, so dass sich HPLC-Signale und E2-Fraktionsmesswerte direkt vergleichen lassen.

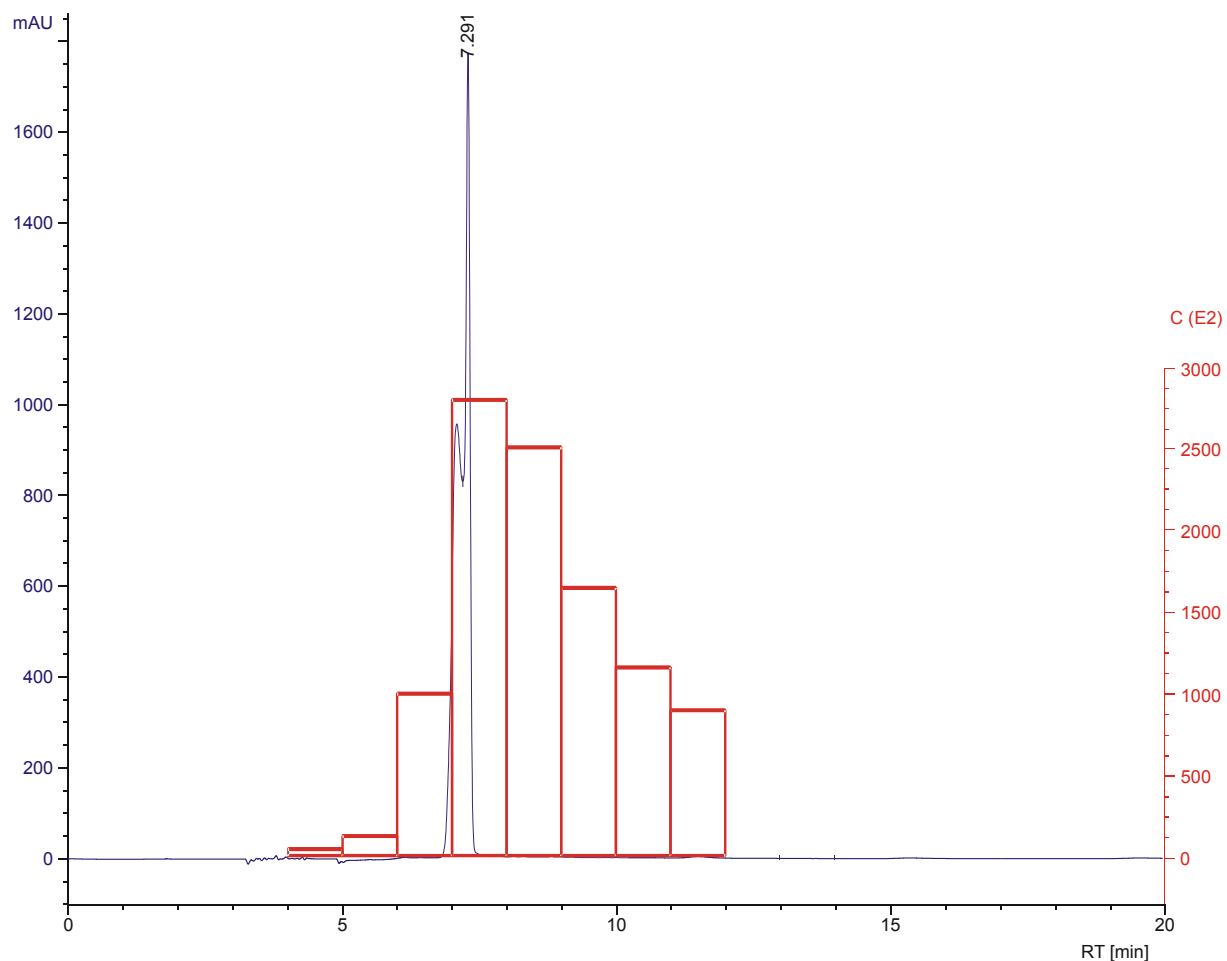


Abb. 4.4.6.A HPLC-Chromatogramm des E2-Standards (100 µg Gesamtinjektion) mit Overlay der im RIA gemessenen E2-Konzentrationen der einzelnen Fraktionen (zeitgleich zur RT angeordnet, rot). Absorption bei $\lambda = 280$ nm.

Erwartungsgemäß werden in den Fraktionen der 7.-8. und der 8.-9. Minute die höchsten E2-Messwert bestimmt. Allerdings befindet sich so viel E2-Standard im System, dass Substanz auch noch in die folgenden Fraktionen verschleppt wird, was allerdings für die Fragestellung unproblematisch ist, da die eigentliche RT und damit Fraktion der E2-Elution eindeutig bestimmt ist.

Die beiden in der Folge bestimmten Leerkontrollen, einmal ein Lauf mit reinem Fließmittel (LFM/01) sowie einmal mit einem Leerextrakt (L06/01), der allen Extraktionsschritte analog der Knochen unterzogen wurde, zeigen keine E2-Signale (vgl. Abb. 8.5.C und D im Anhang).

Von rezenten Knochen wurden zwei Extrakte fraktioniert, mit Nr. M11/06 ein deutlich getrübtter Extrakt (Trübungen problematisch für RIA, vgl. Kap. 5.1.3), und mit M07/05 ein klarer Extrakt (Chromatogramme 8.5.E und F im Anhang). Der klare Extrakt zeigt den höchsten Messwert in der Fraktion der 7.-8. Minute, was der Erwartung unter der Annahme, der Antikörper im RIA reagiert spezifisch mit E2, entspricht. Der getrübtte Extrakt weist

dagegen einen höheren Messwert in der Fraktion der 9.-10. Minute auf (Abb. 4.4.6.B). Dass es sich wahrscheinlich nicht um reine Substanzverschleppung durch die Matrix des Extraktes handelt, zeigt der Messwerte-Verlauf des dotierten rezenten Knochens (Nr. M07/06, Chromatogramm in Abb. 8.5.G), der in der betreffenden Fraktion einen niedrigen Messwert zeigt.

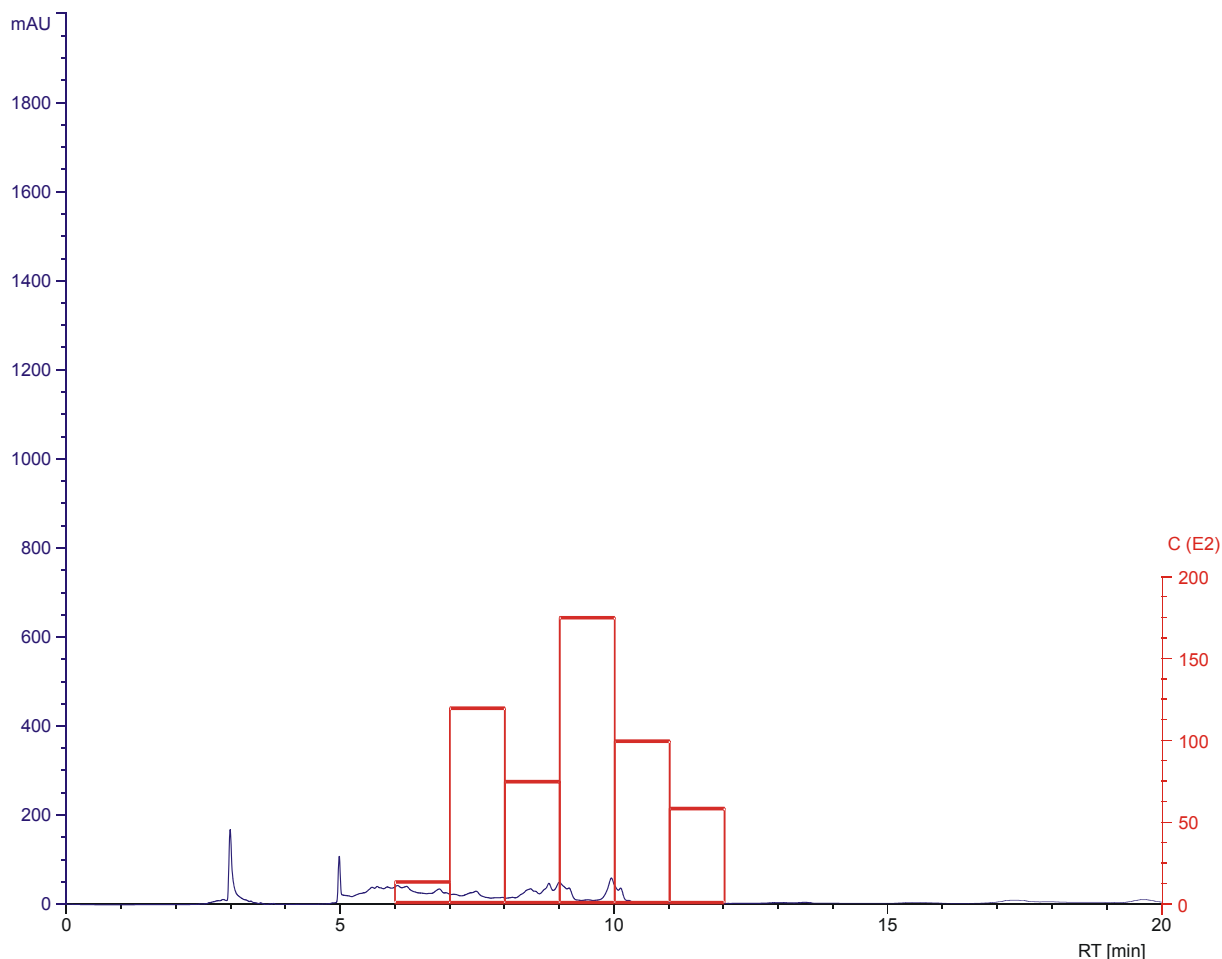


Abb. 4.4.6.B HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus rezentem Knochen (Individuum M11) mit Overlay der im RIA gemessenen E2-Konzentrationen der einzelnen Fraktionen (zeitgleich zur RT angeordnet, rot; anderer Maßstab als Abb. 4.4.6.A, C und D!). Absorption bei $\lambda = 280$ nm.

Die Fraktionen des Extraktes aus den historischen Knochen GS0095 und GS0097 zeigen beiden sehr niedrige Messwerte für E2 in den fraglichen Zeitbereichen, in denen E2 eluieren sollte. Die Fraktionierung verdünnt die Extrakte nicht unerheblich, so dass die Messwerte hier bis in den Bereich der Leerkontrollen sinken, aber dennoch Spitzen in der Fraktion der 7.-8. Minute zeigen.

Die Fraktionen der Extrakte aus dem historischen Knochen BO0002 der Anna von Brandenburg (zweimalige Extraktion und zweimalige Messung zur Absicherung) zeigen, nach den hohen Messwerten im einfachen Assay zu erwarten (vgl. Kap. 4.3.2), hohe Werte in

den Fraktionen der 7.-8. Minute, mit etwas Verschleppung in die folgende Fraktion (Abb. 4.4.6.C). Allerdings findet man im zugehörigen HPLC-Chromatogramm keine Entsprechung in Form eines Peaks um $RT = 7,290$, weil die absolute Menge E2 noch unter der Detektionsgrenze der HPLC liegt. Ein sichtbarer Peak tritt hier bei $RT = 7,593$ min auf. (Chromatogramme im Anhang, Abb. 8.5.H – L).

Dieser Sachverhalt ist damit zu erklären, dass die RIA-Messwerte der E2-Standards und der Dotierungen nicht vollständig den Verhältnissen der Absorptionswerte in den Chromatogrammen entsprechen, da sie weit oberhalb des linearen Messbereichs gemäß der Standardkurve des RIA liegen.

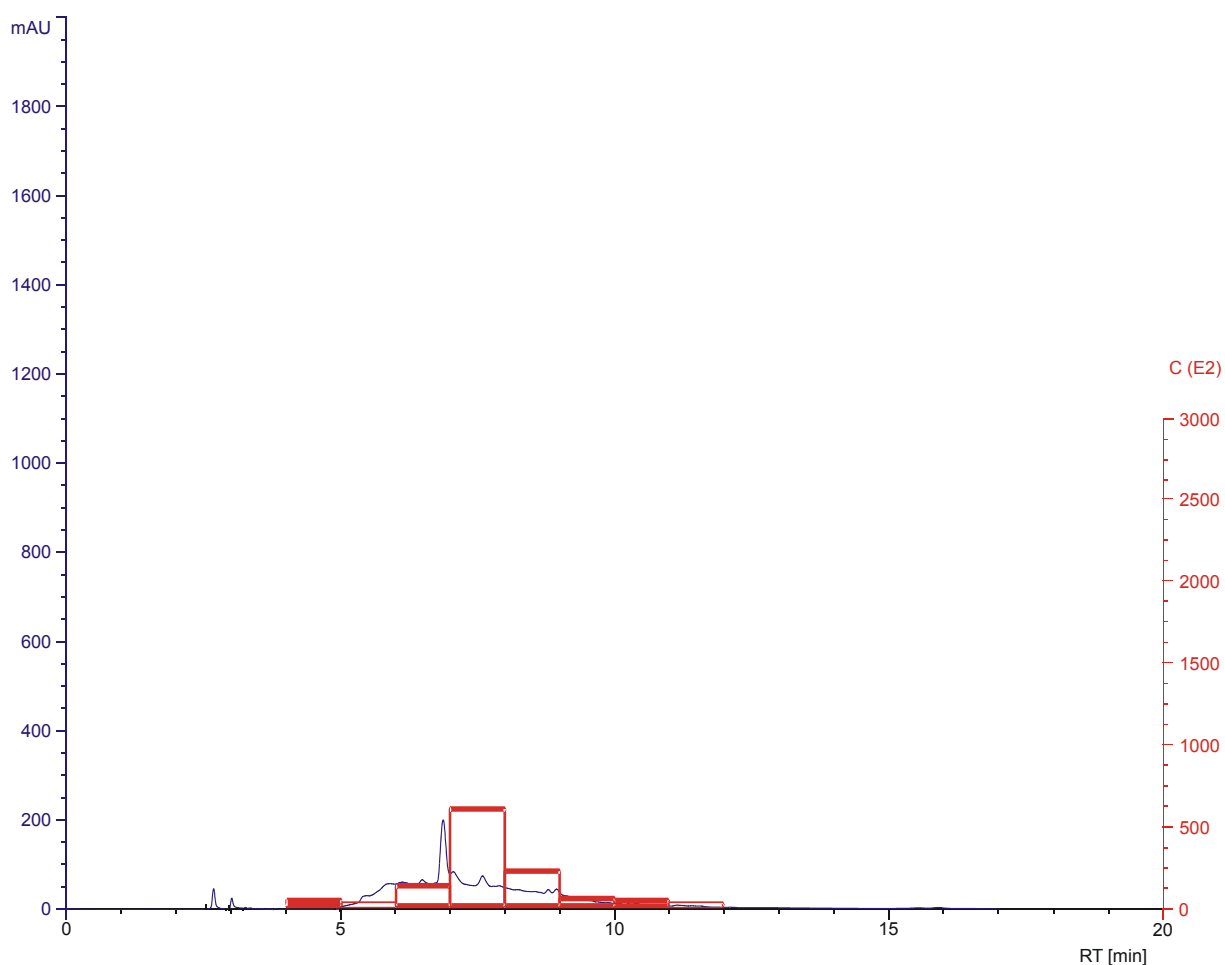


Abb. 4.4.6.C HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus historischem Knochen (Individuum BO0002, Anna von Brandenburg) mit Overlay der im RIA gemessenen E2-Konzentrationen der einzelnen Fraktionen (zeitgleich zur RT angeordnet, rot). Absorption bei $\lambda = 280$ nm.

Nachdem die RIAs auch in Bodenproben positive Messergebnisse für „E2“ im gleichen ergeben haben (vgl. Kap. 4.4.3), wurden zwei Bodenproben (B01/03, Extrakt aus Schwarzerde; B03/03, Extrakt aus Sandboden) über die HPLC fraktioniert und in den RIA eingesetzt. Auch in den Bodenproben zeigen die Fraktionen der 7.-8. Minute die höchsten

Messwerte und ähneln damit im Gesamtbild den historischen Knochen (vgl. Tab. 4.4.6.A und die Abb. 8.5.M und N im Anhang). Bei Bodenprobe B03/03 tritt im Chromatogramm ein deutlicher Peak bei RT = 9,166 min auf, der in der anderen gestesteten Probe fehlt. Dazu korrespondierend bleiben auch die Messwerte des RIA in den Fraktionen bis zur 10. Minute höher, allerdings nicht signifikant. Ob hier ein Zusammenhang besteht, kann ohne weitere Untersuchung nicht beurteilt werden.

Aus der Reihe der untersuchten Pflanzenextrakte, die besonders hohe „E2“-Messwerte zeigten, wurden die mit Ackerunkraut- (Nr. C04/02) bzw. Mutterkorn-Besatz (Nr. C06/02) versehene Roggenmehle sowie ein Rotkleesamen-Extrakt (C09/02) fraktioniert. Die hohen Messwerte können bei beiden Roggenmehlen in den frühen Fraktionen der 4.-6. Minuten lokalisiert werden (vgl. Abb. 4.4.6.D und Abb. 8.5.O – P im Anhang) und belegen damit, dass hier nicht E2, sondern andere Pflanzeninhaltsstoffe im RIA unspezifisch nachgewiesen werden. Im Falle des Rotkleesamen-Extraktes ließen sich die beiden frühen Fraktionen nicht auswerten.

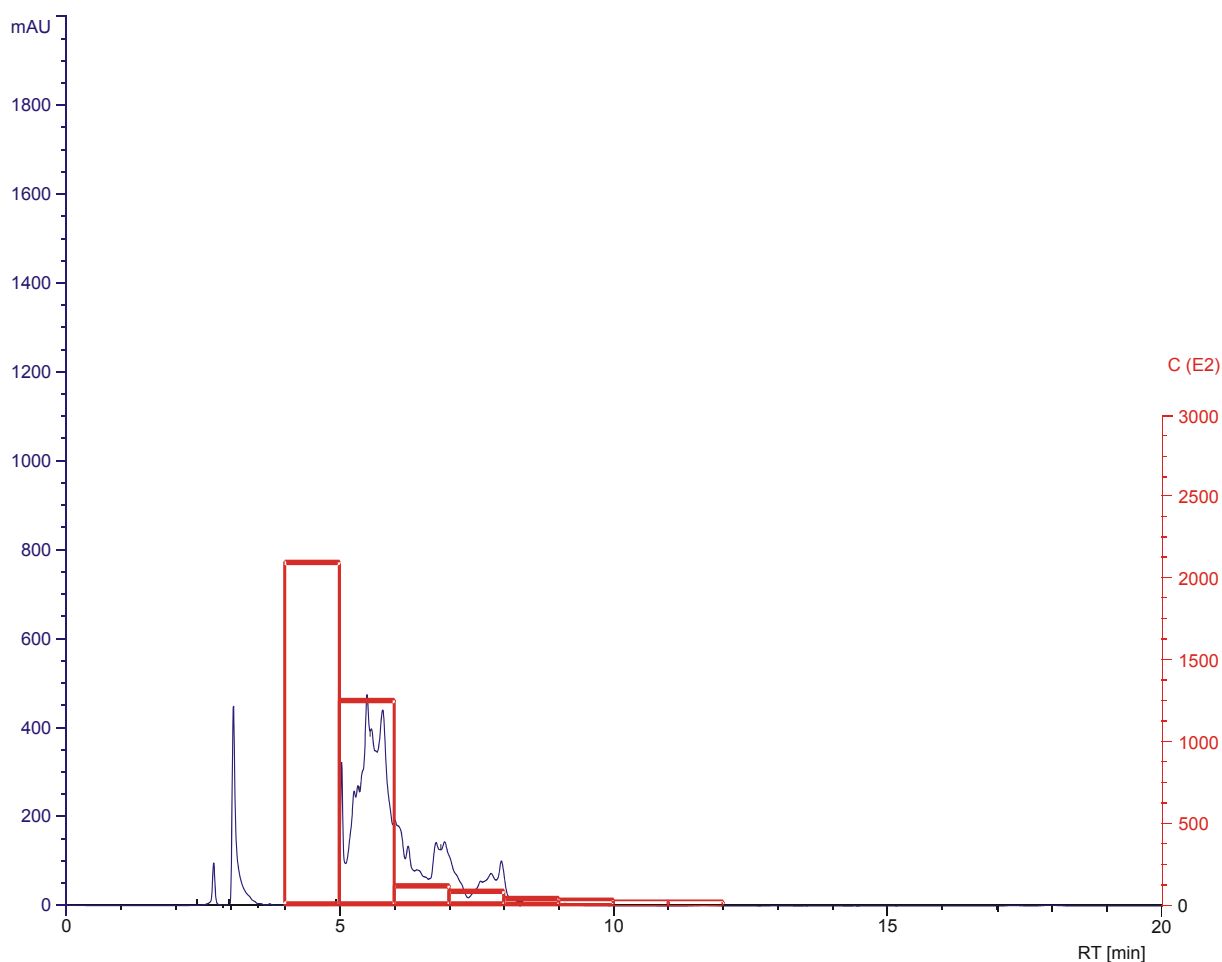


Abb. 4.4.6.D HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus Roggenmehl mit 10 % Ackerunkraut-Besatz mit Overlay der im RIA gemessenen E2-Konzentrationen der einzelnen Fraktionen (zeitgleich zur RT angeordnet, rot). Absorption bei $\lambda = 280 \text{ nm}$.

Reinheit der Substanzpeaks

Zusätzlich zur Messung der E2-Gehalte der Fraktionen mittels RIA lässt sich mit Hilfe der ChemStation-Software der HPLC die Reinheit der Peaks im Chromatogramm charakterisieren. Dazu wird auf die Spektraldaten zurückgegriffen, die der DAD für den in der HPLC-Methode festgelegten Wellenlängenbereich aufgenommen hat. Klassische zweidimensionale Chromatogramme, wie in Kap. 8.5 im Anhang dargestellt, summieren die Signalintensitäten aller Wellenlängen auf oder stellen den Verlauf der Signalintensität nur einer Wellenlänge über die RT dar. Für einen einzelnen Peak eines Chromatogramms lassen sich diese Daten auch dreidimensional auftragen, wie Abb. 4.4.6.E für den E2-Standard (vgl. Abb. 4.4.6.A) zeigt.

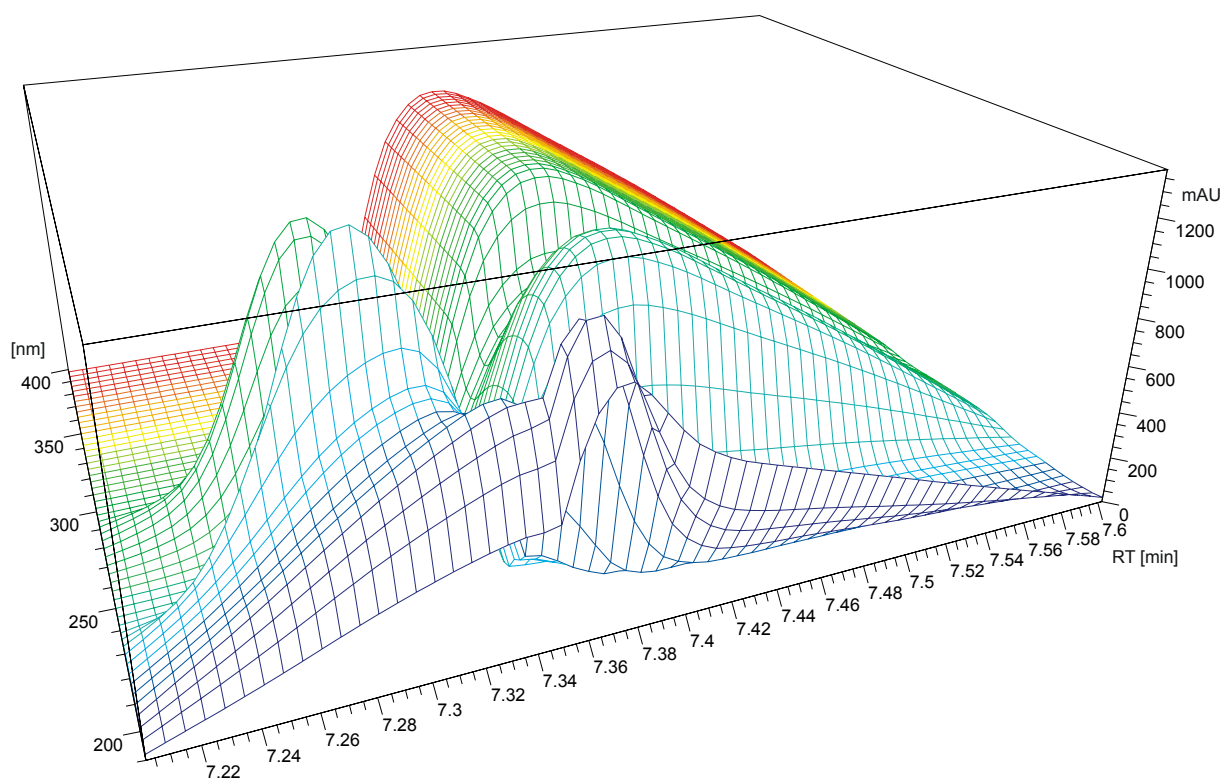


Abb. 4.4.6.E Dreidimensionale Auftragung der gemessenen Signalintensitäten (mAU) über einen ausgewählten Wellenlängenbereich der Absorption (in nm) gegen die Retentionszeit RT = 7,291 min um den Substanz-Peak des E2-Standards (100 µg Gesamtinjektion).

In der dreidimensionalen Darstellung wird zunächst noch deutlicher als im Chromatogramm, dass der E2-Standard von der HPLC als Doppelpack eluiert. Möglicherweise beruht die „Teilung“ des Peaks auf der Entstehung eines E2-Derivates im Lösungsmittel während der Lagerung oder im Fließmittel während des HPLC-Laufs. Der Peak besitzt dadurch jedoch keine hohe Reinheit mehr. Die eigentliche Reinheit des Peaks kann man bestimmen, indem eine Zahl einzelner Spektren an verschiedenen Positionen bzw. Teilen des Peaks

aufgenommen werden: Z.B. am Beginn des Peaks, wenn die Grundlinie des Chromatogramms in den Anstieg übergeht, an der Spitze des Peaks, und am Ende des Peaks, wenn der Abstieg wieder in die Grundlinie übergeht. Repräsentiert ein reiner Peak nur eine Substanz, sollten alle Spektren den gleichen Verlauf zeigen. Abb. 4.4.6.F zeigt insgesamt fünf solcher Spektren des E2-Peaks, die sich vor allem in der Absorption um $\lambda = 280$ nm unterscheiden. Unter anderem aus diesem Verlauf berechnet die Software einen Reinheitsfaktor für den Peak, der beim vorliegenden E2-Standard bei 558,2 liegt, theoretisch aber mindestens 1000,0 betragen sollte. Der Peak ist somit nicht rein.

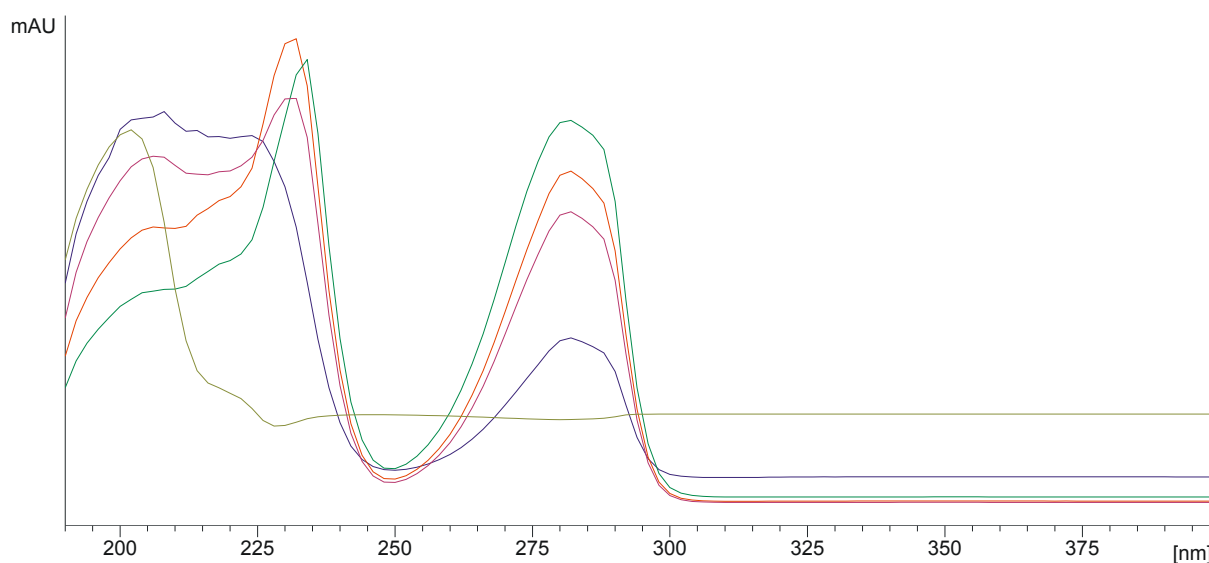


Abb. 4.4.6.F Auftragung von fünf Absorptionsspektren des Peaks des E2-Standards zur Prüfung der Reinheit. Dargestellt ist die Signalintensität (mAU) gegen die Wellenlängen bei RT = 7,209, 7,255, 7,289, 7,322 und 7,349 min (farbig unterschieden).

Beide Darstellungen für den kleinen Peak bei RT = 7,593 min im Chromatogramm des historischen Knochens BO0009 (vgl. Abb. 4.4.6.C) aufgetragen, zeigen, dass der betreffende Peak eine höhere Reinheit aufweist (Abb. 4.4.6.H), die Absorption im Bereich um die Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm im Verhältnis sehr viel geringer ausfällt als beim E2-Standard (Abb. 4.4.6.G). Der berechnete Reinheitsfaktor für den Peak beträgt 914,7 und sollte theoretisch 999,8 betragen, bestätigt damit die höhere Reinheit im Vergleich zum E2-Peak. Dies ist ein zusätzlicher Hinweis, dass in der betreffenden Fraktion des historischen Knochens kein Gemisch von Substanzen vorkommt, die im RIA mit dem E2-Antikörper kreuzreagieren.

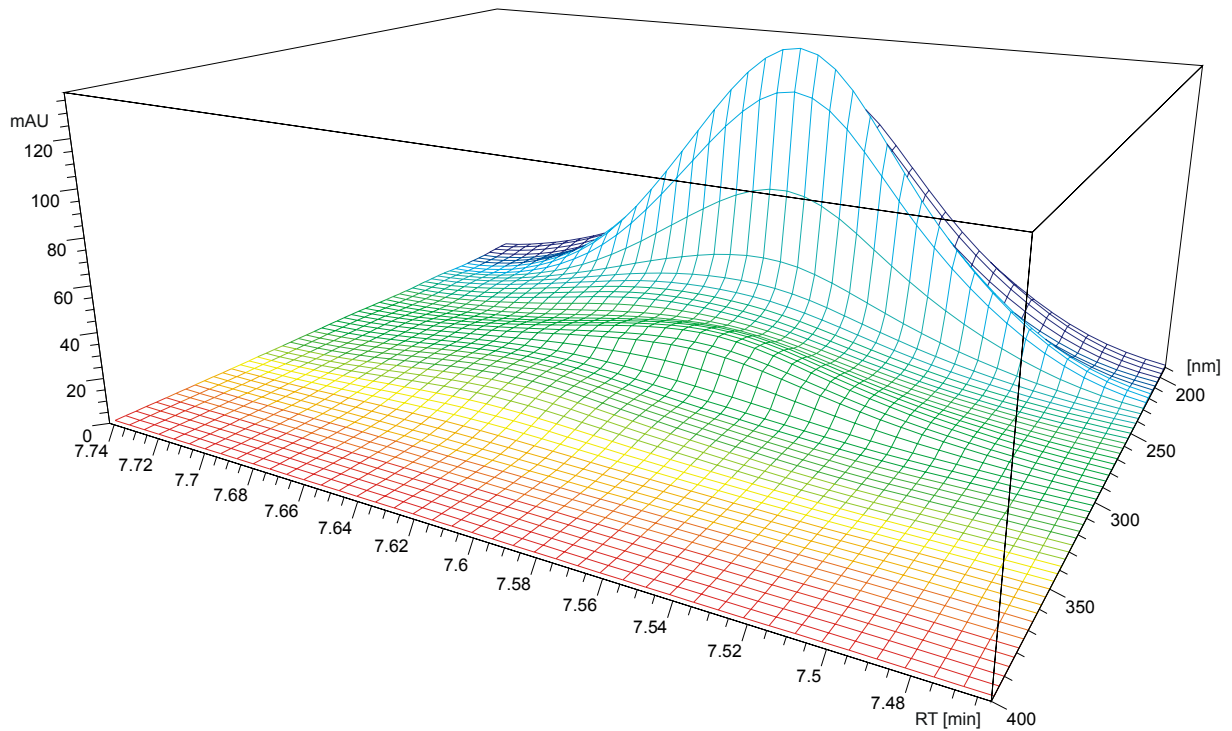


Abb. 4.4.6.G Dreidimensionale Auftragung der gemessenen Signalintensitäten (mAU) über einen ausgewählten Wellenlängenbereich der Absorption (in nm) gegen die Retentionszeit $RT = 7,593$ min um den Substanz-Peak des Knochenextraktes von BO0009.

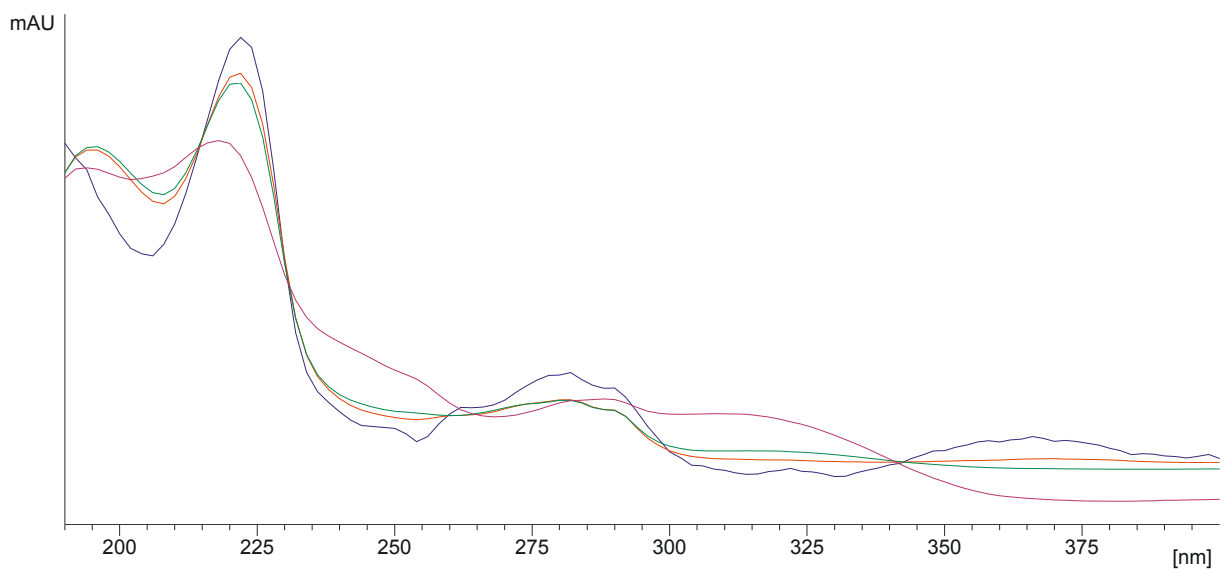


Abb. 4.4.6.H Auftragung von vier Absorptionsspektren des Peaks im Knochenextrakt von BO0009 zur Prüfung der Reinheit. Dargestellt ist die Signalintensität (mAU) gegen die Wellenlängen bei $RT = 7,462$, $7,522$, $7,595$ und $7,669$ min (farbig unterschieden).

5. Diskussion

5.1. Beurteilung der analytischen Methodik und der Messergebnisse

5.1.1 Eignung des Extraktionsverfahrens

Die grundsätzliche Möglichkeit, mit der Kombination einer Flüssig-Fest-Extraktion und einer nachgeschalteten Aufreinigung durch eine Festphasenextraktion, Steroide, in diesem Fall Estradiol, aus Knochenmaterial zu extrahieren, wurde erfolgreich gezeigt. Dabei stellten sich Extraktionen auf der Basis organischer Lösemittel den Puffer-basierten Methoden als überlegen heraus. Verschiedene Puffersysteme sowie eingesetzte unterstützende Enzyme konnten vorhandenes E2 offensichtlich nicht so weit hydrolysieren, dass es in nachweisbaren Mengen extrahiert wurde. Außerdem sind Sulfat- oder Glucuronsäure-Konjugate der Steroide hauptsächlich aus dem Urin bekannt, so dass die Anwendung der spaltenden Enzyme auf Knochen nicht notwendig erscheint.

Die grundsätzliche Problematik klinischer Proben, E2 in Serum oder Urin von den Trägerproteinen wie SHBG lösen zu müssen, besteht bei der Extraktion aus Knochen mit organischen Lösemitteln nicht, da diese die Steroid-Protein-Bindungen *per se* lösen.

Besonderes Augenmerk galt den EDTA-haltigen Puffern, die grundsätzlich das größte Potential besitzen, Knochenstruktur aufzulösen. Zurückzuführen ist dies auf Haupteigenschaft des EDTAs, als Chelatbildner zweiwertige Ionen, und damit das Ca^{2+} des Calciumhydroxyapatits des Knochens zu binden. Durch die Verschiebung des Stoffgleichgewichts wird so immer größere Anteile des Apatits in Lösung gebracht. Durch das Aufbrechen des mineralischen Rückgrats des Knochens werden so die organischen Anteile, in denen E2 hauptsächlich vermutet werden muss, für die (enzymatisch unterstützte) Hydrolyse freigesetzt. Daher werden EDTA-Puffer z.B. in der Untersuchung von aDNA schon seit langem als primäre Extraktionspuffer eingesetzt (z.B. Lassen et al. 1994).

Wie in Kap. 4.1 bereits beschrieben, lösen allerdings höhere Konzentrationen von EDTA (0,5-1 M) den Knochen so weitgehend auf, dass der entstehende Extrakt in der Konsistenz Knochenleim entspricht, und auch mit organischen Lösungsmitteln nicht weiter zu verarbeiten ist. Vor allem besteht bei den EDTA-basierten Extrakten die Schwierigkeit, das EDTA wieder aus dem Extrakt zu entfernen. Da es sich z.B. in Methanol gut löst, geht EDTA mit in die weiteren Extraktionsschritte und letztendlich in den fertigen Extrakt über, der dann nicht mehr für die folgenden Untersuchungstechniken geeignet ist. Ein weiterer Ansatz zur Entfernung des EDTAs könnte eine Ultrazentrifugation des Extraktionsgemisches mit sofortiger Überführung des Überstandes in andere Probenröhrchen sein, der allerdings mangels verfügbarer Zentrifugen nicht getestet werden konnte.

Eine besondere Problematik stellt die Verfügbarkeit und Handhabbarkeit des Knochenpulvers in den Extraktionen dar. Die Extraktionsmethoden der Analytik in der Lebensmittelchemie greifen auf Ausgangsmengen von 20-200 g Fleisch pro Extrakt zurück (Fritsche 1998, Hartwig 1993, Hartwig et al. 1995 und 1997). Zur Extraktion werden erhebliche Mengen Lösungsmittel eingesetzt, im Bereich 100-900 ml (z.B. Schmidt und Steinhart 2000). Erst die anschließenden Einengungsschritte führen zu Probenvolumina, die z.B. in die GC/MS-Analytik einsetzbar sind, dann aber für den Nachweis ausreichend hohe Substanzkonzentrationen enthalten. Bei der Verarbeitung von Knochenpulver haben sich, zumindest mit vorhandener Laborausstattung, 3-4 g Knochenpulver als Obergrenze erwiesen. Damit fallen die Steroid-Konzentrationen in den Extrakten gegenüber den Fleischextrakten der Lebensmittelchemiker um eine Größenordnung niedriger aus.

Die Verarbeitung größerer Mengen Knochens ist aus verschiedenen Gesichtspunkten kaum zu realisieren:

- Die Homogenisation ist mit handelsüblichen Zerkleinerungsgeräten, z.B. dem für Fleischzerkleinerung verwendeten Ultra-Turrax (Bundesgesundheitsamt 1989), aufgrund der Materialhärte nicht möglich; Mühlen für Materialien hoher Härtegrade weisen sehr kleine Mahlvolumina auf. Dies betrifft sowohl die verwendete Mineralogiemühle Retsch Typ MM2, als auch teure Spezialmühlen, wie z.B. die Spex Certiprep 6800 Freezer Mill, in der zwar unter flüssigem Stickstoff sehr effizient gemahlen werden kann, aber maximal 4 ml Volumen pro Mahlgang.
- Größere Mengen Knochenpulver erfordern den Einsatz großer Mengen Lösungsmittel, die anschließend auf sehr kleine Volumina aufkonzentriert werden müssen. Bei fast allen Extraktionen aus Knochenpulver wurden in den Lösungsmitteln co-extrahierte Substanzen sichtbar, die sich nach Trocknung als weißliches halb-kristallin erscheinendes Pulver niedergeschlagen haben (sowohl bei rezenten als auch historischen Knochen). Eine vollständige Entfernung wurde sogar durch SPE nicht erreicht. Mit größeren Ausgangsmengen Knochenpulver nahm auch die Menge dieser Substanzen zu, die schließlich die Aufkonzentration noch größerer Extraktvolumina erheblich erschweren. Nicht zu vernachlässigen sind Aspekte der Gefährdung der Umwelt und der Bearbeiter beim Einsatz großer Lösemittelmengen, v.a. im Falle besonders flüchtiger Lösemittel wie z.B. Ether.
- Neben technischen Limitationen muss, vor allem im Hinblick auf historisches Knochenmaterial, der konservatorische Aspekt beachtet werden. Welcher Anteil eines historischen Knochens darf zerstört werden? Im vorliegenden Beispiel der Anna von

Brandenburg wurden Hälften zweier Mittelfußknochen, die jeweils ca. 8 g Knochenpulver lieferten, vollständig verbraucht. Im Bereich der aDNA-Analytik werden derzeit Methoden mit dem Ziel der zerstörungsarmen oder sogar -freien Extraktion von DNA entwickelt (Schmidt et al. 2002, Luker et al. 2004), um die Beeinträchtigung der archäologischen Funde soweit wie möglich zu minimieren. Die dort beschriebenen Verfahren sind auf die chemische Analytik jedoch nicht übertragbar.

Unbeantwortet bleibt die Frage, ob die verwendeten Verfahren das im Knochen eingelagerte E2 vollständig, d.h. mit einer Ausbeute von 100 %, extrahieren. Der Vergleich extrahierter E2-Mengen mittels Ether und der komplexen Extraktionsmethode (Kap. 4.4.2) zeigt, dass diese Annahme nicht korrekt sein muss.

Dotierungsversuche bieten dabei kaum Anhaltspunkte, da die dotierte reine Substanz keinerlei physiologische Verbindung zur Knochenmatrix eingeht und so allenfalls Hinweise auf den Verlust an Analyt auf dem Wege der Probenaufarbeitung liefert (z.B. durch Adsorption von E2 an Oberflächen der verwendeten Glaswaren). Auch der Vergleich mit Konzentrationswerten in Serum, wie hier ansatzweise mit Leichenblut durchgeführt, bleibt wenig aussagekräftig, da unbekannt ist, inwiefern sich die Konzentration von E2 in Knochen von der in Serum (dem physiologisch wahrscheinlich sehr viel reaktiveren Gewebe) eines Individuums unterscheidet.

5.1.2 Eignung von GC/MS zum Nachweis der Steroide in Knochen

In der vorliegenden Untersuchung konnte kein Steroid mit Hilfe der GC/MS-Technik aus Knochen nachgewiesen werden, obwohl die Auftrennungen der Standards gezeigt haben, dass das verwendete System in der Lage ist, Steroide aufzutrennen (Abb. 4.2.1.A und 4.2.2.A).

Die für das System ermittelte Nachweisgrenze für E2 von 200 ng/ml (200 pg/µl Injektion ins System) würde bei der verwendeten Extraktionstechnik erfordern, dass diese 200 ng E2 aus einem Extrakt gewonnen werden müssen (Endvolumen eines Extraktes = 1 ml). Bei einem Einsatz von durchschnittlich 3 g Knochen pro Extrakt ergibt sich die Nachweisgrenze auf das Substrat bezogen mit $200 \text{ ng}/3 \text{ g} = 67 \text{ ng E2/g Knochen}$. Die später mit Hilfe des RIA gemessenen (tatsächlichen) Konzentrationen von E2 im Knochen liegen in einem Bereich von 230,4 pg (Individuum W07) bis 82,5 ng E2 (Individuum W63) pro Gramm Knochen (vgl. Kap. 4.3.1). Das Individuum W63 allerdings ist ein in der 17. SSW verstorbener Fötus, der sich durch einen extrem hohen E2-Messwert auszeichnet. Der Mittelwert für die E2-Konzentrationen in rezentem Knochen mit 2,3 ng/g liegt bei einem Dreißigstel der

Nachweisgrenze des verwendeten GC/MS-Systems. Ausschließlich ausgewählte Proben, wie die der verstorbenen Föten oder während der Schwangerschaft verstorbener Mütter wären geeignet, um mit der vorhandenen GC/MS-Analytik nachgewiesen und bestimmt zu werden. In der Literatur angegebene Nachweisgrenzen für die Steroid-Analytik bewegen sich in der gleichen Größenordnung wie die hier ermittelte, z.T. aber auch erheblich niedriger, so werden für die Hormonbestimmungen in Rindfleisch, deren Technik adaptiert wurde, mit 0,2-0,3 ng Estrogene/g Fleisch Werte erreicht, die für den E2-Nachweis in Knochen ausreichen würden (z.B. Hartwig 1993). Dass diese Werte nicht erreicht werden, liegt letztendlich daran, dass sich bei Fleisch sehr viel größere Mengen Gewebe homogenisieren lassen, und es möglich ist, aus diesen großen Mengen Steroide zu extrahieren und sehr weit einzuengen (vgl. 5.1.1).

Da die zu erwartenden Mengen von E2 in historischen Knochen, sofern man von einer spezifischen Messung im RIA ausgehen kann, mit einem Mittel von 662 pg E2/g Knochen noch erheblich tiefer liegen, ist der Nachweis von Steroiden aus historischem Knochen mittels GC/MS praktisch ausgeschlossen.

5.1.3 Nachweis- und Quantifizierungserfolge von E2 in Knochen mittels RIA

Die erzielten Messwerte für E2 in rezenten Knochen liegen, ohne Berücksichtigung der Werte der Feten und des Neugeborenen, im Bereich von 230,4 pg bis 10,1 ng E2 pro Gramm Knochen, bei einem Mittel von $2336,1 \pm 1764,3$ pg E2/g. Die Nachweisempfindlichkeit klassischer klinischer RIAs liegt ca. 5 pg/g Gewebe, so dass die Messwerte weit oberhalb der Nachweisgrenze angesiedelt sind.

Problematisch bei der Betrachtung der Messergebnisse erscheint die hohe Variabilität, sowohl intra-individuell, als auch inter-individuell. Die mehrfach gemessenen Individuen (Tab. 4.3.1.C) zeigen mit Ausnahme von nur zweien (Individuen M01, W46) CV-Werte von über 25 %, sowohl bei Intra-Assay als auch bei Inter-Assay-Vergleichen, d.h. eine für klinische Maßstäbe absolut inakzeptable Präzision. Eine schlechte Präzision ist in der chemischen Analytik zwar nicht gleichbedeutend mit einer Unrichtigkeit der Messwerte, macht aber im vorliegenden Fall die Interpretation der Messergebnisse als Spiegel der physiologischen Zustände in den Individuen sehr zweifelhaft. Dies ist vor allem begründet durch die Tatsache, dass die Messwerte auch nicht mit den Geschlechtern bzw. den Geschlechtern in den einzelnen Altersgruppen korrelieren (Tab. 4.3.1.B).

Die Messergebnisse als Spiegel des physiologischen Zustands eines Individuums zu betrachten, erfordert jedoch die Einbeziehung weiterer Faktoren neben Geschlecht und Lebensalter in die Beurteilung. Als Faktoren, welche die E2-Konzentrationen in den Körpergeweben signifikant beeinflussen können, müssen beachtet werden:

- Bei Frauen im reproduktiven Alter die Aufnahme von E2-ähnlichen Substanzen zur Verhütung. Heute gängige Kontrazeptiva enthalten als hormonell wirksame Substanzen vor allem Ethinylestradiol, Desogestrel, Drospirenon und Cyproteronacetat. Niedrigstdosierte Medikamente sind z.B. Desmin 20, Fa. Grünenthal, mit 0,02 mg Ethinylestradiol + 0,15 mg Desogestrel; Mikropillen sind z.B. Yasmin, Fa. Schering, mit 3 mg Drospirenon + 0,03 mg Ethinylestradiol, höher dosierte antiandrogene Pillen sind z.B. Diane 35, Fa. Schering, mit 0,035 mg Ethinylestradiol + 2 mg Cyproteronacetat. Es ist nicht auszuschließen, dass in der vorliegenden Untersuchung v.a. Ethinylestradiol direkt nachgewiesen wird. Ethinylestradiol ist ein synthetisches Estrogen, oral wirksam, und ist biologisch weit aktiver als natürliches E2. Durch die Einnahme und anschließende Ausscheidung der Kontrazeptiva gelangt Ethinylestradiol in nennenswerten Mengen in die Umwelt und ist als endokriner Disruptor bekannt. Seine chemische Struktur (vgl. Abb. 5.1.3.A) ermöglicht die Kreuzreaktion mit dem verwendeten Antikörper #22.2.

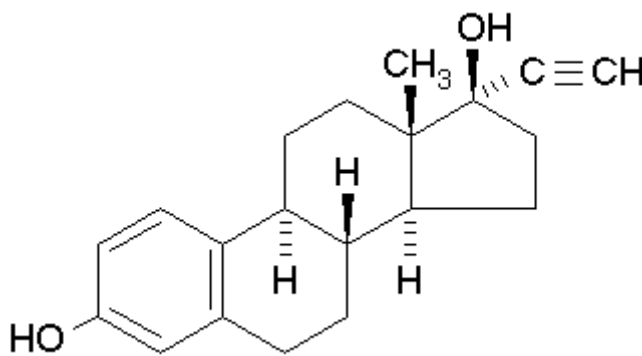


Abb. 5.1.3.A Chemische Struktur des synthetischen Estrogens Ethinylestradiol. Die Struktur ist mit Ausnahme des an C17 gebundenen Rests identisch (vgl. Abb. 3.2.3.2.C).

- Bei Frauen im postmenopausalen Altersbereich ist die Hormonsubstitutionstherapie (HRT) in Betracht zu ziehen. Zur Vermeidung der primären Altersosteoporose werden heute standardmäßig Hormonpräparate verabreicht (Übersichten zur Altersosteoporose bei Fatayerji und Eastell 1999, Nieves et al. 2002, Wark 1993). Der prämenopausal im Schnitt bei ca. 160 pg E2/ml Serum liegende Wert fällt bei Frauen perimenopausal auf einen Wert von ca. 20-30 pg/ml (z.B. Allolio 1996). Der Abfall der E2-Konzentration, im speziellen

des bioverfügbaren E₂s, sowie einiger anderer Hormone, die direkten Einfluss auf den Knochenstoffwechsel haben, führt zur Verminderung von Knochenmasse, -struktur und -funktion, deren Folge ein erhöhtes Frakturrisiko ist (z.B. Cauley et al. 1986, Gordan und Genant 1984, Leichter et al. 1981).

Für die HRT ist eine unüberschaubare Vielzahl von Medikamenten mit unterschiedlichen Wirkstoffen bekannt. Gängige schulmedizinische Methode ist die Gabe von Estrogenen, am weitesten verbreitet ist die Gabe von etwa 0,6 mg konjugierten Estrogenen oder von 1 mg Estradiolvaleriat (Allolio 1996). Auch hier ist aufgrund der E₂-gleichen Grundstruktur dieses Stoffes zu erwarten, dass der Antikörper #22.2 kreuzreagiert. In den letzten Jahren hat sich als Alternative die Gabe von Phytoestrogenen in der HRT etabliert (Clarkson et al. 1998, Eden 1998, Mackey und Eden 1998, Wuttke et al. 2003). Hierbei werden estrogen wirksame Pflanzeninhaltsstoffe als Medikament verwendet, z.B. aus der Sojabohne (Foth 2003, Kurzer 2002) oder aus Rotkleesamen. Beide Pflanzensamen wurden in der vorliegenden Arbeit extrahiert und im RIA gemessen, die hohen erzielten Messwerte (vgl. Kap. 4.4.4) zeigen die Kreuzreaktivität des Antikörpers #22.2.

- Weitgehend unbekannte Auswirkungen auf den E₂-Haushalt im Knochen können die in Tab. 8.3.A außerdem gelisteten Erkrankungen der Individuen gehabt haben. Sowohl die Erkrankungen selbst, als auch die Medikationen können dabei entweder die E₂-Konzentrationen selbst beeinflusst haben, den Eintrag von Metaboliten oder weiteren exogenen kreuzreagierenden Substanzen in den Knochen begünstigt haben. Vor allem Chemotherapien im Zuge von Krebserkrankungen kommen hier in Betracht. Da nicht von allen beprobten Individuen eine Anamnese vorliegt, kann der Zusammenhang auch nicht statistisch geprüft werden, eine Korrelation zu den Todesursachen nicht vorgenommen werden.

Weitere in Frage kommende Unsicherheits-Faktoren bei der Bestimmung von E₂ in rezenten und historischem Knochen beziehen sich schließlich auf die verwendete Extraktionstechnik und den RIA selbst. Beobachtet wurde zum einen eine Problematik bei der Homogenisierung der Knochen (vgl. Kap. 3.2.1.1). Die Korngröße des Pulvers in der Mühle konnte nur durch Sichtprüfung geschätzt werden, die resultierenden Oberflächenunterschiede des Pulvers und damit die Extraktionseffizienz können jedoch erheblich sein.

Desweiteren traten in den Extrakten der Knochen bei Resuspension im Assay-Puffer für den RIA (vgl. Kap. 3.2.3.2) regelmäßig Trübungen auf, die auf Fettrückstände zurückgeführt wurden, weil sie sich bei Zentrifugation oberhalb des Puffers abgesetzt haben. In den Ergebnistabellen zu den RIAs wurden diese Trübungen vermerkt (vgl. Anhang, Kap. 8.4).

Bei stark getrübbten oder getrübbten Extrakten traten vermehrt Probleme im RIA auf, ablesbar an den Intra-Assay-Präzisionen (% CV), die für diese Proben überdurchschnittlich hoch liegen. Offensichtlich hat die Fettmatrix einen negativen Einfluss auf die freie Immunreaktion im Assay und führt zur unspezifischen Bindung, so dass – besonders in den Proben mit hohem Fettanteil – hohe Messergebnisse erzielt werden, die jedoch nicht die wahren Konzentrationen von E2 widerspiegeln. Als rein technische Verbesserung muss in Bezug auf die Extraktion hier ein Weg gefunden werden, rückstandsfreie Extrakte zu erzielen.

5.1.4 Validierungsexperimente: Leichenblutuntersuchung, Tierexperimente

Leichenblut

Die parallel zu Knochenextrakten untersuchten Proben von Leichenblut ergaben zumindest statistisch gesehen gleiche Messergebnisse für E2 im RIA in beiden Gewebetypen (vgl. Kap. 4.4.1). Die Werte korrelieren allerdings nicht zueinander, und sind in den meisten der untersuchten Individuen in der Einzelbetrachtung so weit unterschiedlich, dass sie auch das Ergebnis von Messungen verschiedener Individuen darstellen könnten. Die Ursachen für die mangelnde Regelmäßigkeit der Messwerte sind sicher wiederum in den unbekanntem physiologischen Zuständen der beprobten Individuen zu suchen (vgl. Kap. 5.1.3). Ergänzend ist zu bemerken, dass das mit Tetracyclinen versetzte Leichenblut mehr als zwei Jahre bei 4° C im Kühlschrank gelagert wurde, womit eine erhebliche Degradation einhergegangen ist. Auch mit einer Ultrazentrifuge war es nicht mehr möglich, das Serum abzutrennen.

Zum anderen ist festzuhalten, dass Leichenblut an sich ein ungünstiges Gewebe für chemisch-analytische Untersuchungen darstellt. In der rechtsmedizinischen Forschung durchgeführte Untersuchungen von Leichenblut unter dem Aspekt der Todesursachenforschung sind meist mit großen Fehlerraten behaftet, da eine häufig eine rasche Degradation beobachtet wird, deren Zusammenhänge nicht vollständig bekannt sind (z.B. D'Alesandro et al. 1990, Rumley 1988). Cook (2000) hat darüber hinaus z.B. die Redistribution von Stoffen im Blut *post mortem* beschrieben. Nach den Pionierarbeiten von Berg (u.a. 1950, 1963) ist mit Einzug moderner analytischer Technik die Publikationstätigkeit auf diesem Gebiet eher zurückgegangen. Bei heutigen Arbeiten der Todesursachenforschung sind meist sind Catecholamine Gegenstand der Forschung (z.B. Kauert 1986, Wetter 1999), etabliert ist dagegen der forensische Nachweis von Medikamenten und Drogen in Leichenblut (z.B. Druid und Holmgren 1996).

Tierversuche

Die Normalwerte von E2 in Ratten im Serum liegen bei durchschnittlich 650 pg/ml (Balzer, pers. Mitt.). Die aus den Knochen gewonnenen Werte liegen im einstelligen Nanogramm-Bereich und damit erheblich höher (vgl. Kap. 4.4.2). Die Aussage, dass Knochen höhere Konzentrationen von E2 als Serum enthält, ist jedoch nicht möglich, da keine vergleichenden Serumwerte der betreffenden Tiere mit derselben Extraktionsmethode ermittelt werden konnten. Die unterschiedlichen Konzentrationswerte für E2 im Knochen, die beim Vergleich zweier Extraktionsmethoden ermittelt wurden (Tab. 4.4.2.C), sprechen jedoch für eine wesentlich höhere Extraktionsausbeute der in dieser Untersuchung verwendeten Methode (vgl. Kap. 3.2.2).

Sowohl der Vergleich der E2-Messwerte der Rattengruppen mit und ohne subkutane E2-Gabe, sowie der Knochen mit und ohne Entfernung des Knochenmarks zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede. Zur weiteren Prüfung wären hier größere Stichproben notwendig. Wichtig erscheint trotzdem, bei Reihenuntersuchungen von Knochenmaterial entweder immer mit Entfernung oder ohne Entfernung des Knochenmarks zu arbeiten; weniger aus der statistischen Betrachtung der Messwerte heraus, als aus der Tatsache, dass Knochenmark möglicherweise eine andere (höhere) Reaktivität gegen kurzfristige Estrogen-Zufuhr von außen (Verabreichung) aufweist. Hierzu wäre es notwendig, etwas über das Depotverhalten des Knochenmarks und des Knochens selbst zu kennen. Die zentrale Frage ist, ob die im Knochen gemessenen E2-Konzentrationen kurzfristige Schwankungen der E2-Level im Blut wiedergeben, die z.B. im Laufe des Zyklus der Frau auftreten, oder ob sie langfristige Speicher repräsentieren. Leider konnten hierzu keinerlei Hinweise in der Literatur gefunden werden, da E2 bisher nicht direkt in Knochen bestimmt wurde.

5.1.5 Spezifität des im RIA verwendeten Antikörpers

Die Spezifität des im RIA verwendeten Antikörpers #22.2 wird vor allem durch die Messergebnisse in Boden- und Pflanzenproben charakterisiert. Die Messwerte der Bodenproben liegen im gleichen Konzentrationsbereich wie der Großteil der Werte aus historischen Knochen (vgl. Tab. 4.3.2.A und 4.4.3.A), die dadurch in ihrer Spezifität und Authentizität in Frage gestellt werden. Die Messwerte der Pflanzenproben liegen in allen Fällen noch sehr viel höher (vgl. 4.4.4.A). Der Antikörper zeigt somit ein hohes Maß an Kreuzreaktivität mit einer Anzahl unbekannter Substanzen.

Validierung über HPLC

Die durchgeführte Validation über Fraktionierung der Extrakte mittels HPLC und anschließendem RIA der einzelnen Fraktionen (vgl. Kap. 4.4.6) sollte helfen zu klären, ob und welcher Anteil der Messwerte auf die Messung von E2 bzw. die Messung von fremdgebundenem Antikörper zurückzuführen ist. Im Falle der ausgewählten Pflanzenextrakte konnte gezeigt werden, dass hier eindeutig fremde Substanzen mit dem Antikörper kreuzreagieren, da sie vor der Retentionszeit des E2 von der HPLC eluieren (Abb. 4.4.6.D für den Extrakt aus Roggenmehl mit Acherunkraut-Besatz). Für den Besatz wurden Samen von Ackerunkräutern ausgewählt, die nachweislich oder vermutet estrogen wirksame Substanzen enthalten. Diese Substanzen kreuzreagieren mit dem verwendeten Antikörper. Dazu zählen z.B. ebenso die Extrakte aus dem Rotkleesamen, der in der alternativen Medizin zur HRT in der Menopause eingesetzt wird.

Die ebenfalls über die HPLC aufgetrennten Bodenextrakte zeigen die höchsten Messwerte für E2 in der Fraktion, in der auch der E2-Standard eluiert. Daraus kann gefolgert werden, dass im Boden Substanzen enthalten sind, die nicht nur aufgrund ihrer dem Estradiol an entscheidender Stelle ähnlichen Struktur mit dem Antikörper kreuzreagieren, sondern E2 chemisch so ähnlich sind, dass sie über in der verwendeten HPLC nicht aufgetrennt werden.

Bodeneinfluss

Ohne weiterführende Untersuchung der HPLC-Fractionen aus den Extrakten der Bodenproben, z.B. durch HPLC/MS, ist nicht zu klären, welche Substanzen aus dem Boden vom Antikörper #22.2 gebunden werden. Dabei könnte es sich um Bestandteile von Pflanzen, also Phytoestrogene handeln, aber auch um mikrobielle Umbauprodukte von Steroiden. Allein in der Publikation von Iizuka und Naito (1981) werden mehrere Hundert mikrobielle Umbauprodukte von Steroiden und Alkaloiden aufgelistet, von denen ein großer Anteil den typischen phenolischen Anteil mit dem Estradiol teilt, also vom Antikörper #22.2 gebunden würde. Dabei müsste unterschieden werden zwischen aus dem Liegemilieu in den Knochen eingetragenen mikrobiellen Umbauprodukten, und solchen, die durch die Degradation des Knochengewebes oder anderer Gewebe der Leiche entstehen. Ein frühes Beispiel der Beobachtung von Substanzeinträgen in den Knochen durch Bodenmikroorganismen erfolgte durch Piepenbrink et al. (1983) in histologischen Präparaten von Knochen, die Tetracyclintypische Fluoreszenzen zeigten.

Herrmann (1985) berichtet über positive Ergebnisse von Versuchen mit RIAs, E2 aus historischem Kloakenmaterial nachzuweisen. Die beobachteten Konzentrationen lagen im

Bereich der physiologischen Werte bei Schwangerschaften. Er misst diesen Ergebnissen allerdings keine Bedeutung zu, da angenommen wird, dass Steroide in einer Kloake relativ schnell mikrobiell abgebaut werden. Die positiven Ergebnisse werden vielmehr auf mögliche Kreuzreaktionen des Antikörpers mit Hopanoiden zurückgeführt. Hopanoide sind pentacyclische Triterpenoide, die in vor allem in Form von Bakterienhopanen auftreten, also in bakteriellen Membranen Cholesterol ersetzen (Killops und Killops 1993, grundlegende Publikation von Ourisson 1992). Hopanoide sind praktisch ubiquitär in Böden zu finden (z.B. Winkler 2003) und daher eine mögliche Gruppe von Substanzen, die im RIA von Bodenproben sowie Proben bodengelagerter Knochen nachgewiesen werden. Eine Kreuzreaktion mit dem hier verwendeten Antikörper #22.2 ist allerdings eher unwahrscheinlich, da die Grundstruktur der Hopanoide mit den Kohlenstoffatomen C23, C 24 und C25 eine Struktur des Kohlenstoffringes A besitzt, für die der Antikörper nicht spezifisch ist (vgl. Abb. 5.1.5.A und Abb. 3.2.3.2.C).

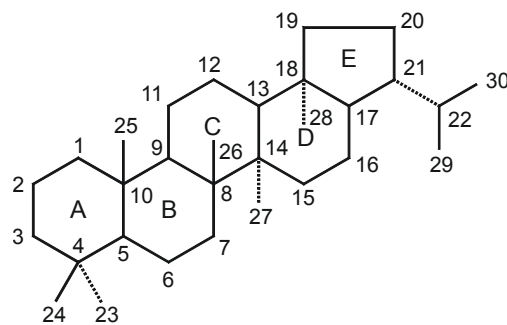


Abb. 5.1.5.A Grundstruktur der Hopanoide, dargestellt am Hopan ($C_{30}H_{52}$), mit Kennzeichnung der Kohlenstoff-Atome und Ringe, (aus Winkler 2003)

Fallstudie „Anna von Brandenburg“

Unter den dargestellten Voraussetzungen stellt sich die Frage, ob es möglich ist, historischen Knochen von Individuen unter Ausschluss von Kontamination der Knochen während der Liegezeit aus dem umgebenden Milieu zu untersuchen? In der vorliegenden Studie können die beiden Mittelfußknochen der Anna von Brandenburg (Individuum BO09, Knochen BO0001 und BO0002) mit Einschränkungen als Modellfall angesehen werden. Die sehr genau dokumentierte Bestattungssituation der Anna (vgl. Kap. 3.1.2) ermöglicht es, eine Kontamination der Knochen in der Klosterkirche Bordesholm weitestgehend auszuschließen (aus Bauch 1997, 1998 u. Bauch, pers. Mitt. 2005):

- Die Bestattung liegt in einer Gruft im Zentrum der Klosterkirche, in einem Sarg auf Ziegelfußboden auf einer kleinen Stufe (vgl. Abb. 3.2.1.C);
- die Gruft war frei von Sediment oder sonstigen Verfüllungen;

- es gibt keinen erkennbaren Pflanzenwuchs in der Gruft;
- es ist kein Eindringen von Oberflächen- oder Grundwasser in die Gruft erkennbar; daneben bietet die Erhöhung des Sargstandortes Schutz vor möglichem Wasser auf dem Boden der Gruft;
- in der unmittelbaren Nähe der Kirche befand sich, archäologisch bestätigt, keine Kloake, Latrine, und kein Abfallhaufen;
- die Bestattung erfolgte in einem Sarg aus ca. 5 cm starken Bohlen aus Eichenholz mit innerer Bekleidung aus Tuchbinden mit einer mehrfach aufgetragenen Gipsschicht (Analyse in Vorbereitung; pers. Mitt. Bauch und Scherping, 2005); einer Schicht aus organischem Material, auf das die Tote gebettet war, vermutlich Stroh; und einer einzigen Sargbeigabe, evtl. ein Strauß aus Roggenähren, einseitig neben dem Kopf oder auf der Stirn der Bestatteten gelagert

Unter den dargestellten Umständen verbleiben als exogene Eintragsmöglichkeit estrogenere Substanzen in die Knochen der Anna nur mikrobielles Wachstum während der Diagenese der Leiche bzw. der Knochen und des Sarges, inklusive der organischen Sargausbettung.

Unter dieser Voraussetzung würde man (unspezifische) Messwerte im RIA erwarten, die maximal in der Größenordnung bodengelagerten Knochens liegen. Die Messwerte für die Knochen von BO 09 übertreffen jedoch diese Größenordnung erheblich, mit 2,5 ng E2/g Knochen für BO0001 und sogar 13,3 ng E2/g Knochen für BO0002. Diese absolut hohen Messwerte lassen sich logisch mit dem Umstand erklären, dass Anna von Brandenburg in der 27. oder 28. SSW verstarb, daher zum Todeszeitpunkt in ihrem Körper ein für Schwangerschaften üblicher E2-Spiegel vorgelegen haben muss. Ab der 20. SSW kann man im mütterlichen Serum Konzentrationen von mehr als 3,5 ng E2/ml messen (z.B. Gerhard und Runnebaum 1998, Leidenberger 1997). Konzentrationen für Knochen sind aus der Literatur bisher nicht bekannt. Der in Knochen BO0001 gemessene Wert liegt höher als der moderne Serumwert; was die Authentizität zunächst in Frage stellt. Betrachtet man die Messwerte der rezenten fötalen Knochen für die Individuen W29, W42, W56, W60, W63, W68 und W69, die zwischen 22,1 ng E2/g und 82,5 ng E2/g Knochen liegen, und setzt sie zu den Messwerten der restlichen rezenten Individuen ins Verhältnis, so enthalten die fötalen Knochen im Mittel 15,6 mal mehr E2. Zwischen den Knochen von BO9 und den restlichen untersuchten historischen Knochen ergibt sich ein ähnliches Verhältnis von 12:1, bei singulärer Betrachtung des Knochens BO0002 sogar von 20:1 (Tab. 5.1.5.A).

Tab. 5.1.5.A Gegenüberstellung der E2-Messwerte während der Schwangerschaft verstorbener Individuen zu Individuen mit Lebensaltern > 0.

Zeitstellung	Individuen	MW E2 [pg/g Knochen]	Verhältnis
rezent	Föten	36338,7	15,6:1
rezent	infans-senilis	2336,1	
historisch	verstorbene Schwangere BO 9	7927,4	12,0:1
historisch	infans-senilis	661,5	
historisch	verstorbene Schwangere BO 9, nur BO0002	13324,5	20,1:1
historisch	infans-senilis	661,5	

Die Ähnlichkeit der Verhältnisse dieser Messwerte lässt für die hohen E2-Messwerte der Knochen der Anna von Brandenburg eigentlich nur noch zwei Interpretationen offen:

- Eine massive, über das übliche Maß der Bodenlagerung hinausgehende Kontamination der Knochen mit estrogenen Substanzen, die mit dem Antikörper kreuzreagieren; oder
- den Nachweis indigenen Estradiols oder eines Derivates in den Knochen, da die o.g. Umstände eine Kontamination weitgehend ausschließen.

Die HPLC-Messung der Knochenextrakte von BO 09 (hier Knochen BO0002) stützt die zweite Interpretation, da E2-Signale in den Fraktionen gefunden werden, in denen auch der E2-Standard eluiert (vgl. Abb. 4.4.6.C). Dazu erscheint der im HPLC-Chromatogramm sichtbare Peak sehr rein (vgl. Abb. Abb. 4.4.6.F).

Die endgültige Klärung der Frage indigenes E2 oder Kontamination muss hier offen bleiben; auch ein weiterer Aspekt konnte mit der Analyse der historischen Knochen in dieser Untersuchung nicht beantwortet werden: Entstehen bei der Autolyse des Körpers, möglicherweise schon im Leichenfett präsenzte Substanzen, die mit dem Antikörper kreuzreagieren können? Diese könnten für hohe Messwerte auch ohne exogenen Eintrag estrogenen Substanzen verantwortlich sein. Im Falle des Individuums BO 09 wurde der Sarg innen mehrschichtig mit Gipsbinden ausgekleidet, was archäologisch interpretiert als Schutz gegen das Auslaufen von Flüssigkeiten, die bei der Leichenzersetzung entstehen, gedeutet wird. Möglicherweise können sich darin Stoffe befunden haben, die in die Knochen eingedrungen sind und die hohen E2-Messwerte bedingen. Dabei könnte es sowohl um während der Leichenzersetzung entstandene Sekundärstoffe, als auch indigenes Estradiol aus den anderen Körpergeweben gehandelt haben (v.a. Fruchtwasser).

5.2 Überlegungen zur Degradierung von Steroiden im Zuge der Knochendiagenese

Der Vergleich der Messergebnisse aus den historischen Knochen mit den Ergebnissen der histologischen Untersuchung und der aus der DNA-Analytik gewonnenen Erkenntnisse über den Erhaltungszustand der DNA erbrachte keine eindeutigen Tendenzen (vgl. Kap. 4.3.2).

Einzig hinweisgebend, jedoch nur ein Einzelfall, ist der makroskopische Erhaltungszustand der beiden Ossa metatarsalia der Anna von Brandenburg, Knochen BO0001 und BO0002 (Abb. 3.1.2.E). Der äußerlich wesentlich schlechter erhaltene Knochen BO0001, oben im Bild, liefert mit 2,5 ng/g Knochen einen erheblich niedrigeren E2-Messwert als der makroskopisch gut erhaltene Knochen BO0002 mit 13,3 ng E2/g Knochen (Abb. 3.1.2.E unten im Bild, sowie Abb. 3.1.2.D mit Querschnitt). Daraus lässt sich zumindest schließen, dass die Degradierung des Knochens auch den E2-Gehalt vermindert, vor der Degradierung also höhere Konzentrationen vorgelegen haben sollten (sowohl unter der Annahme, dass es sich bei der gemessenen Substanz um indigenes E2 oder einen anderen estrogenen Stoff handelt). Zur Absicherung sollten hier allerdings noch histologische Untersuchungen von Knochendünnschliffen erfolgen, sowie eine Beurteilung der ausstehenden DNA-Ergebnisse (Hummel, pers. Mitt.).

Die Degradierung von Steroiden im Körper unter physiologischen Bedingungen erfolgt hauptsächlich enzymatisch. Sie erfolgt für C21-Steroide über eine Veresterung in der Leber, die C18- und C19-Steroide werden mittels Sulfatase/Sulfotransferase mit einem Sulfat konjugiert, das eine höhere Bindungsaffinität an die Plasma-Proteine bewirkt und nach weiterer Metabolisierung schließlich über die Niere zur Ausscheidung führt (Übersichten z.B. bei Bernhardt et al. 1991, Macdonald et al. 1983). In Knochen wird unter physiologischen Bedingungen mit großer Sicherheit kein E2 abgebaut, sondern durch Transportproteine (u.a. SHBG) über den Blutkreislauf in die genannten Organe abgeführt.

Mit Stillstand des Blutkreislaufs und dem Erliegen der physiologischen enzymatischen Prozesse wird E2 vermutlich zunächst teils durch Autolyse, später teils durch mikrobiellen Umbau in seiner Konzentration abnehmen. Bei der Bodenlagerung des Knochenmaterials spielt dann ausschließlich der mikrobielle Abbau eine Rolle (vgl. Kap. 5.1.5, Bodeneinfluss; auch Iizuka und Naito, 1981).

Chemisch gesehen sind die Steroide, und darunter auch das Estradiol, durch ihre vierfach-Kohlenstoff-Ringstruktur recht stabil (mit Ausnahme der Seitenkette bei Derivaten oder komplexeren Steroiden). Das E2-Molekül ist dabei auch relativ wärmeunempfindlich (Jarry, pers. Mitt.).

Zur Abschätzung der Degradierung war ursprünglich beabsichtigt, Knochenextrakte von Individuen im RIA zu messen, die unterschiedlich lang bestattet waren. Dazu standen Knochen mit einer Liegezeit von 4 Wochen (experimentell bestattet), 4 Jahren (Individuum G34), 60 Jahren (Bestattung aus Alt-Inden) und ca. 300 Jahren (aus Goslar, ausgehendes 18. Jahrhundert) zur Verfügung. Eine Untersuchung auf Basis dieses Knochenmaterials wurde allerdings verworfen, da die Individuen zum einen unterschiedlichen Geschlechts und Alters gewesen sind, und zum anderen die Knochen unterschiedlichen Liegemilieus entstammen. Die Untersuchungen von Fabig (2002) zu Spurenelementverteilungen in Knochen haben gezeigt, dass der Einfluss des Liegemilieus auf die Elementzusammensetzung des Knochenminerals größer als die individuellen Ernährungsgewohnheiten der Verstorbenen ist. Unter der Annahme, dass dafür verantwortliche Bodenfaktoren wie mineralische Zusammensetzung, pH, Feuchte, Temperatur und Durchlüftung sowie Mikroflora auch die Degradierung der Steroide beeinflussen, wären die Ergebnisse der Untersuchung nicht aussagekräftig gewesen. Notwendig wäre ein Experiment mit unterschiedlich lang bodengelagerten Knochenfragmenten, die von einem Individuum entnommen werden und anschließend einem Langzeitexperiment durch experimentelle Bestattung in definierten Böden ausgesetzt werden. Vergleichbare Experimente wurden von Schmerer (2000) für die Degradierung von DNA und von Schutkowski (pers. Mitt.) für die Spurenelementanalytik auf einem Versuchsgelände des Institutes in Sennickerode durchgeführt (noch laufend).

Die Abschätzung der möglichen Degradierung des Steroids kann als wichtigste Voraussetzung für die Frage angesehen werden, ob mit den Ergebnissen der vorgestellten Methode ein Vergleich von Populationen durchgeführt werden kann. Haben verschiedene Liegemilieus unterschiedliche Alterungs- oder Degradierungsstadien zur Folge, wird durch den direkten Einfluss auf die Ergebnisse ein Interpopulations-Vergleich unmöglich.

5.3 Perspektiven für die Anwendung der Steroid-Bestimmungen in der historischen Demographie und Anthropologie

Am positiven Nachweis der Schwangerschaft der Anna von Brandenburg kann gezeigt werden, dass individuelle Befunde möglich sind. Anhand des positiven Estradiol-Nachweises wurde die historisch nicht überlieferte Schwangerschaft bestätigt (Todesursache: „Unterleibskrämpfe“). Der Befund beinhaltet die Information, dass die Mutter tatsächlich während der Schwangerschaft verstarb. Eine DNA-Untersuchung könnte hier lediglich das Verwandtschaftsverhältnis aufklären.

Befunde wie der beschriebene weisen jedoch ausschließlich Fallstudiencharakter auf, sie können zwar historische Rätsel lösen oder historische Zusammenhänge durch naturwissenschaftliche Methodik bestätigen oder verwerfen, bergen nicht jedoch das Potential der Beschreibung einer historischen Population. Somit muss in Rückbezug auf die Ausgangsfragestellung der Fertilität in historischen Bevölkerungen festgestellt werden, dass die getestete chemische Analytik in der vorliegenden Form nicht geeignet ist, Daten für die historische Demographie zu erheben. In der Folge ist es somit nicht möglich, intentionale Einflüsse des Verhaltens und von Mentalitäten, z.B. Geburtenregelungs-Mechanismen, Heiratsbeschränkungen, Trennungen von Sexualität und Reproduktion, die neben der Chemie der Nahrungsmittelkontaminanten einen großen Einfluss auf die Entwicklung der Fertilität in einer Bevölkerung haben, zu diskutieren.

Weitere Fallstudien/Individualbefunde

In der Historischen Anthropologie stehen an verschiedenen Stellen historische Knochen weiterer Individuen zur Verfügung, die vermutlich während der Schwangerschaft oder um den Geburtzeitpunkt verstorben sind. In verschiedenen Regionen Europas gibt es Belege dafür, dass man im Wochenbett verstorbene mit Kleidern und Schuhe bestattete, damit sie ihren Weg fänden bzw. auferstehen und ihr (hinterlassenes) Kind pflegen könnten (z. B. Bächtold-Stäubli und Hoffmann-Krayer 1987). Auch verstorbenen Kindern musste man vielerorts Schuhe anziehen oder mitgeben, sonst würde es „in den Himmel stolpern“ (Rochholz 1856). Unter anderem unter den Traufkindern aus dem neuzeitlichen Friedhof von Wangen an der Aare, Schweiz, fanden sich bei zwei Gräber von Neugeborenen (Nr. 19 und Nr. 103, Ulrich-Bochsler und Schäublin 1983, Ulrich-Bochsler 1990) mit Lederresten im Fußbereich. Ob diese Funde tatsächlich mit dem alten Volksglauben in Zusammenhang stehen, muß jedoch offen bleiben.

Noch interessanter erscheinen in diesem Zusammenhang Grabbeigaben, die aufgrund des Brauchtums um die im Wochenbett verstorbenen Frauen beschrieben werden. Dazu zählen v.a. Knochen der Fundnummern AE 1, AE 3, AE 172, AE 182 und AE 222 aus Aegerten in der Schweiz (Bacher et al. 1990). Alle fünf Bestatteten sind Frauen, vier dieser fünf Frauen wurden in Kleidern bestattet. Daneben befanden sich in den Gräbern Scheren und Fingerhüte. Regional war es Brauch, einer Wöchnerin, die im Kindbett starb, Pfännchen, Schere und Nähzeug in den Sarg zu legen, damit sie ihrem Kind kochen und nähen könne. Detaillierte Beschreibungen der Fundsituationen sind in Bacher et al. (1990) nachzuvollziehen, soziobiologische und soziokulturelle Aspekte in Ulrich-Bochsler (1997).

Weitere Fälle finden sich in Schaffhausen, St. Johann Grab 100, Mutter mit Säugling bei Geburt (Ulrich-Bochsler und Schäublin 1983).

Über die Hormonanalytik lassen sich hier mögliche Totgeburten feststellen, die anthropologisch oder archäologisch über die Beigaben nicht erfassbar sind.

Die Prüfung von Schwangerschaften mit Hilfe weiterer schwangerschaftsspezifischer Steroidhormone wäre eine verbleibende Perspektive für weitere Untersuchungen. Das typischste und interessanteste Schwangerschaftshormon, Oxytocin, das u.a. die Uteruskontraktionen beim Geburtsvorgang und die Milchproduktion beim Säugen des Kindes stimuliert, wird jedoch vermutlich nicht nachweisbar sein, da es schon im Serum nur in attomolaren Größenordnungen vorliegt (Review in: Ivell und Walther 1999).

6. Zusammenfassung

Die Ursachen des explosionsartigen Bevölkerungsanstiegs im Mitteleuropa der zweiten Hälfte des 18. Jahrhunderts werden seit geraumer Zeit von Historikern lebhaft diskutiert. Unstrittig ist, dass er zeitgleich mit der Einführung der Kartoffel als Nahrungspflanze zu beobachten ist. Mindestens drei Hypothesen, welche Faktoren dafür ursächlich verantwortlich sind, konkurrieren miteinander: Die erste Hypothese rückt den energetisch deutlich höheren Ertrag des Kartoffel- gegenüber des Getreideanbaus pro nutzbarer Fläche in den Vordergrund; die zweite Hypothese sieht den Rückgang des Skorbut aufgrund des hohen Vitamin-C-Gehaltes der Kartoffel als ursächlich an; die dritte Hypothese formuliert den sinkenden Anteil des Eintrages von Ackerunkraut- und Grassamen sowie des Mutterkorns, und damit schädlicher oder gar abortiv wirkender Substanzen ins Mehl, als fertilitätssteigernd.

Die dritte Hypothese, deren Kernpunkt die Suppression der Fertilität durch Nahrungskontaminanten in den historischen Bevölkerungen vor der Einführung der Kartoffel als Grundnahrungsmittel ist, kann mit den klassischen Methoden der Historischen Demographie nicht geprüft werden, da die verfügbaren Quellen (schriftliche Quellen, archäologisch geborgenes Skelettmaterial) keinen Zugriff auf Parameter der Fertilität bieten.

Da aus grundsätzlichen Überlegungen der Nachweis der Nahrungskontaminanten in archäologischem Skelettmaterial nicht möglich erscheint, wurde zur empirischen Untersuchung der Fertilität historischer Bevölkerungen eine endogene Stoffgruppe, die Sexualhormone (Steroide) ausgewählt. Die Aussichten für die Etablierung einer Methode zur Extraktion und Bestimmung von Steroiden aus Skelettmaterial waren gut, wurden Stoff dieser Substanzgruppe doch bereits von anderen Bearbeitern in nicht-knöchernem archäologischen Material nachgewiesen.

Nachdem die grundsätzliche Extrahierbarkeit dotierter Steroide aus archäologischen Knochen und die Bestimmung mit Hilfe der Gaschromatographie/Massenspektrometrie gezeigt werden konnte, wurde in der vorliegenden Arbeit das Steroidhormon Estradiol ausgewählt, da es den größten Informationsgehalt in Bezug auf Fertilitätsparameter bietet, und seine Erhaltung in Knochen aufgrund seiner Funktionen im Knochenstoffwechsel hochwahrscheinlich ist.

Estradiol wurde mit aus der Lebensmittelanalytik angepassten Protokollen aus der Knochenmatrix extrahiert, konnte aber mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie nicht nachgewiesen werden. Erst der Einsatz der Technik des Radioimmunoassays, die niedrigere Nachweisgrenzen aufweist, erlaubte den Nachweis des Hormons. Dazu wurde zunächst rezentes Sektionsmaterial untersucht, bevor nach erfolgreichen Nachweisen historischer Knochen analysiert wurde, sowie verschiedene Kontrollprobensysteme. In

Bodenextrakten konnten schließlich ähnlich hohe Messwerte für Estradiol erhalten werden, wie in historischen Knochen, womit belegt wird, dass der im Radioimmunoassay verwendete Antikörper mit weiteren Substanzen, mindestens solchen aus dem Boden, kreuzreagiert. Zur Prüfung der Spezifität des Antikörpers wurden weitere Kontrollexperimente durchgeführt, bei denen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie zur Fraktionierung der Knochenextrakte eingesetzt wurde, um in anschließenden Radioimmunoassays feststellen zu können, ob es sich bei den Substanzen, die Messsignale erzeugen, tatsächlich um Estradiol handelt. Dies konnte eindeutig nur in einem Fall erzielt werden, in dem Knochen einer während der Schwangerschaft verstorbenen Frau untersucht wurden, die nicht im Boden bestattet worden war. Die Estradiol-Messwerte lagen hier, wie auch bei rezenten Schwangerschaften festgestellt werden konnte, etwa fünfzehnmal höher als in Knochen nicht während Schwangerschaften Verstorbener. Unter Beachtung aller Randbedingungen kann hier von einem Nachweis indigenen Estradiols aus dem Knochen ausgegangen werden.

Die Quantifizierung der Hormone aus archäologischen Knochen erweist sich mit der verwendeten Analysetechnik als sehr eingeschränkt anwendbar. Sie erlaubt in Ausnahmefällen die Rekonstruktion des endokrinen Zustands der Individuen, hier zunächst ausschließlich im Falle der Schwangerschaft mit den damit verbundenen hohen Estradiol-Konzentrationen. Die Validierung weiterer biographischer Ereignisse neben Mutter-Kind-Bestattungen, z. B. die Feststellung von Menarche- und Menopausezeitpunkten ist aus den beobachteten Messwerten für Estradiol aus archäologischem Knochen nicht möglich. Aussagen über Fertilitätsparameter einzelner Individuen, und damit auch die Übertragung auf historischen Bevölkerungen im Sinne kollektiver biographischer Parameter, können mit Hilfe der angewendeten Techniken der Gaschromatographie/Massenspektrometrie und des Radioimmunoassays nicht getroffen werden.

7. Literatur

- Alt KW, Mußhoff F (1997) Chemisch-analytischer Nachweis von Steroiden in Nachgeburtsgefäßen. In: Sartorius K (Hrsg.) Wo weder Sonne noch Mond einscheint. Nachweis von Nachgeburtsbestattungen in der frühen Neuzeit. Archäologische Informationen aus Baden-Württemberg. Gesellschaft für Vor- und Frühgeschichte in Württemberg und Hohenzollern, Stuttgart, **36**: 41-42
- Andresen L (1930) Anna, Herzogin zu Schleswig-Holstein († 1514). Die Heimat **40**: 128-138
- Allolio B (1996) Primäre Osteoporose. In: Allolio B, Schulte HM (Hrsg.) Praktische Endokrinologie. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 319-330
- Bacher R, Suter PJ, Eggenberger P, Ulrich-Bochsler S, Meyer L (1990) Aegerten. Die spätrömischen Anlagen und der Friedhof der Kirche Bürglen. Teil C: Anthropologische Untersuchungen. Bern: Staatl. Lehrmittelverlag
- Bächtold-Stäubli H, Hoffmann-Krayer E (1987, Hrsg.) Handwörterbuch des deutschen Aberglaubens. Bd. **9**. Unveränd. photomechan. Nachdr. d. Ausg. Berlin u. Leipzig: de Gruyter, 1941.
- Balabanova S, Parsche F, Pirsig W (1992) First identification of drugs in Egyptian mummies. Naturwissenschaften **79**: 358
- Balabanova S, Teschler-Nicola M, Strouhal E (1994) Nachweis von Nicotin im Kopfhhaar von natürlich mumifizierten Körpern aus dem christlichen Sayala (Ägyptisch-Nubien). Anthropologischer Anzeiger **52**: 167-173
- Balabanova S, Wei B, Rösing F, Bühler G, Scherer G, Mayerhöfer C, Chen Z, Zhang W, Rosenthal J (1996) Nachweis von Nicotin in prähistorischen Skelettresten aus Süd-China. Anthropologischer Anzeiger **54**: 341-353
- Bauch W (1997) Bordsesholm, Kr. Rendsburg-Eckernförde: Stift der Augustiner Chorherren. Archäologisches Landesamt Schleswig-Holstein, Schleswig
- Bauch W (1998) Grabungen am ehemaligen Augustiner-Chorherrenstift in Bordsesholm. Zeitschrift für Denkmalpflege in Schleswig-Holstein **5**: 35-38
- Bauch W (1999) Die Gräber der „Kieler Professoren“ in der Klosterkirche zu Bordsesholm. Schleswig: Archäologisches Landesamt Schleswig-Holstein
- Beiser SM, Erlanger BF, Agate FJ, Lieberman S (1959) Antigenicity of steroid-protein conjugates. Science **129**: 564-565
- Beitler U (1997) Cholesterin, Östrogen und Hämoglobin - Chemische Untersuchungen der Topfinhalte. In: Sartorius K (Hrsg.) Wo weder Sonne noch Mond hinscheint. Archäologische Nachweise von Nachgeburtsbestattungen in der frühen Neuzeit. Archäologische Informationen aus Baden-Württemberg. Gesellschaft für Vor- und Frühgeschichte in Württemberg und Hohenzollern, Stuttgart, **36**: 39-40

- Berg S (1950) Das postmortale Verhalten des Blutes. Dtsch. Z. Ges. gerichtl. Med. **40**: 1-74
- Berg S (1963) Physiologisch-chemische Befunde im Leichenblut als Ausdruck des Todesgeschehens. Dtsch. Z. Ges. gerichtl. Med. **54**: 136-149
- Bernardi M, Trevisani F, Gasbarrini A, Gasbarrini G (1991) Degradation of circulating cortical steroids. Physiology and pathophysiology. In: Henriksen JH (Hrsg.) Degradation of bioactive substances: Physiology and pathophysiology. CRC, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London, 267-287
- Bethell PH, Goad LJ, Evershed RP (1994) The Study of Molecular Markers of Human Activity: The Use of Coprostanol in the Soil as an Indicator of Human Faecal Material. J Archaeol Sci **21**: 619-631
- Bramanti B (1999) Genetic characterization of the Goslar skeleton collective by aDNA analysis. Anlage 3 zum Abschlußbericht „Der Harz als frühmittelalterliche Industrielandschaft“, Teilprojekt Anthropologie Az II 70959, unveröffentlicht
- Bramanti B, Hummel S (2000) Genetische Variabilität und Arbeitstradition im Goslar des 18. Jahrhunderts. In: Segers-Glocke C (Hrsg.) Auf den Spuren einer frühen Industrielandschaft. Naturraum – Mensch – Umwelt im Harz. Arbeitsh. Denkmalpfl. Nieders. **21**: 100-102
- Brandt E, Wiechmann I, Grupe G (2000) Possibilities of extraction and characterization of ancient plasma proteins in archaeological bones. Anthropologischer Anzeiger **58**: 85-91
- Brooks CJW, Middleditch BS (1973) Some aspects of mass spectrometry in steroid analysis. In: Heftmann E (Hrsg.) Modern methods of Steroid analysis. New York: Academic, 139-198
- Bundesgesundheitsamt (1989) Bestimmung von hormonell wirksamen Stoffen (Anabolica) in Fleisch (Muskelgewebe), Leber, Niere und Fettgewebe (vorläufige Methode). Bundesgesundheitsblatt, 1989 (**2**): 76-80
- Cauley JA, Gutai JP, Sandler RB, LaPorte R, Kuller LH, Sashin D (1986) The relationship of endogenous estrogen to bone density and bone area in normal postmenopausal woman. American Journal of Epidemiology **124**: 752-761
- Chard T (1990) An introduction to radioimmunoassay and related techniques. 4. Aufl. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Bd. **6**, Teil II, Hrsg. Burdon RH, van Knippenberg PH. Amsterdam: Elsevier
- Clarkson TB, Anthony MS, Williams JK, Honore EK, Cline JM (1998) The potential of soybean phytoestrogens for postmenopausal hormone replacement therapy. Proc Soc Exp Biol Med **217**: 365-368
- Cook DS, Braithwaite RA, Hale KA (2000) Estimating antemortem drug concentrations from postmortem blood samples: the influence of postmortem redistribution. J Clin Pathol **53**: 282-285

- Copley MS, Evershed RP, Horton MC (1998) Chemical Investigations of Pottery and Bone from the Arid Nubian Site of Qasr Ibrim, Egypt. Internet Publication, http://www.science.plym.ac.uk/departments/bogs/bogs1998/copley_ms.htm
- D'Alesandro MM, Gruber DF, Reed HL, O'Halloran KP, Robertson R (1990) Effects of collection methods and storage on the in vitro stability of canine plasma catecholamines. *Am J Vet Res* **51**: 257-259
- Demir Y, Yildirim S, Alayli A, Demir N (2003) Characterization and purification of acid phosphatase from ancient human bone. *Prep Biochem Biotechnol* **33**: 311-320
- Denecke D (1976) Innovation and diffusion of the potato in central Europe in the seventeenth and eighteenth centuries. In: Buchanan RH, Butlin RA, McCourt D (Hrsg.) *Fields, farms and settlement in Europe*. Ulster Folk and Transport Museum, Cultra Manor, Holywood, 60-96
- Druid H, Holmgren P (1997) A compilation of fatal and control concentrations of drugs in postmortem femoral blood. *J Forensic Sci* **42**: 79-87
- Eden J (1998) Phytoestrogens and the menopause. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **12**: 581-587
- Edward JB, Benfer RA, Morris JS (1990) The effects of dry ashing on the composition of human and animal bone. *Biol. Trace Elem. Res.* **25**: 219-231
- Egli H-R, Koller H (1993) Eine Kartoffelflur aus dem 18. Jahrhundert im Berner Oberland (Schweiz). *Z Agrargesch Agrarsoziol* **41**: 44-65
- Etspüler H, Kaup Y, Bailyes EM, Luzio JP, Weser U (1995) Monoclonal antibodies recognize 2300 years aged alkaline phosphatase. *Immunol Lett* **48**: 187-191
- Evans FG (1973) *Mechanical properties of bone*. Springfield, IL: Thomas, 237
- Evershed RP, Turner-Walker G, Hedges REM, Tuross N, Leyden A (1995) Preliminary Results for the Analysis of Lipids in Ancient Bone. *J Archaeol Sci* 277-290
- Evershed RP, Mottram HR, Dudd SN, Charters S, Stott AW, Lawrence GJ, Gibson AM, Conner A, Blinkhorn PW, Reeves V (1997) New Criteria for the Identification of Animal Fats Preserved in Archaeological Pottery. *Naturwissenschaften* **84**: 402-406
- Fabig A (2002) Spurenelementuntersuchungen an bodengelagertem Skelettmaterial. Validitätserwägungen im Kontext diagenetisch bedingter Konzentrationsänderungen des Knochenminerals. Dissertation, Göttingen
- Farnsworth NR, Bingel AS, Cordell GA, Crane FA, Fong HH (1975a) Potential value of plants as sources of new antifertility agents I. *J Pharm Sci.* 1975 Apr; **64**(4):535-98
- Farnsworth NR, Bingel AS, Cordell GA, Crane FA, Fong HS (1975b) Potential value of plants as sources of new antifertility agents II. *J Pharm Sci.* 1975 May; **64**(5):717-54.

- Fatayerji D, Eastell R (1999) Age-related changes in bone turnover in men. *J Bone Miner Res* **14**: 1203-1210
- Felsenberg D (2001) Struktur und Funktion des Knochens. *Pharmazie in unserer Zeit* **30** (6): 488-493
- Finke T (1999) Die Skelettfunde aus dem neuzeitlichen Gräberfeld Goslar „Hinter den Brüdern“. Anlage 1 zum Abschlußbericht „Der Harz als frühmittelalterliche Industrielandschaft“, Teilprojekt Anthropologie Az II 70959, unveröffentlicht
- Finkelstein JS (1995) Androgen Action on the Bone. In: Baird DT (Hrsg.) Organ selective actions of steroid hormones. Ernst Schering Research Foundation Workshop. Springer, Berlin, Heidelberg, **16**: 121-136
- Flindt S (1996) Die Lichtensteinhöhle bei Osterode, Ldkr. Osterode am Harz. Eine Opferhöhle der jüngeren Bronzezeit im Gipskarst des südwestlichen Harzrandes. *Ber. Denkmalpfl. Niedersachsen* **2**: 41-43.
- Flindt S (1998) Die Lichtensteinhöhle. In: Flindt S, Leiber C (Hrsg.) Kulthöhlen und Menschenopfer im Harz, Ith und Kyffhäuser. Holzminden: Mitzkat: 50-80
- Flindt S, Leiber C (1998) Kulthöhlen und Menschenopfer im Harz, Ith und Kyffhäuser. Holzminden: Mitzkat
- Foth D (2003) Alternativen zur Hormonsubstitutionstherapie. *J Menopause* 2003: 32-35
- Fouquet G (2001) Die Arbeit der anderen. Fräulein und Gnädige Frau - Anna von Brandenburg (1487-1514). *Mitteilungen der Residenzen-Kommission der Akademie der Wissenschaften zu Göttingen* **11** (1)
- Frank HK (1981) Vorkommen von Mykotoxinen (außer Aflatoxine) in Getreide und Getreideprodukten. In: Deutsche Forschungsgemeinschaft (Hrsg.) Rückstände in Getreide und Getreideprodukten: Bericht über d. Kolloquium am 12./13. Oktober 1978. Boldt, Boppard, 86-92
- Fritsche S (1998) Steroid hormones in food: analysis, occurrence, dietary intake and correlation with meat quality characteristics. Dissertation, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie der Universität Hamburg
- Gaskell SJ, Gould VJ, Leith HM (1986) High sensitivity determinations of Steroids in physiological fluids and tissues. In: Gaskell SJ (Hrsg.) *Mass Spectrometry in Biomedical Research*. Wiley, Chichester, 347-361
- Gerhard I, Runnebaum B (1998) Endokrinologie der Schwangerschaft. In: Runnebaum B, Rabe T (Hrsg.) *Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin*. Springer, Berlin, **2**: 396-457
- Gerhards P, Szigan J (1997) Probenvorbereitung für die Drogenanalytik. In: Gerhards P, Bons U, Sawazki J, Szigan J, Wertmann A (Hrsg.) *GC/MS in der klinischen Chemie*. Basel: VCH, 56-64

- Gold EB, Bromberger J, Crawford S, Samuels S, Greendale GA, Harlow SD, Skurnick J (2001) Factors associated with age at natural menopause in a multiethnic sample of midlife women. *Am J Epidemiol* **153**: 865-874
- Gordan GS, Genant HK (1984) Ageing of Bone in the Two Sexes. In: Martini L, Gordan GS, Sciarra F (Hrsg.) *Steroid modulation of neuroendocrine function. Sterols, Steroids and bone metabolism*. Excerpta Medica, Amsterdam, New York, Oxford, **11**: 139-153
- Gower DB, Houghton E, Kicman AT (1995) Anabolic steroids: metabolism, doping and detection in equestrian and human sports. In: Makin HLJ, Gower DB, Kirk DN (Hrsg.) *Steroid analysis*. Blackie Academic & Professional, London, 468-526
- Hagelberg E, Sykes B, Hedges R (1989) Ancient bone DNA amplified. *Nature* **342**: 485
- Hammerl J (1996) Osteoporose einst – osteodensitometrische Untersuchungen an historischen Skeletten. *Medizinische Klinik* **91**(1): 27-28
- Hammerl J, Protsch R, Happ J, Frohn J, Hör G (1991) Osteodensitometrie des Femurhalses an historischen Skeletten. In: Werner E, Matthiaß H (Hrsg.) *Osteologie – interdisziplinär: Untersuchungsmethoden, Rheumatologie, Sportmedizin*. Berlin: Springer
- Hartwig M (1993) Bestimmung der geschlechtlichen Herkunft als Qualitätsparameter bei Rindfleisch anhand von Mustern natürlich vorkommender Sexualhormone. Dissertation, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie der Universität Hamburg
- Hartwig M, Hartmann S, Steinhart H (1995) Bestimmung natürlich vorkommender steroidaler Sexualhormone (Androgene und Gestagene) in Rindfleisch. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **201**: 533-536
- Hartwig M, Hartmann S, Steinhart H (1997) Physiological quantities of naturally occurring steroid hormones (androgens and progestogens), precursors and metabolites in beef of differing sexual origin. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **205**: 5-10
- Hedges REM, Millard AR, Pike AWG (1995) Measurements and relationships of diagenetic alteration of bone from three archaeological sites. *J. Arch. Sci.* **22**: 201-209
- Heikkinen R, Fotsis T, Adlercreutz H (1981) Reversed-phase C18 cartridge for extraction of estrogens from urine and plasma. *Clin Chem* **27**: 1186-1189
- Herrall JA, Lewan MD (2002) Sources of mummy bitumen in ancient Egypt and Palestine. *Archaeometry* **44**: 285-294
- Herrmann B (1988) Erste anthropologische Befunde aus der Lichtenstein-Höhle bei Dorste. *Heimatbl. südwestl. Harzrand* **44**: 13-15
- Hoffmann H (1998) Einführung und Verbreitung der Kartoffel in der Lüneburger Heide. *Materialien zum Museumsbesuch. (29) Landwirtschaftsmuseum Lüneburger Heide, Uelzen*

- Hummel S (1992) Nachweis Y-chromosomaler DNA-Sequenzen aus menschlichem bodengelagerten Skelettmaterial unter Anwendung der Polymerase Chain Reaction. Dissertation, Göttingen
- Hummel S (2003) Ancient DNA Typing. Methods, Strategies and Applications. Springer, Heidelberg
- Hummel S, Schutkowski H, Rameckers J, Grupe G, Herrmann B (unveröff.) Vereinfachtes Verfahren zur histologischen Altersdiagnose. Göttingen: Historische Anthropologie, unveröffentlichtes Manuskript
- Ivell R, Walther N (1999) The role of sex steroids in the oxytocin hormone system. *Molecular and Cellular Endocrinology* **151**: 95-101
- Iizuka H, Nairo A (Hrsg.) (1981) Microbial conversion of steroids and alkaloids. University of Tokyo Press, Springer, Berlin
- Kähler I (1996) Zur Bau- und Ausstattungssituation der Augustiner-Chorherrenkirche Bordesholm um 1521. In: Albrecht U, Kaldewei G, Krohm H, Lemaitre U, Lins U (Hrsg.) Der Bordesholmer Altar des Hans Brüggemann: Werk und Wirkung. Berlin: Reimer, 31-41
- Kauert G (Hrsg.) (1986) Katecholamine in der Agonie. Konzentrationsbestimmungen im Nebennierenmark, Blut und Urin von Leichen. Ferdinand Enke, Stuttgart
- Kaup Y, Baumer U, Koller J, Hedges REM, Werner H, Hartmann H-J, Etspüler H, Weser U (1994) Zn₂Mg alkaline phosphatase in an early ptolemeic mummy. *Zeitschrift für Naturforschung* **49**: 489-500
- Keil G (1989) Seuchenzüge des Mittelalters. In: Herrmann B (Hrsg.) Mensch und Umwelt im Mittelalter. Frankfurt: Fischer, 109-128
- Kempe S, Vladi F (1988) Die Lichtenstein-Höhle. Eine präholozäne Gerinnehöhle im Gips und Stätte urgeschichtlicher Menschenopfer am Südwestrand des Harzes. *Heimatbl. südwestl. Harzrand* **44**: 1-12
- Killops SD, Killops VJ (1993) An introduction to organic geochemistry. Harlow, UK: Longman Scientific & Technical
- Klappauf L (1981) Vorbericht zur Notgrabung 1981 im Bereich des ehem. Brüdernklosters zu Goslar. *Nachr. Nieders. Urgesch.* **50**: 217-226
- Klappauf L (1986) Stadtkernarchäologische Untersuchungen in Goslar und die Montanarchäologie des Harzes. *Arbeitsh. Denkmalpfl. Nieders.* **2**: 53-57
- Klappauf L, Linke F-A, Bingener A (2000) Ausgrabungen am ehemaligen Brüdernkloster Goslar. In: Segers-Glocke C (Hrsg.) Auf den Spuren einer frühen Industrielandschaft. Naturraum – Mensch – Umwelt im Harz. *Arbeitsh. Denkmalpfl. Nieders.* **21**: 37-38
- Kroll H (1995) Ausgesiebtes aus Gerste aus Feudvar, Vojvodina. In: Kroll H, Pasternack R (Hrsg.) *Res archaeobotanicae*. Kiel, 135-143

- Krska R (1998) Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals. *J Chromatogr A* **815**: 49-57
- Krska R (1999) Analytik von *Fusarium*-Mykotoxinen in Europa. *Nachr Chem Tech Lab* **47**: 553-556
- Kunsch K, Kunsch S (2000) *Der Mensch in Zahlen. Eine Datensammlung mit über 20.000 Einzelwerten.* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
- Kurzer MS (2002) Hormonal effects of soy in premenopausal women and men. *J Nutr* **132**: 570S-573S
- Lange E (1978) Unkräuter in Leinfunden von der Spätlatènezeit bis zum 12. Jahrhundert. Ein Beitrag zur entwicklung der Unkrautvegetation des Leins. *Ber Deutsch Bot Ges* **91**: 197-204
- Lassen C, Hummel S, Herrmann B (1994) Comparison of DNA extraction and amplification from ancient human bone and soft tissue. *Int. J. Leg. Med.* **107**: 152-155
- Leichter I, Weinreb A, Hazan G, Loewinger E, Robin GC, Steinberg R, Menczel J, Makin M (1981) The effect of age and sex on bone density, bone mineral content and cortical index. *Clin Orthop*: 232-239
- Leidenberger FA (1997) Endokrinologie der Schwangerschaft, Geburt und Lactationsphase. In: Leidenberger FA (Hrsg.) *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte.* Springer, Berlin; Heidelberg; New York, 85-109
- Lin DS, Connor WE, Napton LK, Heizer RF (1978) The steroids of 2000-year-old human coprolites. *Journal of Lipid Research* **19**: 215-221
- Lowenstein JM (1980) Species-specific Proteins in Fossils. *Naturwissenschaften* **67**: 343-346
- Lowenstein JM, Scheuenstuhl G (1991) Immunological methods in molecular palaeontology. *Phil Trans R Soc Lond B* **333**: 375-380
- Luker J, Pollmann J, Schmidt D, Hummel S (2004) Minimizing sample destruction for DNA analysis. Poster, 7th International Conference on ancient DNA & Associated Biomolecules, July 10th -17th, Brisbane, Australia
- Macdonald IA, Bokkenheuser VD, Winter J, McLernon AM, Mosbach EH (1983) Degradation of steroids in the human gut. *J Lipid Res* **24**: 675-700
- Mackey R, Eden J (1998) Phytoestrogens and the menopause. *Climacteric* **1**: 302-308
- Makin HLJ, Honour JW, Shackleton CHL (1995) General methods of steroid analysis. In: Makin HLJ, Gower DB, Kirk DN (Hrsg.) *Steroid analysis.* Blackie Academic & Professional, London, 114-228
- Matossian MK (1981) Mold poisoning: an unrecognized english health problem, 1550-1800. *Medical History* **25**: 73-84

- Matossian MK (1984) Mold poisoning and population growth in England and France, 1750-1850. *J Econom Hist* **44**: 669-686
- Matossian MK (1989) *Poisons of the past. Molds, epidemics, and history*. Yale University Press, New Haven, London
- Matossian MK (1996) Effects of natural fungal toxins on fertility and mortality in Connecticut, 1660-1900. *Journal of Nutritional and Environmental Medicine* **6**: 285-300
- McEvedy C, Jones R (1978) *Atlas of world population history*. Harmondsworth, UK: Penguin, 28
- Menken J, Trussell J, Watkins S (1981) The nutrition fertility link: an evaluation of the evidence. *Journal of Interdisciplinary History* **11**: 425-441
- Metzler M, Pfeiffer E (2001) Chemistry of natural and anthropogenic endocrine active compounds. In: Metzler M (Hrsg.) *The handbook of environmental chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, **3(I)**: 63-80
- Netting RM (1981) *Balancing on an alp*. Cambridge University Press, Cambridge
- Nieves J, Cosman F, Lindsay R (2002) Primary Osteoporosis. In: Coe FL, Murray J (Hrsg.) *Disorders of bone and mineral metabolism*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 805-830
- NIST (= National Institute of Standards and Technology) (1992) MS-Library für Finnigan, Vers. 1.15, Stand: September 1992
- Ourisson G (1992) *Die Hopanoide*. Rheinisch-Westfälische Akademie der Wissenschaften, Vorträge N395. Opladen: Westdeutscher Verlag
- Pfänder HJ, Seiler KU, Ziegler A (1985) Morgendliche „Müsli“-Mahlzeit als Ursache einer chronischen Vergiftung mit Secale-Alkaloiden. *Deutsches Ärzteblatt* **82**: 2013-2016
- Pfister C (1994) *Bevölkerungsgeschichte und historische Demographie 1500-1800*. München: Oldenburg
- Pfister C (1995) *Im Strom der Modernisierung: Bevölkerung, Wirtschaft und Umwelt 1700-1914. Geschichte des Kantons Bern seit 1798, Teil 4*. Historischer Verein des Kantons Bern, Bern
- Piepenbrink H, Herrmann B, Hoffmann P (1983) Tetracyclintypische Fluoreszenzen an bodengelagerten Skeletteilen. *Zeitschrift für Rechtsmedizin* **91**: 71-74
- Poinar HN, Stankiewicz BA (1999) Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8426-8431
- Rademacher R, Waidelich D (1996) Nachweise für den rituellen Umgang mit Nachgeburten. Archäologische, archäometrische und volkskundliche Untersuchungen an Keramikfunden aus Sindelfingen, Lkr. Böblingen. *Fundberichte aus Baden-Württemberg* **21**: 619-686

- Rahlf T (Hrsg.) (1996) Getreide in der Sozial- und Wirtschaftsgeschichte vom 16. bis 18. Jahrhundert. Das Beispiel Köln im regionalen Vergleich. Kleine Schriften zur Geschichte und Landeskunde Auenthal, Trier
- Rickard DJ, Subramaniam M, Spelsberg TC (1999) Molecular and Cellular Mechanisms of Estrogen Action on the Skeleton. *Journal of Cellular Biochemistry Supplements* **32/33**: 123-132
- Rochholz EL (1856) *Schweizersagen aus dem Aargau*. Aarau: Sauerländer
- Rosner W (1991) Plasma Steroid-Binding Proteins. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* **20**: 697-721
- Rottländer RCA (1985) Nachweis und Identifizierung von archäologischen Fetten. *Fette Seifen Anstrichmittel* **87**: 314-317
- Ruf F (1990) Die Suppe in der Geschichte der Ernährung. In: Bitsch I, Ehlert T (Hrsg.) *Essen und Trinken in Mittelalter und Neuzeit: Vorträge eines interdisziplinären Symposiums vom 10.-13. Juni 1987 an der Justus-Liebig-Universität Gießen*. 2 Thorbecke, Sigmaringen, 163-181
- Rumley AG (1988) The in vitro stability of catecholamines in whole blood. *Ann Clin Biochem* **25**(Pt 5): 585-586
- Russell JA, Leng G (1998) Sex, parturition and motherhood without oxytocin? *Journal of Endocrinology* **157**: 343-359
- Russell JC (1978) Die Bevölkerung Europas 500-1500. In: Cipolla CM, Borchardt K (Hrsg.) *Europas Wirtschaftsgeschichte, Bd. 1*, Stuttgart
- Saalfeld D (1989) Nahrungsverbrauch und Agrarproduktion im Wandel vom Mittelalter zur Neuzeit. *AID-Verbraucherdienst* **34**: 76-85
- Saalfeld D (1990) Wandlungen der bäuerlichen Konsumgewohnheiten vom Mittelalter zur Neuzeit. In: Bitsch I, Ehlert T (Hrsg.) *Essen und Trinken in Mittelalter und Neuzeit: Vorträge eines interdisziplinären Symposiums vom 10.-13. Juni 1987 an der Justus-Liebig-Universität Gießen*. 2 Thorbecke, Sigmaringen, 59-75
- Salaman RN (1970) The relation between potato and bread consumption in a rapidly growing population. In: Salaman RN (Hrsg.) *The history and social influence of the potato*. Cambridge University Press, Cambridge, 537-542
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2. Aufl. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor University Press
- Sandgruber R (1982) Die Einführung der Kartoffeln in Österreich. Sozialgeschichtliche und volkskundliche Interpretation. In: Hinrichs E, Wiegelmann G (Hrsg.) *Sozialer und kultureller Wandel in der ländlichen Welt des 18. Jahrhunderts*. Wolfenbütteler Forschungen. Herzog-August-Bibliothek, Wolfenbüttel, **9**: 163-194

- Schicksnus T, Müller-Goymann CC (2001) Estradiol degradation products in aqueous solutions. *Arch. Pharm. Med. Chem.* **334**(Suppl. 2): 66
- Schmerer WM (2000) Optimierung der STR-Genotypenanalyse an Extrakten alter DNA aus bodengelagertem menschlichen Skelettmaterial. Dissertation, Göttingen: Cuvillier
- Schmidt G, Steinhart H (2000) Festphasenextraktion und GC-MS-Bestimmung von Steroidhormonmustern in Rindermuskel. *GIT Labor-Fachzeitschrift* 12/2000: 1430-1431
- Schmidt D, Hummel S, Herrmann B (2002) Does a molecular analysis necessarily mean sample destruction? Poster, 6th International conference on Ancient DNA, Jerusalem, Israel
- Schoeninger MJ, Moore KM, Murray ML, Kingston JD (1989) Detection of bone preservation in archaeological and fossil samples. *Appl. Geochem.* **4**: 281-292
- Schultes T (2000) Typisierung alter DNA zur Rekonstruktion von Verwandtschaft in einem bronzezeitlichen Skelettkollektiv. Dissertation, Göttingen: Cuvillier
- Schutkowski H (1994) Spurenelementanalysen. In: Herrmann B (Hrsg.) *Archäometrie. Naturwissenschaftliche Analyse von Sachüberresten*. Berlin: Springer, 67-86
- Schutkowski H, Fabig A, Herrmann B (2000a) Nahrung und Subsistenz der Goslarer Hüttenleuten anhand anthropologischer Untersuchungen. In: Segers-Glocke C (Hrsg.) *Auf den Spuren einer frühen Industrielandschaft. Naturraum – Mensch – Umwelt im Harz. Arbeitsh. Denkmalpfl. Nieders.* **21**: 70-71
- Schutkowski H, Fabig A, Herrmann B (2000b) Schwermetallbelastung bei Goslarer Hüttenleuten des 18. Jahrhunderts. In: Segers-Glocke C (Hrsg.) *Auf den Spuren einer frühen Industrielandschaft. Naturraum – Mensch – Umwelt im Harz. Arbeitsh. Denkmalpfl. Nieders.* **21**: 96-99
- Siegel S (1985) *Nichtparametrische statistische Methoden*. 2. Aufl. Eschborn: Fachbuchhandlung für Psychologie
- Sjövall J, Axelson M (1982) Newer approaches to the isolation, identification, and quantitation of steroids in biological materials. *Vitamins Hormones* **39**: 31-129
- Skalak R, Chien S (1987) *Handbook of Bioengineering*. New York: McGraw-Hill
- Sobolik KD, Gremillion KJ, Whitten PL, Watson PJ (1996) Technical note: sex determination of prehistoric human paleofeces. *American Journal of Physical Anthropology* **101**: 283-290
- Steinke H (1997) Die Einführung der Kartoffel in der Waadt 1740-1790. Agrarmodernisierung aus bäuerlicher Sicht. *Z Agrargesch Agrarsoziol* **45**: 15-39
- Steyn DG (1933) Poisoning of human beings by weeds contained in cereals (bread poisoning). *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry* **1**: 219-266

- Stott AW, Evershed RP (1996) delta 13C analysis of cholesterol preserved in archaeological bones and teeth. *Anal Chem* **68**: 4402-4408
- Stott AW, Evershed RP, Jim S, Jones V, Rogers JM, Tuross N, Ambrose SH (1999) Cholesterol as a new source of palaeodietary information: experimental approaches and archaeological applications. *J Archaeol Sci* **26**: 705-716
- Thurman EM, Mills MS (Hrsg.) (1998) Solid-phase extraction. Principles and practice. Chemical analysis. A series of monographs on analytical chemistry and its applications 147, Hrsg. Winefordner JD. New York: John Wiley & Sons
- Uboh CE, Rudy JA, Railing FA, Enright JM, Shoemaker JM, Kahler MC, Shellenberger JM, Kemecsei Z, Das DN (1995) Postmortem tissue samples: an alternative to urine and blood for drug analysis in racehorses. *J Anal Toxicol* **19**: 307-315
- Ulrich-Bochsler S (1990) Von Traufkindern, unschuldigen Kindern, Schwangeren und Wöchnerinnen. Anthropologische Befunde zu Ausgrabungen im Kanton Bern. In: Schibler J, Sedlmeier J, Spycher H (Hrsg.) Festschrift für Hans Stampfli. Basel: helbing und Lichtenhahn, 309-318
- Ulrich-Bochsler S (Hrsg.) (1997) Anthropologische Befunde zur Stellung von Frau und Kind in Mittelalter und Neuzeit. Soziobiologische und soziokulturelle Aspekte im Lichte von Archäologie, Geschichte, Volkskunde und Medizingeschichte. Berner Lehrmittel- und Medienverlag, Bern
- Ulrich-Bochsler S, Schäublin E (1983) Anthropologische Beobachtungen zu den Gräbern im ehemaligen Altarhaus der Pfarrkirche von Wangen a. A. *Jb. Oberaargau*: 115-127
- Upmeier A (2001) Toxikokinetik von östrogenartig wirkenden Industriechemikalien und Phytoöstrogenen., Fachbereich Chemie der Universität Dortmund
- Völkel DE (Hrsg.) (1973) Kloster und Kirche der Augustiner Chorherrn zu Bordesholm. Bordesholm: Kirchenvorstand der ev.-luth. Kirchengemeinde Bordesholm-Brügge
- Vandenbroeke C (1971) Cultivation and consumption of the potato in the 17th and 18th century. *Acta historiae Nederlandica* **5**: 15-39
- Vandenheuvel WJA, Sweeley CC, Horning EC (1960) Separation of Steroids by chromatography. *J Am Chem Soc* **82**: 3481-3482
- van Egmond HP (1989) Mycotoxins in dairy products. London: Elsevier
- Vanluchene E, Vandekerckhove D (1988) Group fractionation of free and conjugated steroids by means of disposable silica-based anion-exchange columns. *J Chromatogr* **456**: 175-182
- von Gundlach C (1986) Agrarinnovation und Bevölkerungsdynamik - aufgezeigt am Wandel der Dreifelderwirtschaft zur Fruchtwechselwirtschaft unter dem Einfluß der Kartoffeleinführung im 18. Jh. Eine Fallstudie im südwestdeutschen Raum., Geowiss. Fakultät der Universität Freiburg i. Br.

- von Gundlach C (1987) Die Einführung neuer Grundnahrungsmittel. Dargestellt am Beispiel der Kartoffel. *Z Agrargesch Agrarsoziol* **35**: 44-56
- von Gundlach C (1989) Nahrungsmittelversorgung und Geburtenregulation, aufgezeigt am Beispiel der Kartoffel. *Z Agrargesch Agrarsoziol* **37**: 28-36
- Wark JD (1993) Osteoporosis: pathogenesis, diagnosis, prevention and management. In: Burger HG (Hrsg.) *The Menopause. Clinical Endocrinology and Metabolism. International Practice and Research*. Baillière Tindall, London, **7**: 151-181
- Wendler U (1992) Der Kartoffelanbau in der Lüneburger Heide bis zur Mitte des 19. Jahrhunderts. In: Ottenjann K, Ziessow K-H (Hrsg.) *Die Kartoffel. Geschichte und Zukunft einer Kulturpflanze. Arbeit u. Leben auf dem Lande*. Cloppenburg, **1**: 163-185
- Weser U, Etspüler H, Kaup Y (1995) Enzymatic and immunological activity of 4000 years aged bone alkaline phosphatase. *FEBS Lett* **375**: 280-282
- Wetter U (1999) Extraktion von Adrenalin und Noradrenalin aus Leichenblut und Analyse auf dem HPLC mit Fluoreszenzdetektor. Dissertation, Köln
- Willerdig U (Hrsg.) (1986) *Zur Geschichte der Unkräuter Mitteleuropas*. Göttinger Schriften zur Vor- und Frühgeschichte **22**. Wachholtz, Neumünster
- Winkler A (2003) Isolierung, Identifizierung und Quantifizierung von Alkyl-Kohlenstoff in Böden. Dissertation, Bayreuth
- Wischmann H, Hummel S, Herrmann B (1998) Der Nachweis organischer Spurenstoffe in archäologischen Skelettmaterialien. Poster, GfA-Tagung, Göttingen, 01.-03.10.1998
- Wischmann H, Hummel S, Herrmann B (2000) Trace analysis of endogenous and exogenous biomolecules from archaeological skeleton materials. *Anthrop. Anz.* **58**: 77-83
- Wischmann H, Hummel S, Rothschild MA, Herrmann B (2002) Analysis of nicotine in archaeological skeletons from the early modern age and from the bronze age. *Archaeometry* **4**: 47-52
- Wolff J, Ocker H-D (1985) Einfluß des Backprozesses auf den Gehalt des Mutterkornalkaloides Ergometrin. *Getreide, Mehl und Brot* 1985: 110-113
- Wrigley EA, Davies RS, Oeppen JE, Schofield RS (1997) *English population history from family reconstitution 1580-1837*. Cambridge: Cambridge University Press
- Wuttke W, Jarry H, Becker T, Schultens A, Christoffel V, Gorkow C, Seidlova-Wuttke D (2003) Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas* **44** (Suppl 1): S9-20
- Yalow RS, Berson SA (1959) Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* **184** (Suppl. 21): 1648-1649

Yamada H, Yoshizawa K, Hayase T (2002) Sensitive determination method of estradiol in plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B* **775**: 209-213

Ziessow K-H (1992) Kolumbus' spätes Erbe: Dreihundert Jahre Entdeckungsreisen der Kartoffel in Europa. In: Ottenjann K, Ziessow K-H (Hrsg.) *Die Kartoffel. Geschichte und Zukunft einer Kulturpflanze. Arbeit u. Leben auf dem Lande. Cloppenburg*, **1**: 15-44

8. Anhang

8.1 Verzeichnis der Abkürzungen

SI-Einheiten wurden in diese Aufstellung nicht aufgenommen.

Abb.	Abbildung
aDNA	ancient DNA, alte DNA
Anm.	Anmerkung
AU	absorption units, Absorptionseinheiten (HLPC)
bidest	bidestillata, zweifach destilliert
BSA	Bovines Serum-Albumin
C	Concentration, Konzentration
C1, C2, ...	Carbon, Kohlenstoff-(Atome) mit Zählung in der Molekülstruktur
ca.	circa
cpm	counts per minute, Zählungen pro Minute
DCM	Dichlormethan
E2	17 β -Estradiol
f	female, weiblich
GC	GC-Ofen
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
HRT	Hormone Replacement Therapy, Hormonsubstitutionstherapie
ID	inner diameter, innerer Durchmesser
λ	Wellenlänge
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
m	male, männlich
M	Monat(e)
M	Masse des unzerstörten Moleküls (in der Massenspektrometrie)
M ⁺	Masse des Molekülions (in der Massenspektrometrie)
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometer
MU	Mass Units, Masseneinheiten (in der Massenspektrometrie)
MW	Mittelwert
NaAc	Natriumacetat
n.d.	non determinatum, nicht bestimmt
NIST	National Institute of Standards and Technology
pH	pondus Hydrogeni, Protonenaktivitätsexponent
PS	Polystyrol
®	Warenzeichen
RIA	Radioimmunoassay
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
r _s	Spearman's Rang-Korrelationskoeffizient
SHBG	Sex Hormone Binding Globulin
SIDS	Sudden Infant Death Syndrome
SIM	single ion monitoring
SPE	Solid-Phase Extraction, Festphasenextraktion
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
TLC	Thin Layer Chromatography, Dünnschichtchromatographie
™	Trademark

TMS	Tri-Methyl-Silyl
TOT	Totalionenstrom
U	Units, (Enzym-)Einheiten
W	Woche(n)
w/v	weight per volume, Gewicht pro Volumen
Z. n.	Zustand nach...

8.2 Verwendete Geräte und Chemikalien

Geräte für Analytik

Fraktionssammler, Gilson FC 203B Fraction Collector
 Gamma-Counter, Typ 1470 Wizard, Wallac (Perkin-Elmer); Software: RIA-CALC, Wallac
 GC/MS, Finnigan MAT GCQ GC mit Temperature Programmable Injector GCQ 119418A;
 MS Finnigan MAT GCQ mit Edwards RV5 Vorvakuumpumpe, Edwards SI100
 Diffusionspumpe, GC/MS Revision B, 1995; Software: Finnigan MAT GCQ 2.2
 HPLC, Hewlett-Packard Series 1100, bestehend aus G1322A Degasser, G1312A Binary
 Pump (Zweikanalpumpe), G1313A ALS (Autosampler), G1316A ColComp
 (Thermostatierter Säulenraum), G1315A DAD (Dioden-Array-Detektor mit
 Deuterium/Wolfram-Lampen $\lambda=190-950$ nm); Software: HP Chemstation 1100 Series,
 Rev. A.06.03 [509]
 SPE-Apparatur, 12 Positionen mit Luer-Inlets, Teflonventilen und Manometer, Merck,
 „Absaugeinheit für die Probenvorbereitung“, Best.-Nr. 1.19851.0001
 Vakkumkonzentrator, Savant Speedvac SC110A mit KNF Neuberger Laboport
 Vakuumpumpe N 840.3 FT.18; Rotor RH8-50 für Glaskolben, Rotor RH60-1240 für
 Braunglasfläschchen 1,5 ml

Laborgeräte, Kleingeräte, Laborzubehör und sonstige Hilfsmittel

Bandsäge, Black & Decker, Typ DN330
 Becherglas, 100 ml, hohe Form, Schott 2111624
 Becherglas, 1000 ml, niedrige Form, Schott 2110654
 Becherglas, 500 ml, niedrige Form, Schott 2110641
 Becherglas, 50 ml, hohe Form, Schott 2111617
 Becherglas, 50 ml, niedrige Form, Schott 2110617
 Demineralisationsanlage, Typ LAB-UPW, TKA Wasseraufbereitungsanlagen GmbH
 DentaSäge, Dentalmikromotor K-10, Handstück und Steuergerät, KaVo-EWL
 Dilumat®, Typ FE 213, Braun
 Enzymtestpipette, 1 ml, Brand 27942
 Exsikkator, Glaswerk Wertheim
 Gasreiniger für GC-Gas, HP High Capacity Gas Purification System mit 3 Kartuschen
 (Hydrocarbon-Moisture Cartridge, High-Capacity Oxygen Cartridge, Indicating
 Oxygen Cartridge), Best.-Nr. 5183-1907
 Gefriertrocknungsanlage, Christ Alpha 1-4, mit Drehschieberpumpe Vacuubrand RE2
 Glastrichter, 50 mm, Schütt 9.251006
 Halbanalysenwaage, Präzisionswaage research Typ R 160 P, Sartorius
 Innenlochsäge, Leitz® 1600
 Kapillarschneider, Supelco Capillary Cleaving Tool, 2-3740
 Kugelschwingmühle, Typ MM2 mit Zirkonium-Mahlbechern, Retsch
 Kühlzentrifuge, Heraeus, Typ Cryofuge 5000
 Lichtmikroskop, Olympus BH-12 mit Fotoeinrichtung C35AD-2

Magnetrührer, Ikamag® RET, Ikamag® MTC und Ikamag® RH, Janke & Kunkel Ika-Werk
 Meßkolben, 100 ml
 Meßkolben, 1000 ml
 Meßkolben, trapezförmig, 10 ml
 Meßkolben, trapezförmig, 2 ml
 Meßkolben, trapezförmig, 25 ml
 Meßkolben, trapezförmig, 5 ml
 Meßpipetten, 2 ml, Superior
 Mörser, Achat mit Pistill, Innendurchmesser ca. 100 mm, C. Giese KG
 Muffelofen, Heraeus® KM 260
 Multipette, Eppendorf plus, 1 µl bis 10ml
 pH-Meter, Knick Digital pH-Meter 646, Elektrode Mettler Toledo InLab®
 Pipette, Eppendorf Varipette Typ Reference, 0.5-10 µL
 Pipette, Eppendorf Varipette Typ Reference, 100-1000 µL
 Pipette, Eppendorf Varipette Typ Reference, 10-100 µL
 Pipettierbällchen, für Pasteurpipetten, 2 ml
 Pipettierhilfe, Pipetus® akku, Hirschmann
 Präzisionswaage, Typ E 1200 S excellence, Sartorius
 Schneidemaschine, Typ 270109, Bodo Schmidt, Göttingen
 Schüttler, IKA Vibrax® VXR mit Aufsatz VX 2, Janke & Kunkel Ika-Werk
 Spritzflasche, 500 ml, PE
 Trockenschrank, Heraeus®
 Trockenschrank, Memmert
 Ultraschallbad, Sonorex RK 102, Bandelin electronic
 Vollpipette, 10 ml, Hirschmann oder Brand
 Vollpipette, 2 ml, Hirschmann oder Brand
 Vollpipette, 25 ml, Hirschmann oder Brand
 Vollpipette, 5 ml, Hirschmann oder Brand
 Vollpipette, 50 ml, Hirschmann oder Brand
 Vollpipette, 8 ml, Hirschmann oder Brand
 Zentrifuge, Hettich Universal 30RF
 Zentrifuge, Tischzentrifuge, Eppendorf 5415

Verbrauchsmaterialien

Baumwollhandschuhe
 Epoxidharz, Biodur™ Standardepoxidharz E12 und Härter E1, Biodur Products
 Braunglasfläschchen, G4, braun, 5 ml; dazu Schraubkappen G18-L und Dichtscheiben G18-PFTE, CS-Chromatographie-Service
 Braunglasfläschchen, G8, braun, 15 ml, dazu Schraubkappen G20, CS-Chromatographie-Service
 Deckgläser, 24×32 mm, IDL
 Dental-Diamantsägeblätter, Diaflex-T H 350 220, Horico
 Einmaluntersuchungshandschuhe, Derma Clean, Ansell Medical
 Eukitt, Einschlußmittel für mikroskopische Technik, O. Kindler & Co.
 Falten-Filter, Schleicher und Schuell 5951/2, Nr. 311644
 Ferrules, Phenomenex Graphite, 1/16 Zoll × 0,4 mm, AGO-4698
 Kleinbild-Negativfilme, Kodak Kodacolor Gold 200
 GC-Säulen, Phenomenex „Zebron“ ZB-5, 30 m × 0,25 mm ID × 0,25 µm
 5 % Phenylpolysiloxane, Best.-Nr. 7HG-G002-11
 GC-Trägergas, Helium 5.5, Messer-Griesheim

Gesichtsmasken, Surgine face mask, Johnson & Johnson
 Glaskolben, mit ausgezogener Spitze, 25 ml, Sonderanfertigung Fa. Rettberg
 Glasröhrchen, mit Normschliff 14,5/23 und Glasstopfen mit Normschliff, 10-15 ml
 HPLC-Säulen, Phenomenex Jupiter 5 μ , C18, 300Å, 250 \times 4,6 mm ID, Best.-Nr. 00G-4053-E0
 HPLC-Säulen, Phenomenex Hypersil ODS 5 μ , C18, 300Å, 250 \times 4,6 mm ID, Best.-Nr. 00G-0152-E0
 Injektionsspritzen, Hamilton gas-tight Syringes 10 μ l, 26s/2"/2, Nr. 1701N
 Liner, Restek 4 mm ID straight
 Mikroinsätze G30 für Braunglasfläschchen, CS-Chromatographie-Service
 Objektträger, ca. 76 \times 26 mm, IDL
 Parafilm® M, American National Can™
 Pasteurpipetten, 150 mm, Brand 7477 15
 Pasteurpipetten, 230 mm, Brand 7477 20
 Perlonhandschuhe
 Pipettenspitzen, blaue Spitzen, 1 ml, Sarstedt
 Pipettenspitzen, Eppendorf Combitips plus, 0,5 ml
 Pipettenspitzen, gelbe Spitzen, 100 μ l, Sarstedt
 Pipettenspitzen, Standardtips, 10 μ l, Eppendorf
 Präzisionstücher, Kimwipes® + Kimwipes® Lite, Kimberly-Clark
 Probenfläschchen G1, Braunglas, 1,5 ml, CS-Chromatographie-Service Nr. 300102; dazu
 Dichtscheiben G8-PFTE, CS; Schraubkappen G8-L, CS
 Reaktionsgefäße, 0,5 ml, safe-lock, Eppendorf
 Reaktionsgefäße, 2 ml, safe-lock, Eppendorf
 Rundbodengläser, AR-Klarglas, 80 \times 11,0/1,0 mm
 Septen, HT-Septa, 10 mm, Nr. 366011, CS-Chromatographie-Service GmbH, Langerwehe
 SPE-Kartuschen, Phenomenex Strata™ C18-E, 4,6 \times 100 mm (5 ml, 500 mg Adsorbens)
 SPE-Kartuschen, Supelco DSC-18 u. DSC-18LT (5 ml, 200 mg Adsorbens)
 SPE-Kartuschen, Varian BondElut® C18 (6 ml, 500 mg Adsorbens)
 Wägepapier, 9 \times 11,5 cm, MN 226, Macherey-Nagel
 Zählröhrchen, Polystyrol, 5 ml, Greiner
 Zentrifugenröhrchen, 10 ml, Pyrex Typ 9826

Chemikalien

Aceton, für die HPLC, Promochem 2435
 Aceton, SupraSolv®, für die organische Spurenanalyse, Merck
 Acetonitril, für HPLC, Elution Grade, Chromanorm™ Prolabo
 Ammoniumacetat, Merck 1116
 5 α -Androstan-17 β -ol-3-one, Sigma A-8380
 4-Androstene-3,17-dione, Sigma A-9630
 Androsterone, Sigma A-9755
 Aqua bidestillata, eigene Herstellung
 Charcoal, Sigma C-4386
 Chloroform, für die Rückstandsanalyse, Fluka 25669
 5 β -Cholestanol, Sigma C-2882
 Cholesterol, Sigma C-8667
 Dextran, Pharmacia Biotech No. 17-0280-01
 Dichlormethan, für die Rückstandsanalyse, Promochem 3023
 Diethylether, pro analysi, Merck
 EDTA (Ethylendinitrotetraacetat Dinatriumsalz-Dihydrat), Titriplex® III, Merck

Epiandrosterone, Sigma E-3375
 17 β -Estradiol, Sigma E-8873 u. E-8875
 17 β -Estradiol 3-Benzoeat
 Estrone, Sigma E-9750
 Ethanol absolut, Multisolvent® für HPLC, Scharlau
 Ethylacetat, HPLC grade, Scharlau Ac147
 Extran® Typ AP 13, alkalisch mit Detergenzien, Merck
 Gelatine, Merck 4070
 β -Glucoronidase, aus *Helix pomatia*, Sigma G-7017, Stammlösung 100000 Fishman-
 Einheiten/ml
 HPLC-Wasser, LiChrosolv® für die Chromatographie, Merck
 Methanol, für HPLC, Elution grade, Chromanorm™ Prolabo
 17 α -Methyltestosterone, Sigma M-7252
 Natriumacetat wasserfrei, p. a., Merck
 Natriumchlorid, Baker 0278
 Natriumchlorid, p.a., Merck
 Natriumdihydrogenphosphat wasserfrei, p. a., Fluka
 Natriumhydroxid Plätzchen, p. a., Merck
 Natriumsulfat wasserfrei, p. a., Merck
 Neutralöl
 n-Hexan, Merck UniSolv® für die organische Spurenanalyse
 N-Methyl-N-(Trimethylsilyl)tri-Fluoroacetamide, Sigma M-7891
 5-Pregnen-3 β -ol-20-one, Sigma P-9129
 Progesterone, Sigma P-0130
 Proteinase K, DNA purification grade, 37,6 U/mg, AppliedBiosystems
 RIA-Antikörper zu 17 β -Estradiol #22.2, Endokrinologie Göttingen
 RIA-Tracer 16 α -¹²⁵I 17 β -Estradiol, NEX 144, New England Nuclear
 Salzsäure, rauchend 37 %, Merck
 Testosterone, Sigma T-1500
 Thimerosal, Sigma T-5125
 Toluol, SupraSolv®, für die organische Spurenanalyse, Merck
 Triethylamin, Sigma T-0886
 Triethylammoniumsulfat
 bis-(Trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) mit 1% Trimethylchlorosilane (TMCS),
 Sigma T-6381

8.3 Probenlisten

Tab. 8.3.A Rezente menschliche Knochenproben
 Für farbig unterlegte Knochenproben existieren korrespondierende Blutproben
 (vgl. Tab. 8.3.B)

Individuum	Bezeichnung	Sex	Alter	Todesursache	Bemerkungen
G01	105/00	m	57	Bronchialcarcinom	Strahlentherapie
G02	114/98	f	62	Hypovolämischer Schock	chronisches Lungenemphysem
G03	115/98	m	68	Herz-Kreislaufversagen, Nierenversagen	
G04	118/98	m	60	Blasenkrebs	
G05	122/92	m	70	Herzrhythmusstörungen	
G06	157/99	m	46		
G07	17/00	f	76	Lungenembolie	Uteruscarcinom
G08	191/97	f	47	Leukämie	Chemotherapie
G09	194/98	f	63		

G10	196/97	f	51	Endocarditis, Embolie	Aorteninsuffizienz
G11	198/97	m	59		
G12	209/97	m	64	Nierenzellcarcinom	Chemotherapie, Strahlentherapie
G13	210/97	m	65	Leberzirrhose	
G14	238/97	f	76	Lungenembolie	Nierentumor
G15	243/97	f	9	Leukämie	Down-Syndrom, Chemotherapie
G16	247/99	m	78	chronische destruktive Lungenerkrankung, möglicherweise Tuberkulose	Raucher
G17	249/99	m	47	Unfall	
G18	256/99	m	66	hochgradige arterielle Verschlusskrankheit	Raucher
G19	257/99	m	44	Lebererkrankung	
G20	259/99	f	78	Herzinsuffizienz	
G21	260/99	f	81	Bronchitis, Pneumonie	
G22	373/93	m	64	Herz-Kreislaufversagen	Aortenklappenstenose
G23	51/00	f	87	Cervixcarcinom	Strahlentherapie
G24	52/00	m	57	Bronchialcarcinom	Raucher
G25	53/00	f	89		
G26	55/00	f	69		
G27	61/00	m	59		
G28	62/00	f	81		
G29	68/00	m	52	Leukämie	Chemotherapie
G30	69/00	m	78		
G31	72/00	f	71		
G32	73/00	f	75		
G33	91/00	m	60	Bronchialcarcinom	Raucher, Chemotherapie
G34	MB4	f			4 Jahre bodengelagert
M01	GS1226/01	m	27		
M02	GS1227/01	m	21		
M03	GS1229/01	m	37		
M04	GS1235/01	m	46		
M05	GS1251/01	f	37		
M06	GS1264/01	f	33		
M07	GS1268/01	m	24		
M08	GS1276/01	f	22		
M09	GS1329/01	m	24		
M10	GS1345/01	m	45		
M11	GS1381/01	m	41		
M12	GS1464/01	m	34		
M13	GS1506/01	f	45		
M14	GS1517/01	m	33		
M15	GS1534/01	f	24		
M16	GS1768/01	f	43		
M17	GS2190/01	f	25		
M18	GS2178/01	m	16		
M19	GS2225/01	f	33		
M20	GS2257/01	m	18		
N01	H02096/01	f	73	Thrombose	
N02	H02575/01	f	80		Leriche-Syndrom
N03	H04062/01	m	61		Gangrän
N04	H07219/01	f	82		diabetisches Gangrän
N05	H07533/01	f	72		arterielle Verschlusskrankheit
N06	S00006/01	f	68	Tumorkachexie	Strahlentherapie, Chemotherapie
N07	S00010/01	m	73	Lungenödem	
N08	S00013/01	m	45	Herz-Kreislaufversagen	
N09	S00020/01	m	78	Lungenembolie	Colonascendenzcarcinom
N10	S00021/01	f	80	Myocardinfarkt	

N11	S00022/01	m	75	Myocardinfarkt	
N12	S00024/01	f	49	Myocardinfarkt	
W01	Sp800/13	f	96	Schlaganfall, Herzerweiterung, Herzvergrößerung, Myocardfibrose	Lebertumor
W02	Sp803/16	m	72	Schlaganfall, Rezidivinfarkt	
W03	Sp799/12	f	51	Schlaganfall, Herzerweiterung, Herzvergrößerung, Myocardfibrose	
W04	Sp805/18	f	50	Schlaganfall, Rezidivinfarkt	chronische Pankreatitis
W05	Sp804/17	m	71	Schlaganfall, Myocardinfarkt	Leberzirrhose
W06	Sp801/14	m	43	Schlaganfall, Myocardinfarkt	Fettleber
W07	Sp795/8	m	40	Schlaganfall, Rezidivinfarkt	
W08	Sp806/19	f	92	Schlaganfall, Herzerweiterung, Herzvergrößerung, Myocardfibrose	Schottergallenblase
W09	Sp810/23	f	78	Schlaganfall, Herzerweiterung, Myocardinfarkt	Gallensteine
W10	Sp815/28	f	75	rote Enzephalomalazie	Gallensteine, Struma nodosa
W11	Sp878/31	m	59	Pneumonie	eitrige Bronchitis
W12	Sp879/32	m	56	metastasierendes Bronchuskarzinom	
W13	Sp877/30	m	61	Schlaganfall, Herzerweiterung, Myocardinfarkt	
W14	Sp878/33	f	71	Beinvenenthrombose rechts, Lungenembolie	Gallenstein
W15	35NS502/01	m	18 M	Schädel-Hirn-Trauma	
W16	Sp296/60	m	2	Brader-Willy-Syndrom	
W17	Sp523/92	m	57	Schlaganfall, Herzerweiterung, Rezidivinfarkt	
W18	Sp826/39	m	65	Schlaganfall, Herzerweiterung, Rezidivinfarkt	
W19	Sp823/36	m	67	Schlaganfall, Myocardinfarkt	
W20	Sp828/41	f	61	Schlaganfall, Herzerweiterung, Rezidivinfarkt	Nebennierenrindenadenome
W21	11U379/01	f	2	Ertrinken	
W22	Sp830/43	m	48	Ösophagusvarizenruptur	Leberzirrhose
W23	Sp822/35	m	89	Schlaganfall, Herzerweiterung, Rezidivinfarkt	
W24	Sp829/42	m	36	Myocarditis	
W25	32U181/01	f	18 M	Pneumonie	
W26	Sp834/47	f	86	Schlaganfall, Coronarthrombose, Myocardinfarkt	
W27	Sp833/46	f	81	Schlaganfall, Coronarthrombose, Rezidivinfarkt	
W28	6U68/01	f	16 M	Schädel-Hirntrauma	
W29	Sp431/88	f	27 SSW	Nabelschnurumschlingung	Totgeburt
W30	Sp853/66	f	29	Beinvenenthrombose links, Lungenembolie	
W31	Sp859/72	m	28	Status epilepticus	
W32	Sp862/74	m	27	Beinvenenembolie rechts, Lungenembolie	Z. n. Spina bifida-OP, Z. n. Hirnventrikel-Shunt-OP
W33	Sp870/82	m	81	Schlaganfall, Myocardinfarkt	Diabetes mellitus
W34	sp872/84	m	50	Medikamenten- und Alkoholintoxikation	
W35	Sp874/86	m	60	Schlaganfall, Herzerweiterung, Myocardfibrose	
W36	Sp878/90	f	61	Schlaganfall, Herzerweiterung, Myocardinfarkt	
W37	Sp881/93	f	89	Schlaganfall, Herzerweiterung, Myocardinfarkt	
W38	Sp879/91	f	55	Schlaganfall, Cor bovinum, Rezidivinfarkt	
W39	Sp889/101	f	92	Beinvenenthrombose links, Lungenembolie	
W40	Sp893/105	f	56	Schlaganfall, Herzerweiterung, Myocardfibrose	
W41	Sp897/109	m	67	Beinvenenthrombose links, Lungenembolie	
W42	Sp898/110	m	33 SSW	Nabelschnurumschlingung	
W43	28BVR7208	m	34	Erhängen	

W44	Sp891/103	f	33	Medikamentenintoxikation	
W45	Sp904/1	m	81	Schlaganfall, Herzerweiterung, Reizdivinfarkt	
W46	Sp901/113	f	39	Hirnarterienaneurysmaruptur	
W47	Sp907/4	m	73	Schlaganfall, Herzerweiterung, Reizdivinfarkt	
W48	Sp916/13	f	48	Schlaganfall, Herzerweiterung, Myocardinfarkt	
W49	27DVR7299	m	22	Opiatintoxikation	
W50	27DVR2479	f	28	Erschossen	
W51	Sp949/37	f	43	Schlaganfall, Herzerweiterung, Myocardinfarkt	
W52	Sp971/68	m	92	Coronarsklerose, Herzerweiterung, Reizdivinfarkt	Z. n. Herzschrittmacher-Implantation
W53	15U640	f	36	Z. n. Sectio, Sepsis	
W54	25BVR8514	m	18	Opiatintoxikation	
W55	32U157/01	m	17	Schädel-Hirntrauma	
W56	Sp1079/67	m	39 SSW	Nabelschnurumschlingung	
W57	26CVR8656	m	20	Opiatintoxikation	mumifiziert
W58	14U139/01	f	11	Pneumonie	spastische Tetraparese
W59	Sp1140/5	m	94	Beinvenenthrombose links, Lungenembolie	
W60	4U461	m	8 W	Sudden Infant Death Syndrome	
W61	Sp1179/44	f	29	Beinvenenthrombose links, Lungenembolie	Down-Syndrom
W62	29U340/01	f	25	Myocarditis	während Sectio verstorben
W63	Sp1385/133	m	17 SSW	Nabelschnurumschlingung	formalinfixiert
W64	Sp572/119	m	93	Schlaganfall, Herzerweiterung, Myocardinfarkt	
W65	Sp266/97	f	101	Schlaganfall, Herzerweiterung, Myocardinfarkt	
W65KM	Sp266/97	f	101	Schlaganfall, Herzerweiterung, Myocardinfarkt	Knochenmark
W66	Sp607/31	f	3	Tracheitis, Pneumonie	
W67	13UR81/02	f	11	Pneumonie	systemischer Lupus erythematodes
W68	15U250/02	f	26 SSW	Chorionamnionitis, Oligohydromie	
W69	Sp652/76	f	29 SSW	Chorionamnionitis	

Tab. 8.3.B Rezente menschliche Blutproben (Leichenblut)
Es existieren korrespondierende Knochenproben (in Tab. 8.3.A farbig unterlegt)

Individuum	Bezeichnung	Sex	Alter	Todesursache	Bemerkungen
W31B	Sp859/72	m	28	Status epilepticus	
W34B	sp872/84	m	50	Medikamenten- und Alkoholintoxikation	
W43B	28BVR7208	m	34	Erhängen	
W49B	27DVR7299	m	22	Opiatintoxikation	
W50B	27DVR2479	f	28	Erschossen	
W54B	25BVR8514	m	18	Opiatintoxikation	
W55B	32U157/01	m	17	Schädel-Hirntrauma	

Tab. 8.3.C Historische menschliche Knochenproben
Bestimmungen der Einzeldaten mittels DNA-Analyse („DNA“), Histologie („HIST“) und Morphologie („MORPH“), sowie historischer Überlieferung („HÜL“). Die Bestimmungen wurden den Arbeiten von Bramanti (1999, „Bram“), Fabig (2002, „Fab“), Finke (1999, „Finke“) und Schultes (2000, „Schu“) entnommen. Daten von S. Hummel („Hu“), F. Schilz („Schi“) und D. Schmidt („Schm“) aus persönlichen Mitteilungen. Erläuterungen zu den Serien in Kap. 3.1.2

Individuum	Bezeichnung	Sex	Individualalter	Skelett-element	Histologie ³⁾	DNA-Erhaltung
BO0001	BO 9, 1. St.	f (HÜL)	27 (HÜL)	Os metatarsus	n.d.	schlecht (Hu)
BO0002	BO 9, 2. St.	f (HÜL)	27 (HÜL)	Os metatarsus	n.d.	schlecht (Hu)
DO0035	DO 35	m (DNA, Schu)	mmat-smat (HIST, Hu)	Femur	2	schlecht (Schu/Schi)
DO0058	DO 58.1	m (DNA, Schu/Schm)	mmat-smat (HIST, Hu)	Femur	3	gut (Schu/Schi)
DO0199	DO 199	f ? (DNA, Schu)	juv-fad (HIST, Hu)	Femur	2	gut (Schu/Schi)
DO0300	DO 300	f (DNA, Schu)	inf2-juv ? (HIST, Hu)	Femur	2	mittel (Schu/Schi)
DO0320	DO 320	n.d.	n.d.	Femur	n.d.	n.d.
DO0901	DO 901	f ? (DNA, Schu)	fmat (HIST, Hu)	Femur	2	n.d.
DO0902	DO 902	m (DNA, Schu/Schm)	smat (HIST, Hu)	Femur	1	gut (Schu/Schi)
DO0903	DO 903b	f (DNA, Schu)	juv-fad ? (HIST, Hu)	Femur	2	schlecht (Schu/Schi)
DO0905	DO 905	m (DNA, Schu)	juv-fad (HIST, Hu)	Femur	2	gut (Schu/Schi)
DO1585	DO 1585	f (DNA, Schu/Schm)	inf2-juv (HIST, Hu)	Femur	2	mittel (Schu/Schi)
DO2263	DO 2263	m ? (DNA, Schi)	n.d.	Femur	n.d.	schlecht (Schu/Schi)
GS0032	GS 32	f (DNA, Bram)	mmat (MORPH, Finke)	Femur	1 (Fab)	schlecht (Bram)
GS0047	GS 47	n.d.	n.d.	Femur	3 (Fab)	n.d.
GS0049	GS 49	m (DNA, Bram)	n.d.	Femur	2 (Fab)	mittel (Bram)
GS0053	GS 53	m (DNA, Bram)	fmat (MORPH, Finke)	Femur	2 (Fab)	gut (Bram, Hu)
GS0064	GS 64	f (DNA, Bram)	mmat (MORPH, Finke)	Femur	3 (Fab)	gut (Bram, Hu)
GS0065	GS 65F	n.d.	n.d.	Femur	2 (Fab)	n.d.
GS0068	GS 68	m (DNA, Bram)	mmat (MORPH, Finke)	Femur	1 (Fab)	gut (Bram)
GS0074	GS 74	m (MORPH, Finke)	mad-fmat (MORPH, Finke)	Femur	3 (Fab)	n.d.
GS0075	GS 75	n.d.	n.d.	Femur	1 (Fab)	n.d.
GS0085	GS 85	m (MORPH, Finke)	sad (MORPH, Finke)	Femur	2 (Fab)	n.d.
GS0092	GS 92	m (MORPH, Finke)	sad (MORPH, Finke)	Femur	2 (Fab)	n.d.
GS0095	GS 95	m (DNA, Bram)	mmat (MORPH, Finke)	Femur	1 (Fab)	sehr gut (Bram, Hu)
GS0096	GS 96	m (DNA, Bram)	fmat (MORPH, Finke)	Femur	1 (Fab)	gut (Bram)
GS0097	GS 97	m (DNA, Bram)	sad (MORPH, Finke)	Femur	1 (Fab)	sehr gut (Bram, Hu)
GS0105	GS 105 ¹⁾	m ? ²⁾	fad-mad (MORPH, Finke)	Femur	2 (Fab)	gut (Bram)
GS0113	GS 113	n.d.	mad-sad (MORPH, Finke)	Tibia	2 (Fab)	n.d.

Anm. 1) microcephaler Schädel

Anm. 2) nach Finke m (MORPH), DNA ebenfalls mit Y-Signalen, könnte nach Hu aber f sein

Anm. 3) Histologiegruppen: 1 = gut, 2 = mittel, 3 = schlecht

Tab. 8.3.D Knochenproben aus den Tierexperimenten (Rattenknochen)
Tiere 1-7 wurden mit E2 behandelt.

Individuum	Tier-Nr.	Interne Bezeichnung	Skelettelemente	Behandlung
R01	1	RE2-	2 Femora, 2 Humeri	E2-Gabe
R02	2	RE2-	2 Femora, 2 Humeri	E2-Gabe
R03	3	RE2-	2 Femora, 2 Humeri	E2-Gabe
R04	4	RE2-	2 Femora, 2 Humeri	E2-Gabe
R05	5	RE2+	2 Femora, 2 Humeri; mit Knochenmark	E2-Gabe
R06	6	RE2+	2 Femora, 2 Humeri; mit Knochenmark	E2-Gabe
R07	7	RE2+	2 Femora, 2 Humeri; mit Knochenmark	E2-Gabe
R08	8	R-	2 Femora, 2 Humeri	-
R09	9	R-	2 Femora, 2 Humeri	-
R10	10	R-	2 Femora, 2 Humeri	-
R11	11	R-	2 Femora, 2 Humeri	-
R12	12	R+	2 Femora, 2 Humeri; mit Knochenmark	-
R13	13	R+	2 Femora, 2 Humeri; mit Knochenmark	-
R14	14	R+	2 Femora, 2 Humeri; mit Knochenmark	-
R15	15	R+	2 Femora, 2 Humeri; mit Knochenmark	-

Tab. 8.3.E Bodenproben

					1	49,596	53,554	10,5	535,5	14,3	13388,4	14897,0	38693,5	
--	--	--	--	--	---	--------	--------	------	-------	------	---------	---------	---------	--

Tab. 8.4.B Messdaten der RIAs mit Extrakten historischer Knochen (HK).
 Aufn. = Aufnahme in x µl Assay-Puffer; Einsatz = µl Einsatz in Einzelbestimmung des Assays; C (E2) = Konzentration E2. In Fettschrift Messwerte, die außerhalb des linearen Bereichs der zugehörigen Standardkurve liegen. Farbcodierung: orange = Messwerte führen zum Ausschluss aus der Messdatenbewertung; gelb = CV Messwert über 25 %, rot = CV Messwert normiert über 50 %. Bemerkungen: LT = leichte Trübung des Extraktes, T = Trübung des Extraktes

Extrakt	Typ	Einwaage [g]	Datum	Aufn. [µl]	Einsatz [µl]	Messwert [pg]	Mittel Messwert [pg]	CV Messwert [%]	Mittel Messwert normiert [pg]	Messwert normiert [%]	C (E2) [pg/Extrakt]	Mittel C (E2) [pg/Extrakt]	C (E2) [pg/g Probe]	Bemerkung
BO0001/01	HK	1,567	19.07.	250	50	760,479								T
					50	788,791	774,635	2,6	774,6		3873,2			
					25	315,896								
					25	585,617	450,757	42,3	901,5		4507,6			
					10	173,998								
BO0001/01	HK	1,567	22.07.	250	10	286,705	230,352	34,6	1151,8	20,4	5758,8	4713,2	3007,8	
					10	147,420	160,802	11,8	160,8		4020,1			
					1	8,518								
					1	10,783	9,651	16,6	96,5	35,3	2412,6	3216,3	2052,5	
BO0002/01	HK	1,533	19.07.	250	50	2717,870								T
					50	5096,439	3907,155	43,0	3907,2		19535,8			
					25	2414,361								
					25	2073,080	2243,721	10,8	4487,4		22437,2			
					10	1062,718								
BO0002/01	HK	1,533	22.07.	250	10	1056,482	1059,600	0,4	5298,0	15,3	26490,0	22821,0	14886,5	
					10	871,908								
					10	1039,509	955,709	12,4	955,7		23892,7			
					1	71,809								
DO0035/01	HK	3,775	05.05.	250	1	63,873	67,841	8,3	678,4	24,0	16960,3	20426,5	13324,5	
					50	514,593								
					50	579,700	547,147	8,4	547,1		2735,7			
					25	202,958								
					25	183,882	193,420	7,0	386,8		1934,2			
DO0058/01	HK	2,081	11.05.	250	10	60,261								
					10	56,546	58,404	4,5	292,0	31,6	1460,1	2043,3	541,3	
					50	520,902								
					50	473,893	497,398	6,7	497,4		2487,0			
					25	320,499								
DO0058/02	HK	2,063	11.05.	250	25	230,225	275,362	23,2	550,7		2753,6			
					10	173,252								
					10	139,196	156,224	15,4	781,1	24,7	3905,6	3048,7	1465,0	
					50	154,795								
					50	162,190	158,493	3,3	158,5		792,5			
					25	103,813								
					25	75,370	89,592	22,4	179,2		895,9			
					10	76,345								

					25	350,785	267,729	43,9	535,5		2677,3			
					10	128,987								
					10	195,163	162,075	28,9	810,4	75,3	4051,9	2400,2	888,3	

Tab. 8.4.D Messdaten der RIAs mit Extrakten aus Rattenknochen (RAK).
 Aufn. = Aufnahme in x µl Assay-Puffer; Einsatz = µl Einsatz in Einzelbestimmung des Assays; C (E2) = Konzentration E2. In Fettschrift Messwerte, die außerhalb des linearen Bereichs der zugehörigen Standardkurve liegen. Farbcodierung: orange = Messwerte führen zum Ausschluss aus der Messdatenbewertung; gelb = CV Messwert über 25 %, rot = CV Messwert normiert über 50 %. Bemerkungen: ST = starke Trübung des Extraktes.

Extrakt	Typ	Einwaage [g]	Datum	Aufn. [µl]	Einsatz [µl]	Messwert [pg]	Mittel Messwert [pg]	CV Messwert [%]	Mittel Messwert normiert [pg]	CV Messwert normiert [%]	C (E2) [pg/Extrakt]	Mittel C (E2) [pg/Extrakt]	C (E2) [pg/9 Probel]	Bemerkung	
R01/01	RAK	2,295	11.05.	250	50	120,040								ST	
					50	101,391	110,716	11,9	110,7	553,6					
					25	460,608									
					25	206,915	333,762	53,7	667,5	3337,6					
					10	228,013									
R02/01	RAK	2,291	21.07.	350	10	734,674	481,344	74,4	2406,7	112,8	12033,6	5308,3	2313,0		
					25	683,344									
					25	1605,946	1144,645	57,0	1144,6	16025,0					
					10	430,395									
R03/01	RAK	1,920	11.05.	250	10	588,796	509,596	22,0	1274,0	7,6	17835,8	16930,4	7377,1		
					50	771,367									ST
					50	704,003	737,685	6,5	737,7	3688,4					
					25	1712,714									
					25	1445,569	1579,142	12,0	3158,3	15791,4					
R04/01	RAK	1,917	21.07.	350	10	1350,386									
					10	1440,132	1395,259	4,5	6976,3	86,8	34881,5	18120,4	9437,7		
					25	1318,560									
					25	1809,848	1564,204	22,2	1564,2	21898,9					
					10	365,432									
R08/01	RAK	2,123	11.05.	250	10	963,781	664,607	63,7	1661,5	4,3	23261,2	22580,0	11760,4		
					50	325,657								ST	
					50	144,058	234,858	54,7	234,9	1174,3					
					25	490,489									
					25	339,593	415,041	25,7	830,1	4150,4					
R09/01	RAK	2,121	21.07.	350	10	447,026									
					10	410,679	428,853	6,0	2144,3	91,3	10721,3	5348,7	2519,4		
					25	620,719									
					25	217,383	419,051	68,1	419,1	5866,7					
					10	238,778									
R10/01	RAK	2,102	11.05.	250	10	322,263	280,521	21,0	701,3	35,6	9818,2	7842,5	3694,0		
					50	564,215								ST	
					50	465,797	515,006	13,5	515,0	2575,0					
					25	350,960									
					25	282,431	316,696	15,3	633,4	3167,0					
R11/01	RAK	2,064	21.07.	350	10	796,302									
					10	344,026	570,164	56,1	2850,8	98,7	14254,1	6665,4	3229,3		

					10	653,930	637,115	3,7	637,1		15927,9			
					1	20,742								
					1	27,532	24,137	19,9	241,4	63,7	6034,3	10981,1	5401,4	

Tab. 8.4.G Messdaten der RIAs mit Extrakten aus Knochenasche (KNA).
 Aufn. = Aufnahme in x µl Assay-Puffer; Einsatz = µl Einsatz in Einzelbestimmung des Assays; C (E2) = Konzentration E2. In Fettschrift Messwerte, die außerhalb des linearen Bereichs der zugehörigen Standardkurve liegen. Farbcodierung: orange = Messwerte führen zum Ausschluss aus der Messdatenbewertung; gelb = CV Messwert über 25 %, rot = CV Messwert normiert über 50 %.

Extrakt	Typ	Einwaage [g]	Datum	Aufn. [µl]	Einsatz [µl]	Messwert [pg]	Mittel Messwert [pg]	CV Messwert [%]	Mittel Messwert normiert [pg]	Mittel Messwert normiert [%]	C (E2) [pg/Extrakt]	Mittel C (E2) [pg/Extrakt]	C (E2) [pg/g Probe]	Bemerkung
A01/01	KNA	2,810	11.05.	250	50	19,607							42,2	
					50	21,955	20,781	8,0	20,8		103,9			
					25	11,170								
					25	11,514	11,342	2,1	22,7		113,4			
					10	5,330								
					10	5,724	5,527	5,0	27,6	14,9	138,2	118,5	42,2	
A01/02	KNA	2,460	05.05.	250	50	14,327							32,5	
					50	25,325	19,826	39,2	19,8		99,1			
					25	n.d.								
					25	7,073	7,073	n.d.	14,1		70,7			
					10	3,539								
10	2,053	2,796	37,6	14,0	20,8	69,9	79,9	32,5						
A01/03	KNA	3,160	05.05.	250	50	14,273							27,3	
					50	15,603	14,938	6,3	14,9		74,7			
					25	11,727								
					25	6,067	8,897	45,0	17,8		89,0			
					10	3,047								
10	4,535	3,791	27,8	19,0	12,0	94,8	86,1	27,3						
A02/01	KNA	1,530	05.05.	250	50	8,597							31,5	
					50	8,988	8,793	3,1	8,8		44,0			
					25	5,069								
					25	5,926	5,498	11,0	11,0		55,0			
					10	2,241								
10	1,393	1,817	33,0	9,1	12,4	45,4	48,1	31,5						

Tab. 8.4.H E2-Messdaten der vierstufigen Extraktionsversuche

Individuum	Extraktions-schritt	Typ	Einwaage [g]	Aufn. [µl]	Einsatz [µl]	Messwert [pg]	Mittel Messwert [pg]	CV Messwert [%]	Mittel Messwert normiert [pg]	CV Messwert normiert [%]	C (E2) [pg/Extrakt]	Mittel C (E2) [pg/Extrakt]	C (E2) [pg/g Probe]	Bemerkung
M02	1	RZK	3,010	250	50	619,041								LT
					50	590,393	604,717	3,350	604,717		3023,585			
					25	243,042								
					25	228,625	235,834	4,323	471,667		2358,335			
					10	46,367								

					10	2,689	2,689	0,026	13,443	65,394	67,213	39,083	39,083		
L11	2	L	0,000	250	50	9,489									
					50	5,587	7,538	36,603	7,538		37,690				
					25	3,766									
					25	3,919	3,843	2,816	7,685		38,425				
					10	4,833									
					10	3,652	4,243	19,684	21,213	64,659	106,063	60,726	60,726		
L11	3	L	0,000	250	50	15,890									
					50	17,585	16,738	7,161	16,738		83,688				
					25	7,080									
					25	7,836	7,458	7,168	14,916		74,580				
					10	4,573									
					10	2,269	3,421	47,623	17,105	7,212	85,525	81,264	81,264		
L11	4	L	0,000	250	50	10,714									
					50	11,771	11,243	6,648	11,243		56,213				
					25	8,339									
					25	8,177	8,258	1,387	16,516		82,580				
					10	4,538									
					10	4,791	4,665	3,835	23,323	35,568	116,613	85,135	85,135		

8.5 HPLC-Chromatogramme

Alle Chromatogramme zeigen die Absorption in Milliabsorptionseinheiten (mAU) des verwendeten DAD bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm. Eine Quantifizierung der durch die Peaks repräsentierten Substanzen erfolgte nicht.

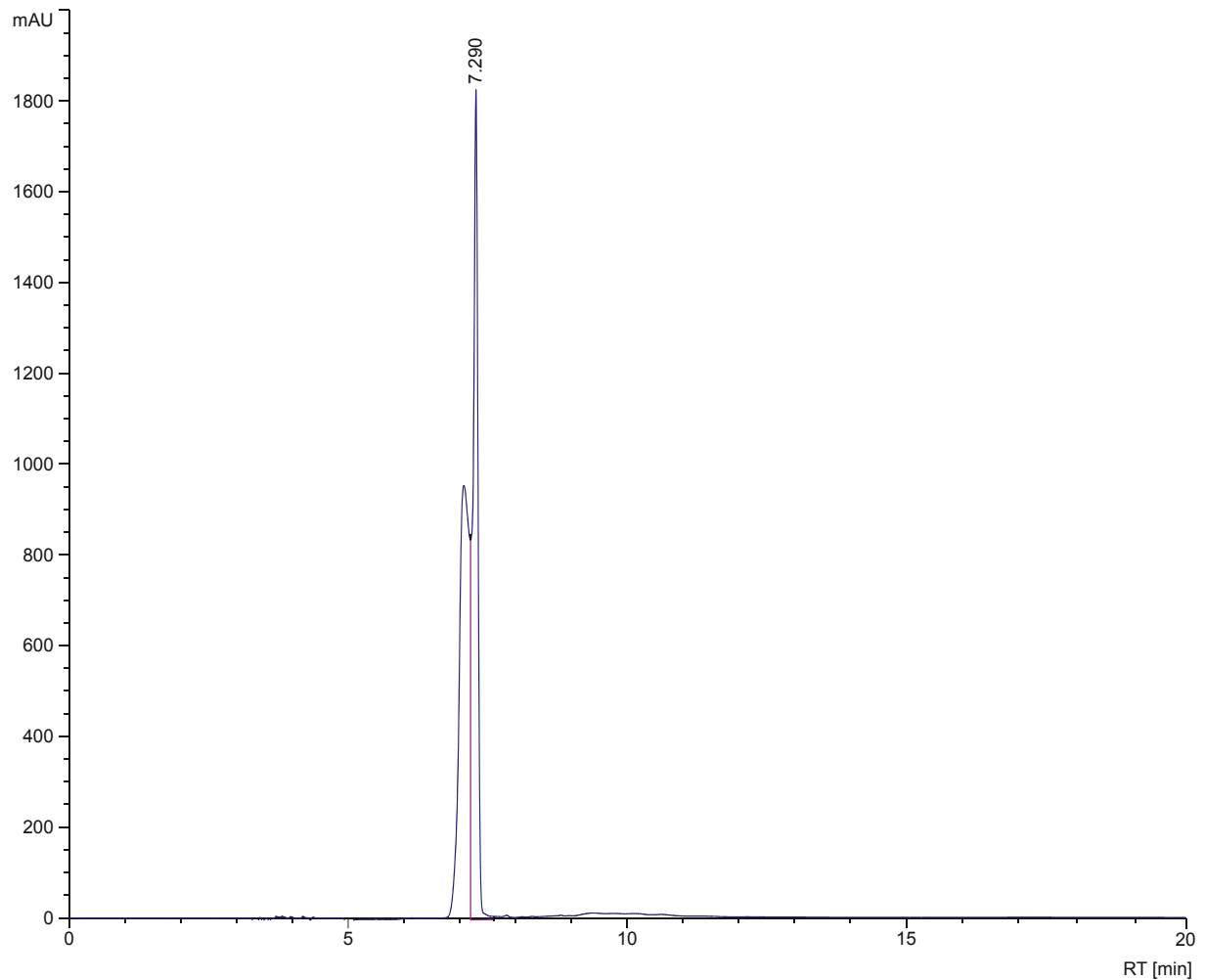


Abb. 8.5.A HPLC-Chromatogramm E2-Standard (100 μg abs.) vor Säulenwechsel und Bestimmung der Proben

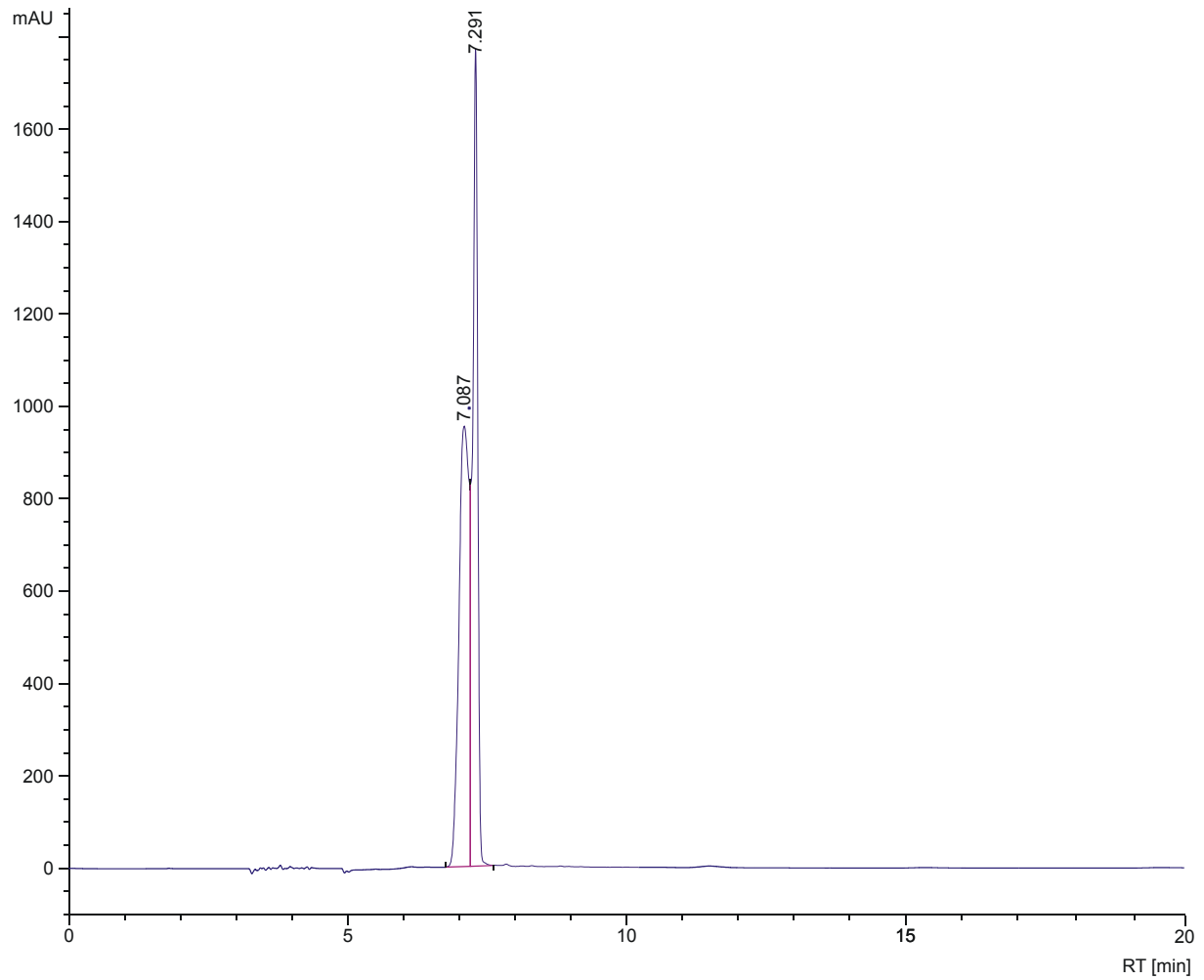


Abb. 8.5.B HPLC-Chromatogramm E2-Standard (100 μg abs.) nach Säulenwechsel und Bestimmung der Proben

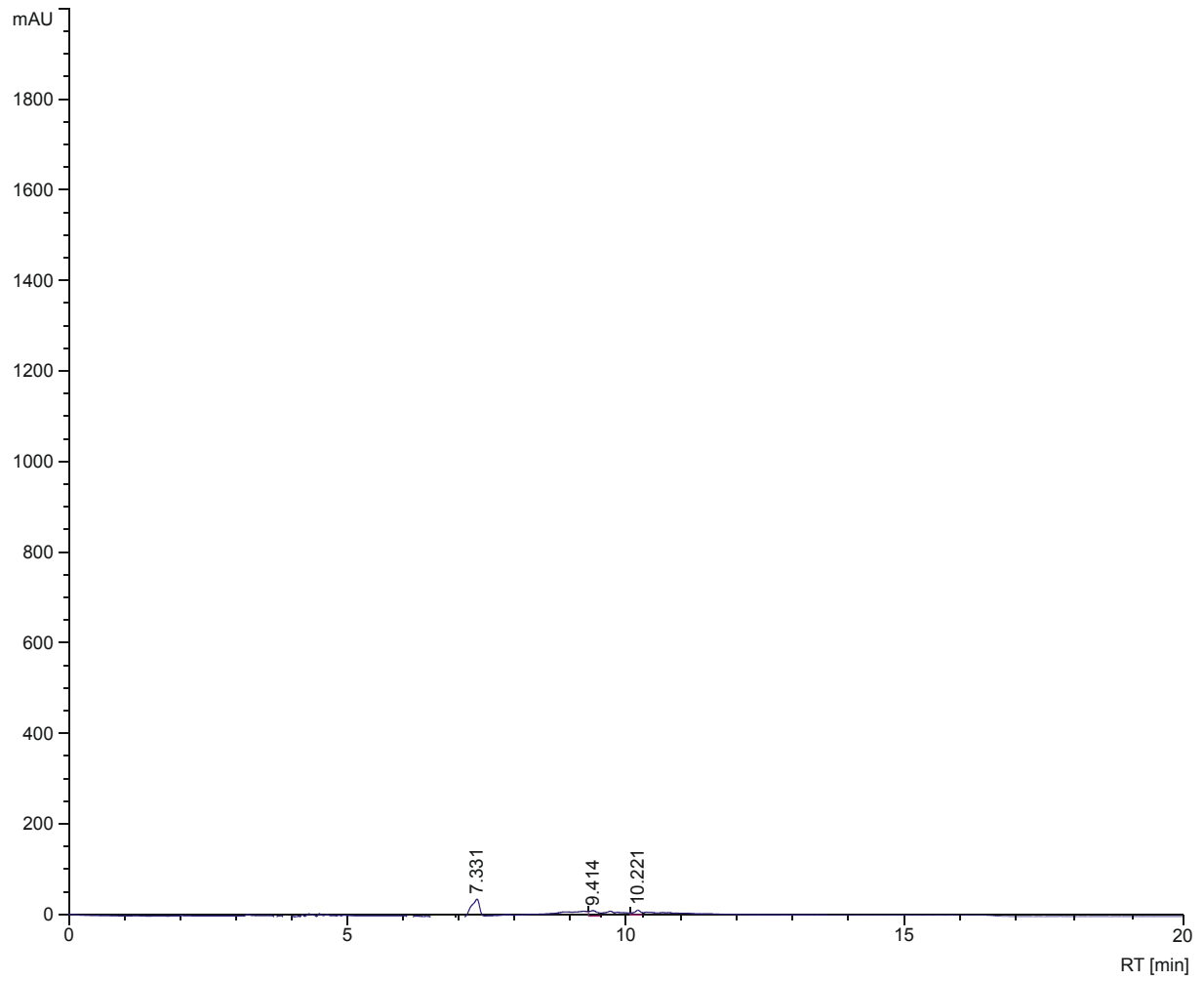


Abb. 8.5.C HPLC-Chromatogramm Leerkontrolle Fließmittel

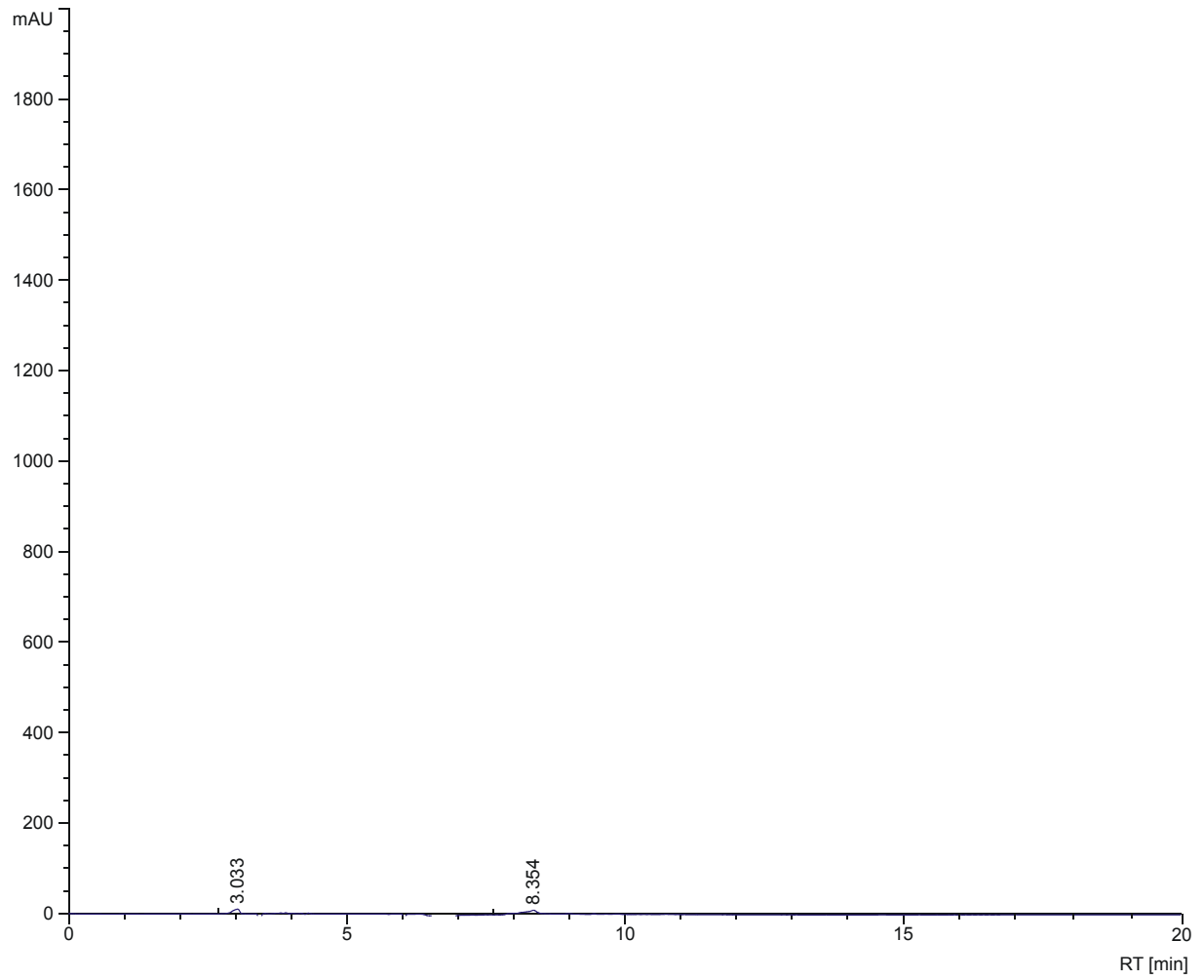


Abb. 8.5.D HPLC-Chromatogramm Kontrolle Leerextrakt

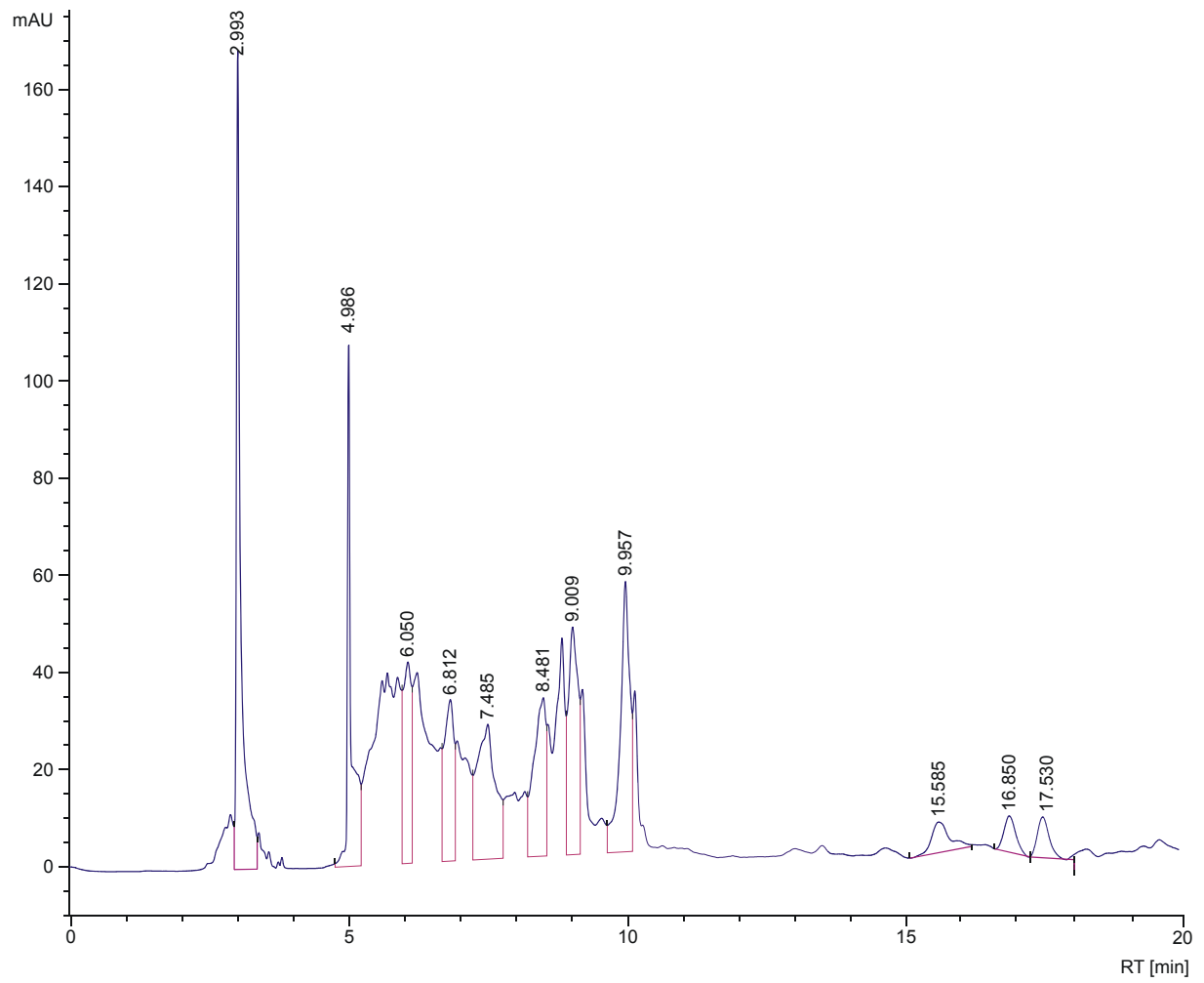


Abb. 8.5.E HPLC-Chromatogramm rezenter Knochen (M11/06, getrüebter Extrakt)

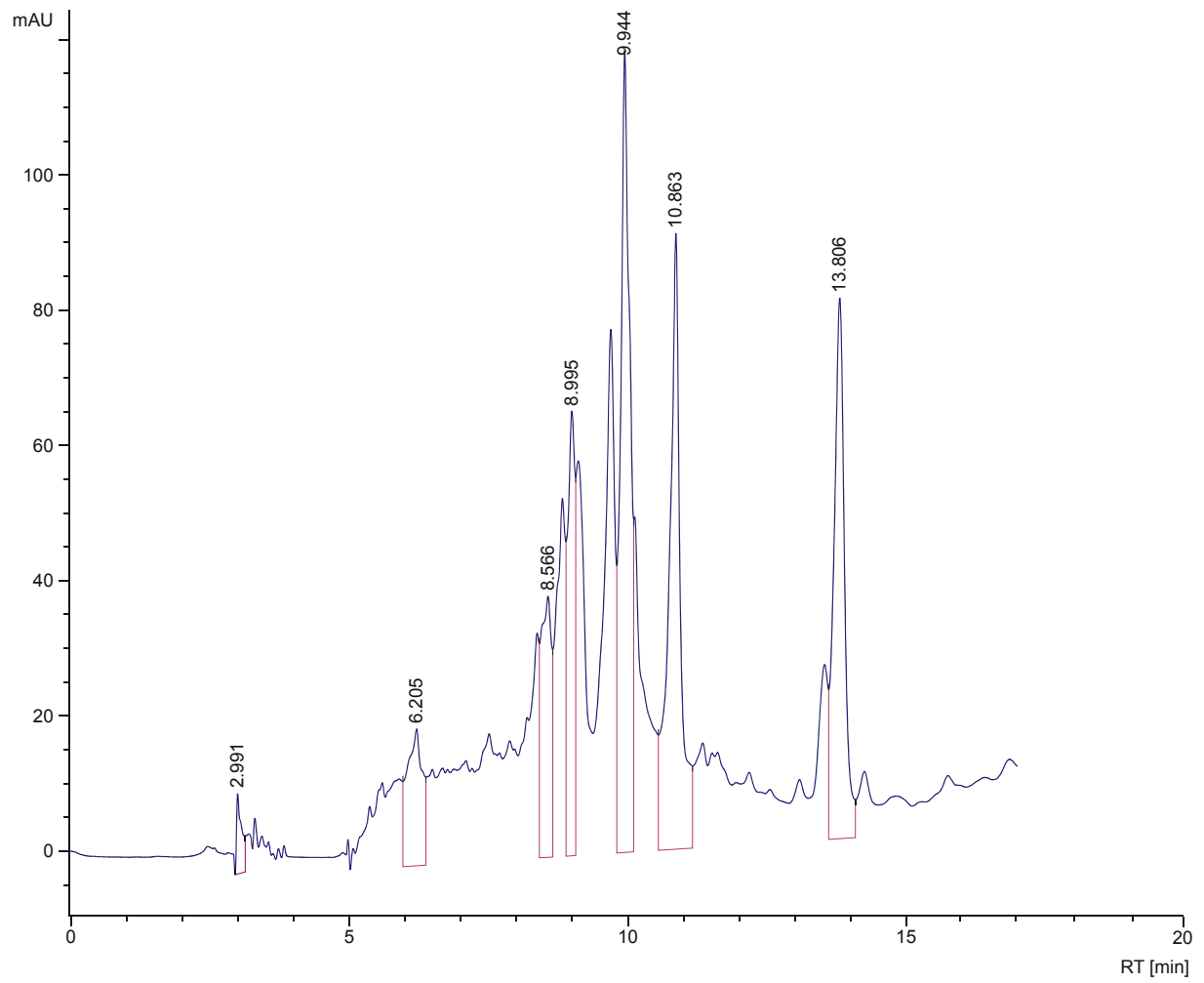


Abb. 8.5.F HPLC-Chromatogramm rezenter Knochen (M07/05, klarer Extrakt)

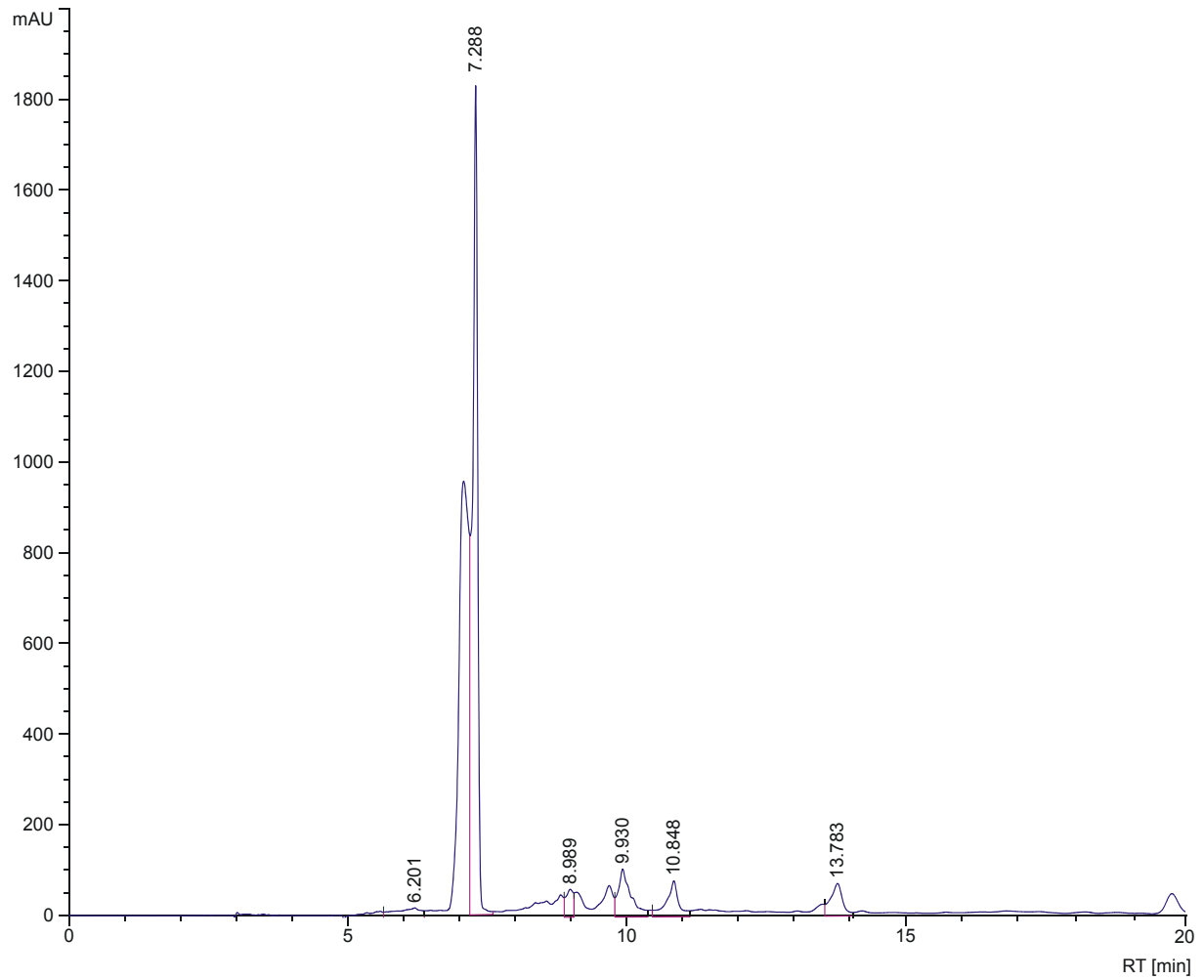


Abb. 8.5.G HPLC-Chromatogramm rezenter Knochen, dotiert mit 100 μg E2-Standard

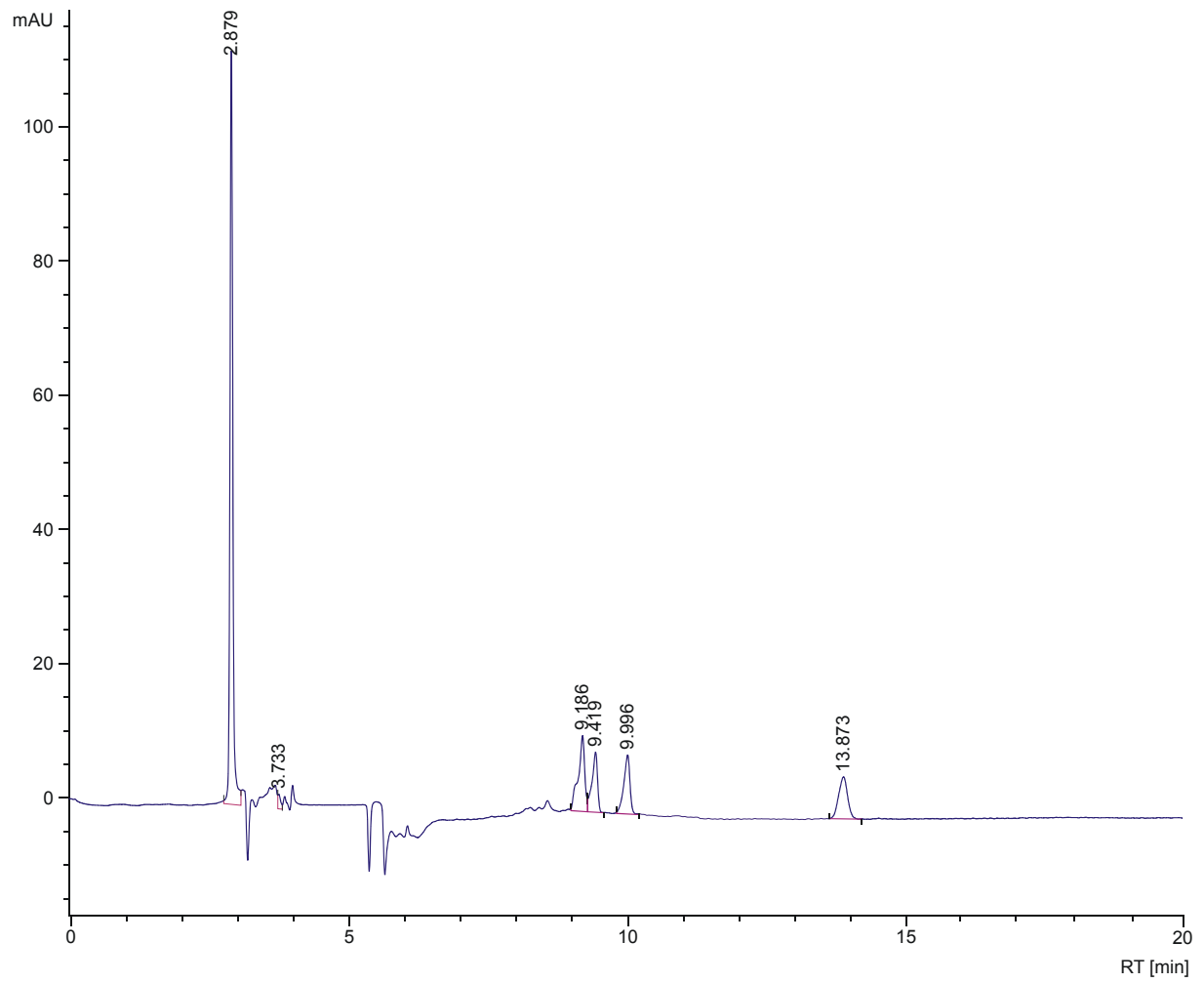


Abb. 8.5.H HPLC-Chromatogramm historischer Knochen, Individuum GS0095

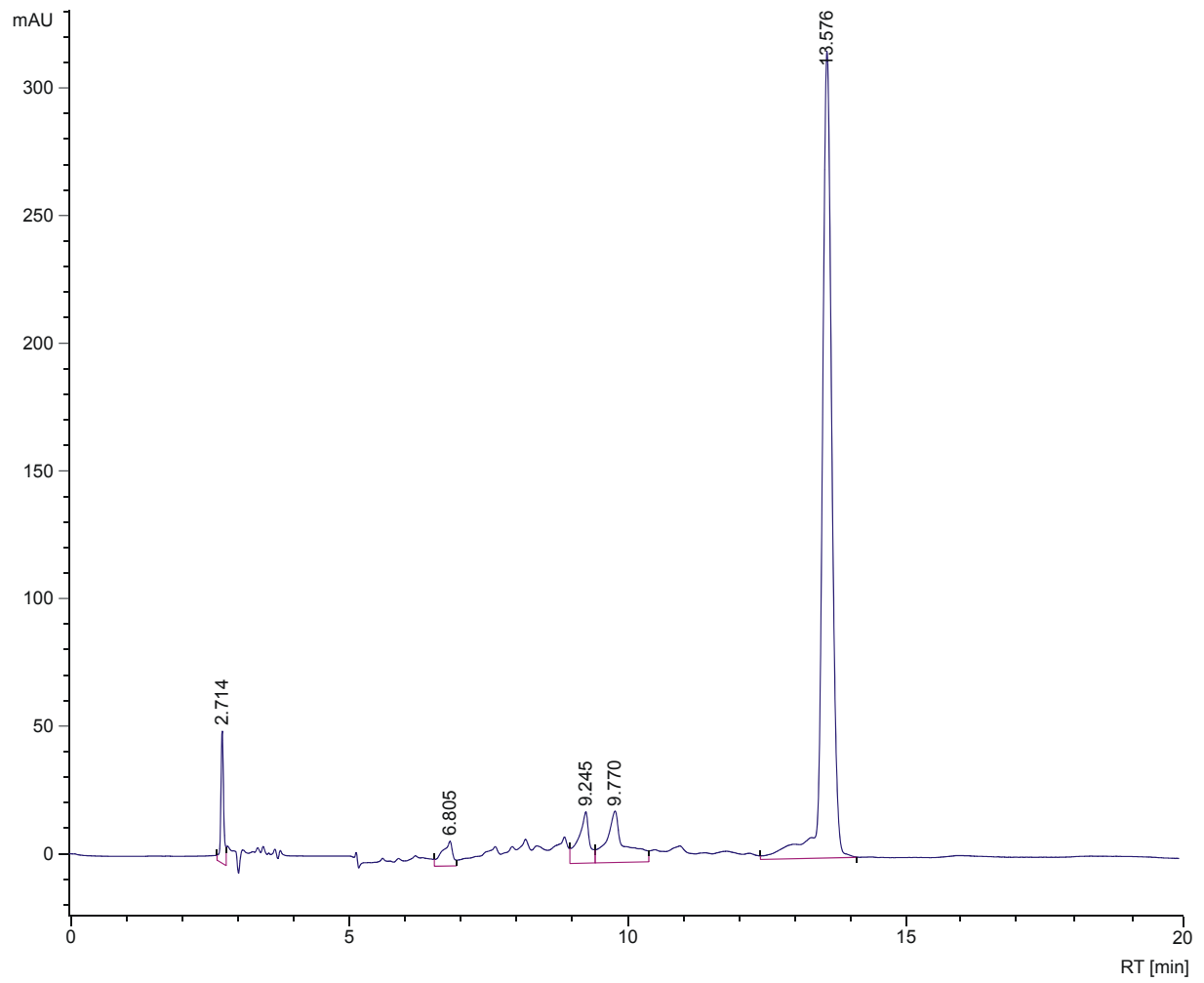


Abb. 8.5.I HPLC-Chromatogramm historischer Knochen, Individuum GS0097

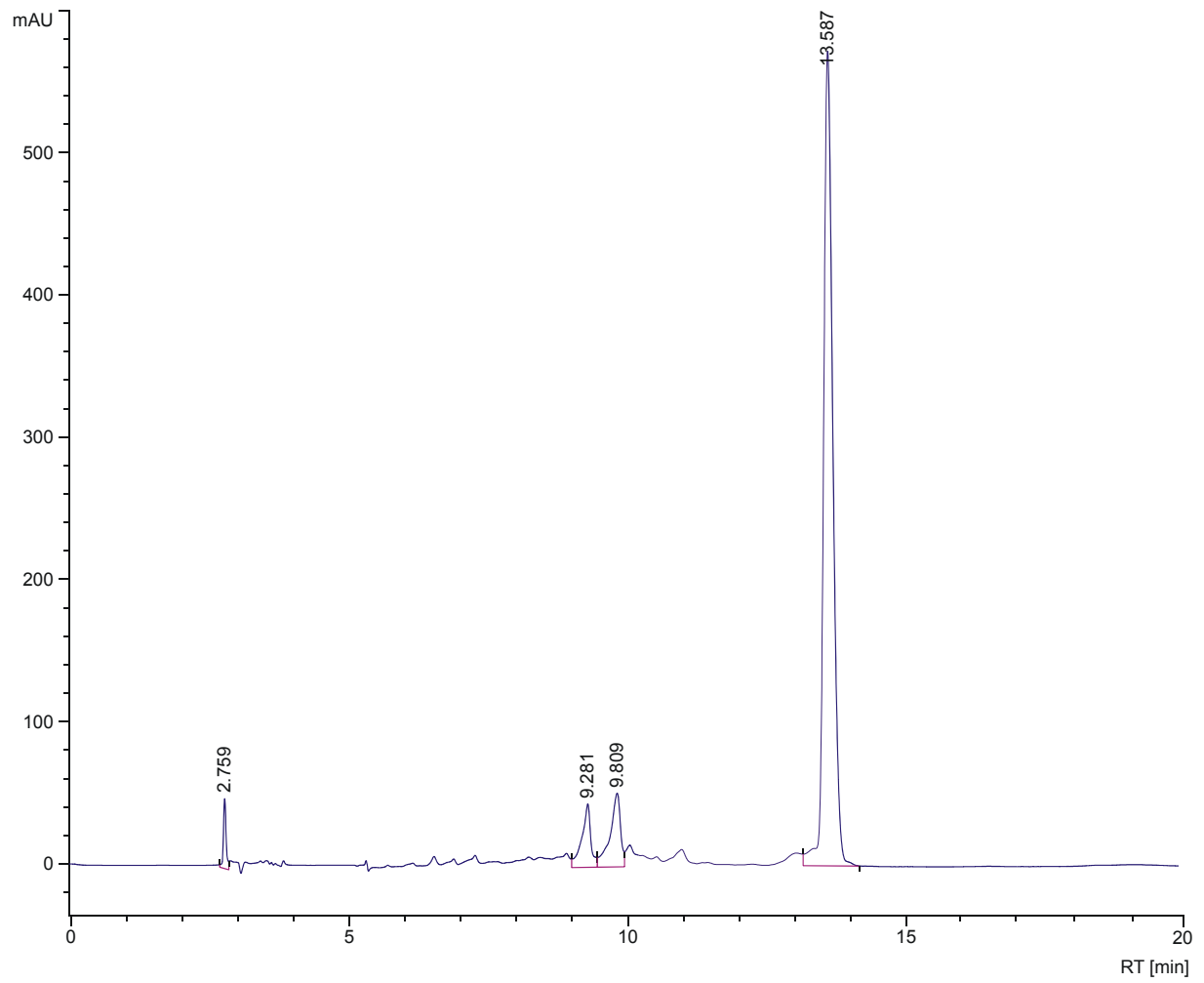


Abb. 8.5.J HPLC-Chromatogramm historischer Knochen, Individuum GS0105

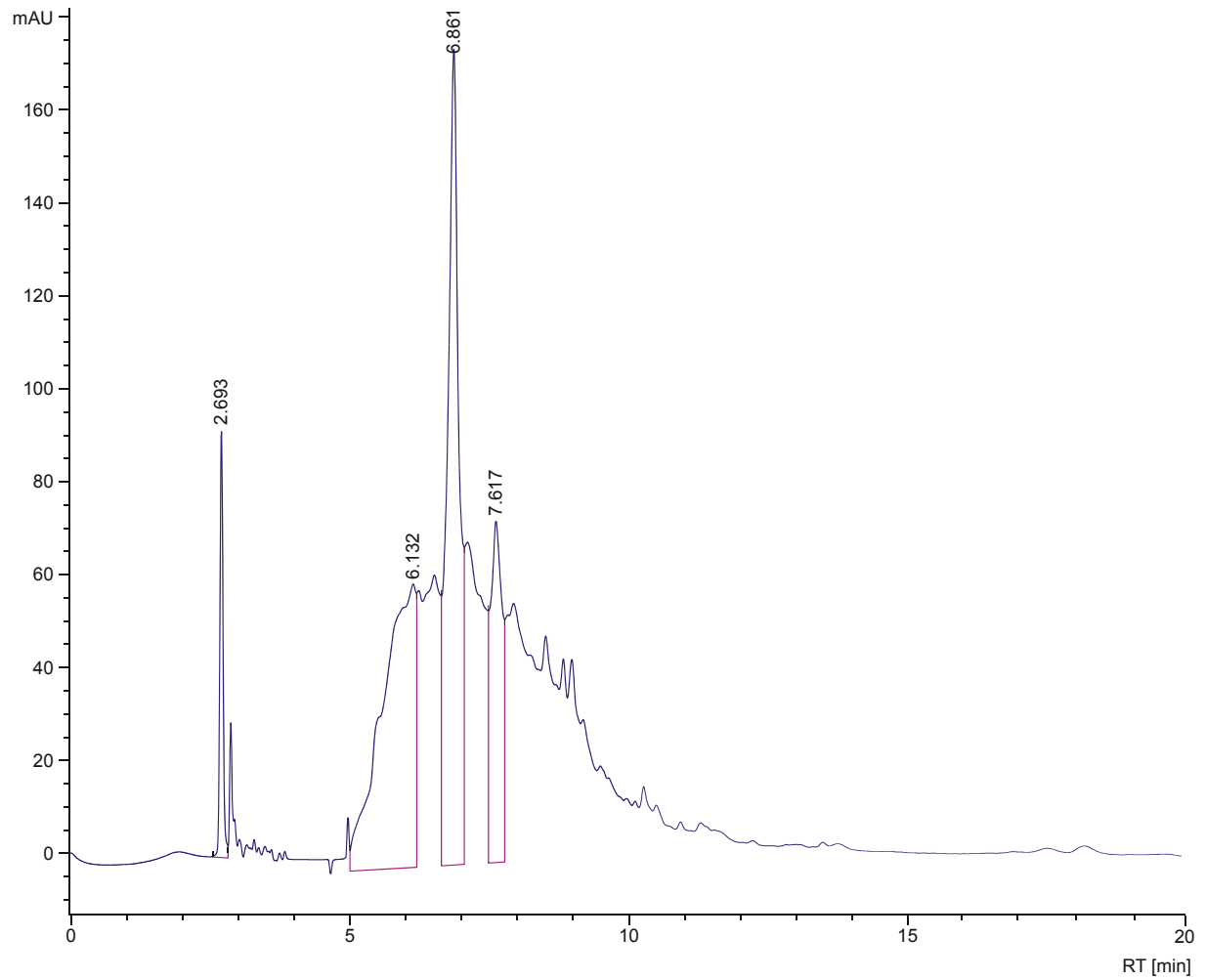


Abb. 8.5.K HPLC-Chromatogramm historischer Knochen, Individuum BO0002, Extrakt 2

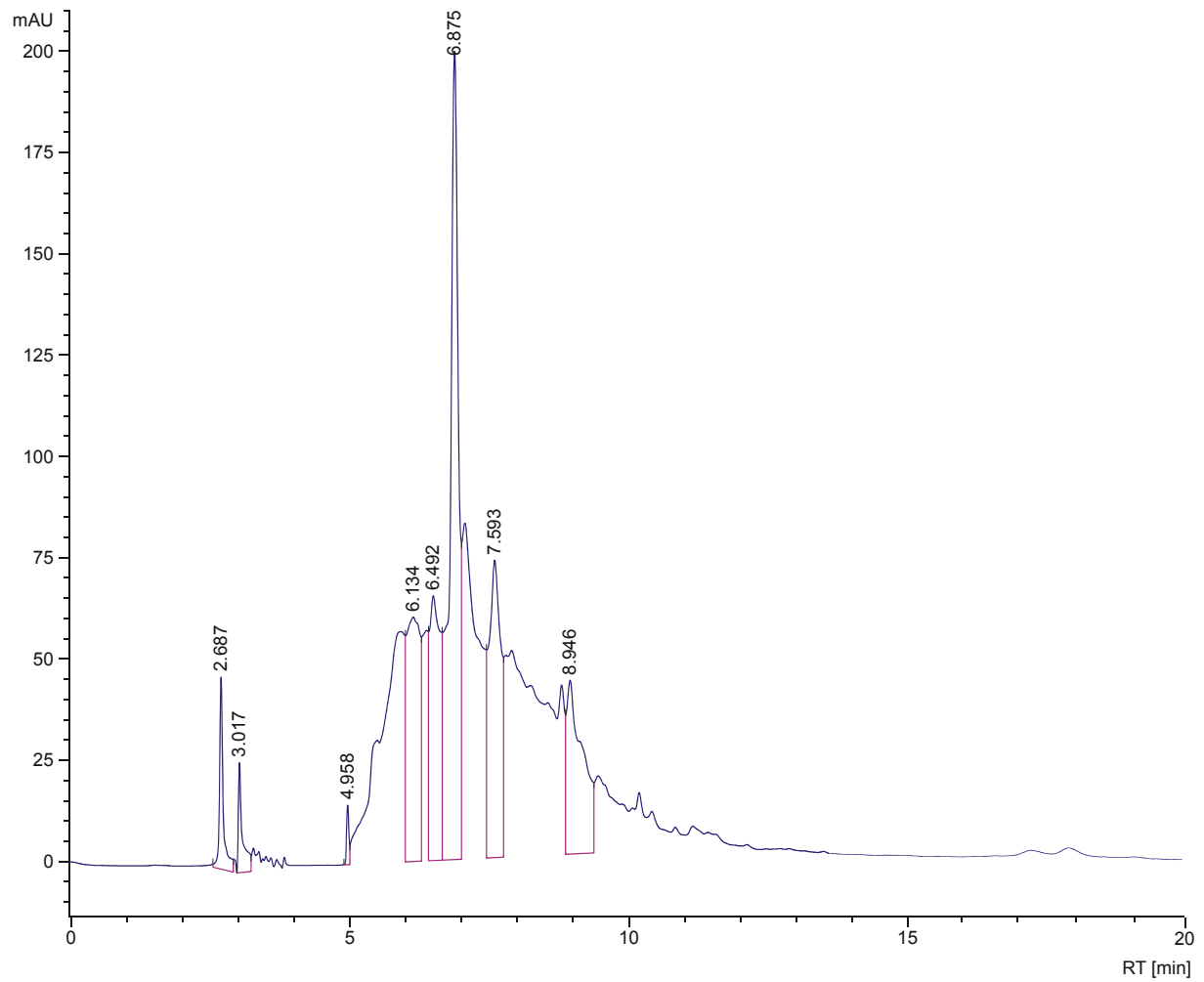


Abb. 8.5.L HPLC-Chromatogramm historischer Knochen, Individuum BO0002, Extrakt 3

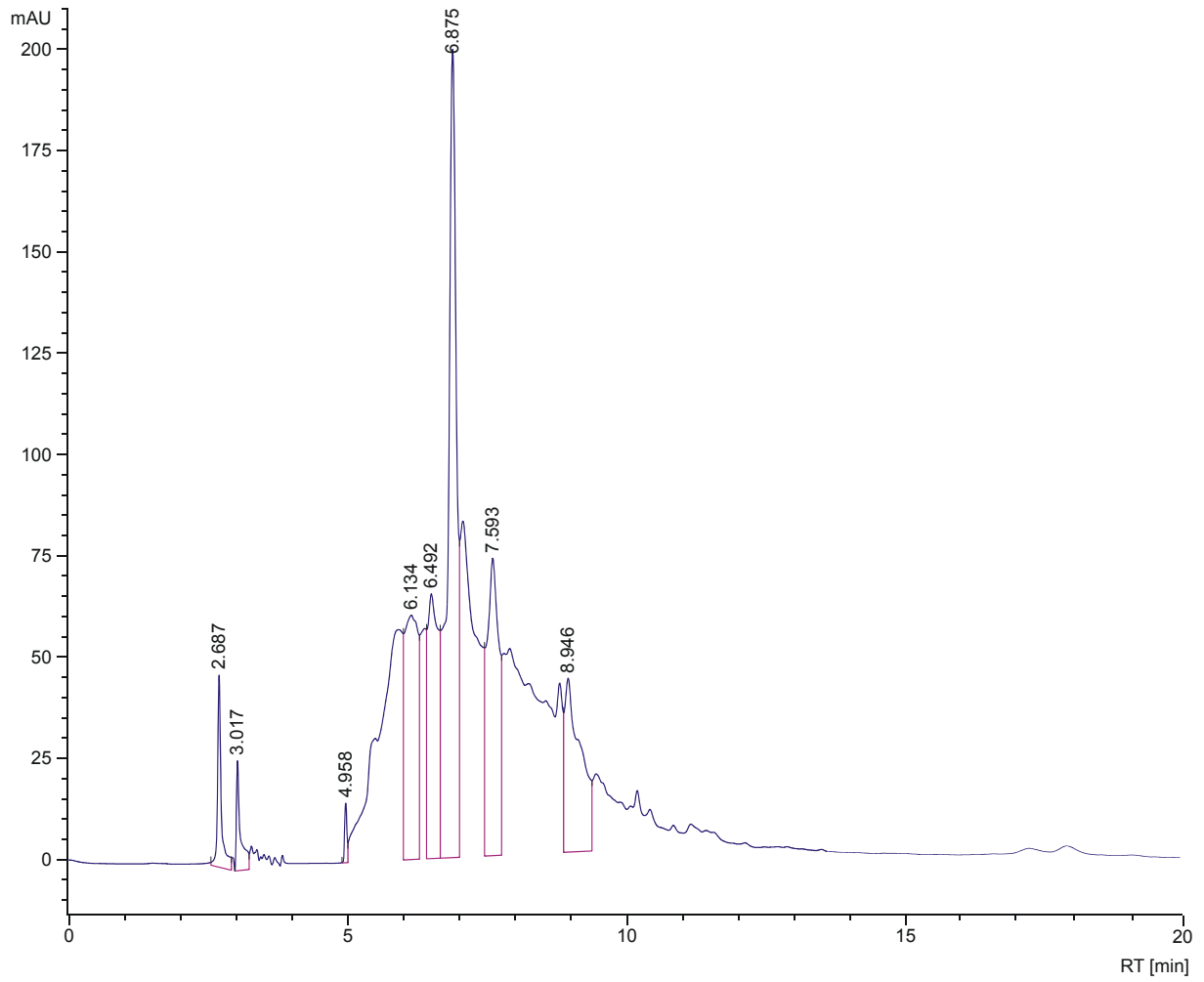


Abb. 8.5.M HPLC-Chromatogramm der Bodenprobe B01, Schwarzerde

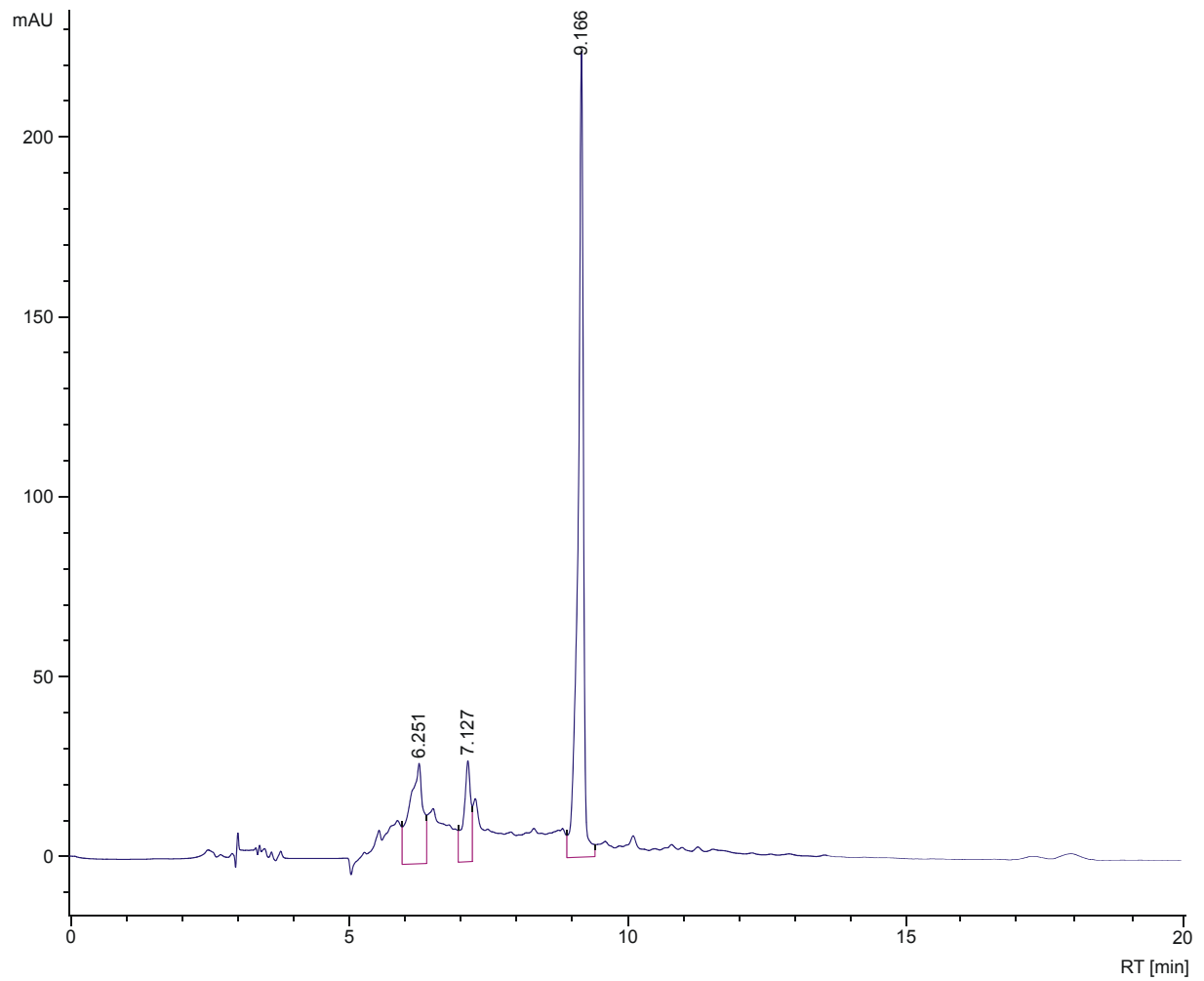


Abb. 8.5.N HPLC-Chromatogramm der Bodenprobe B03, Sandboden

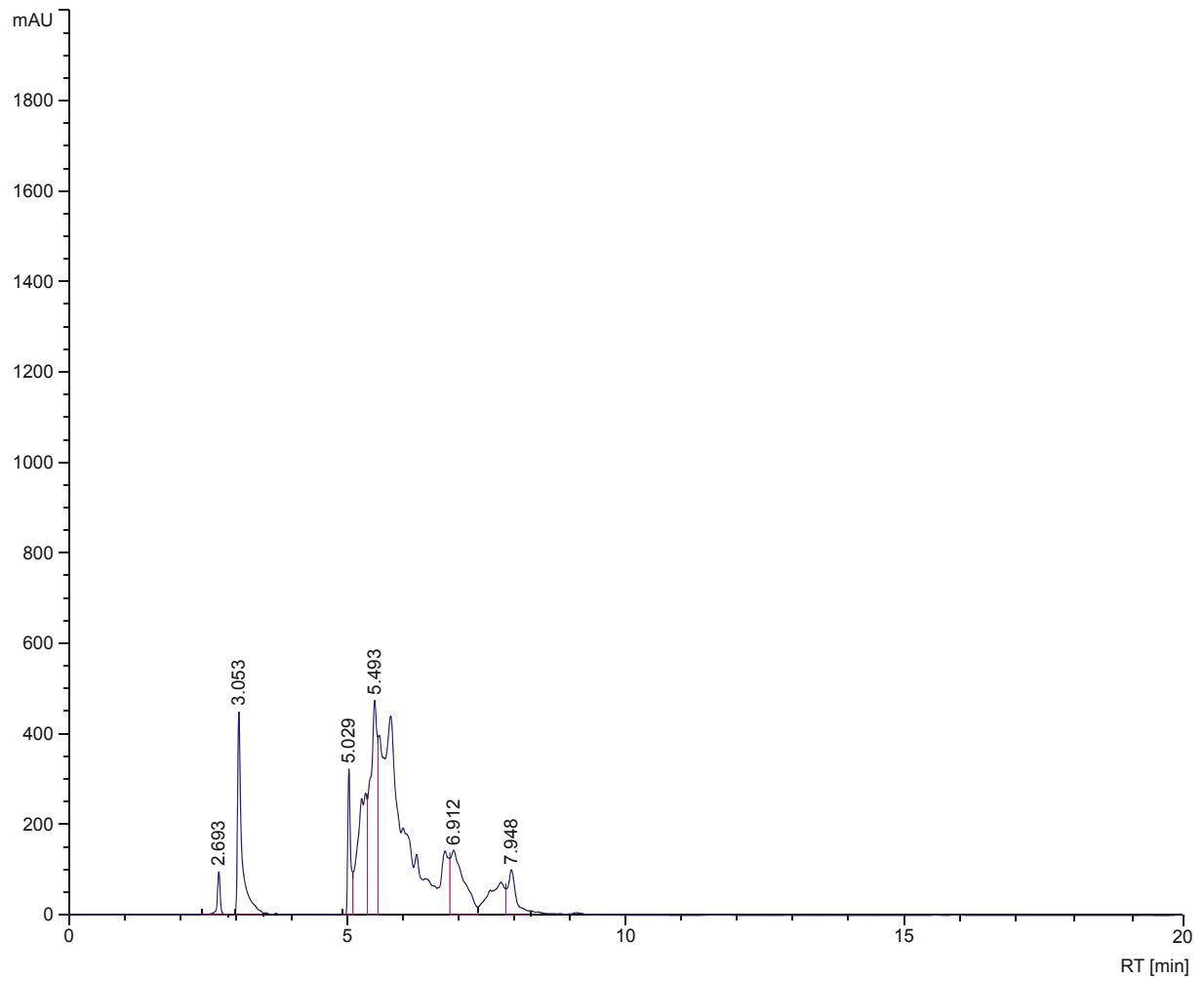


Abb. 8.5.O HPLC-Chromatogramm Extrakt aus Roggenmehl mit 10 % Mutterkorn-Besatz

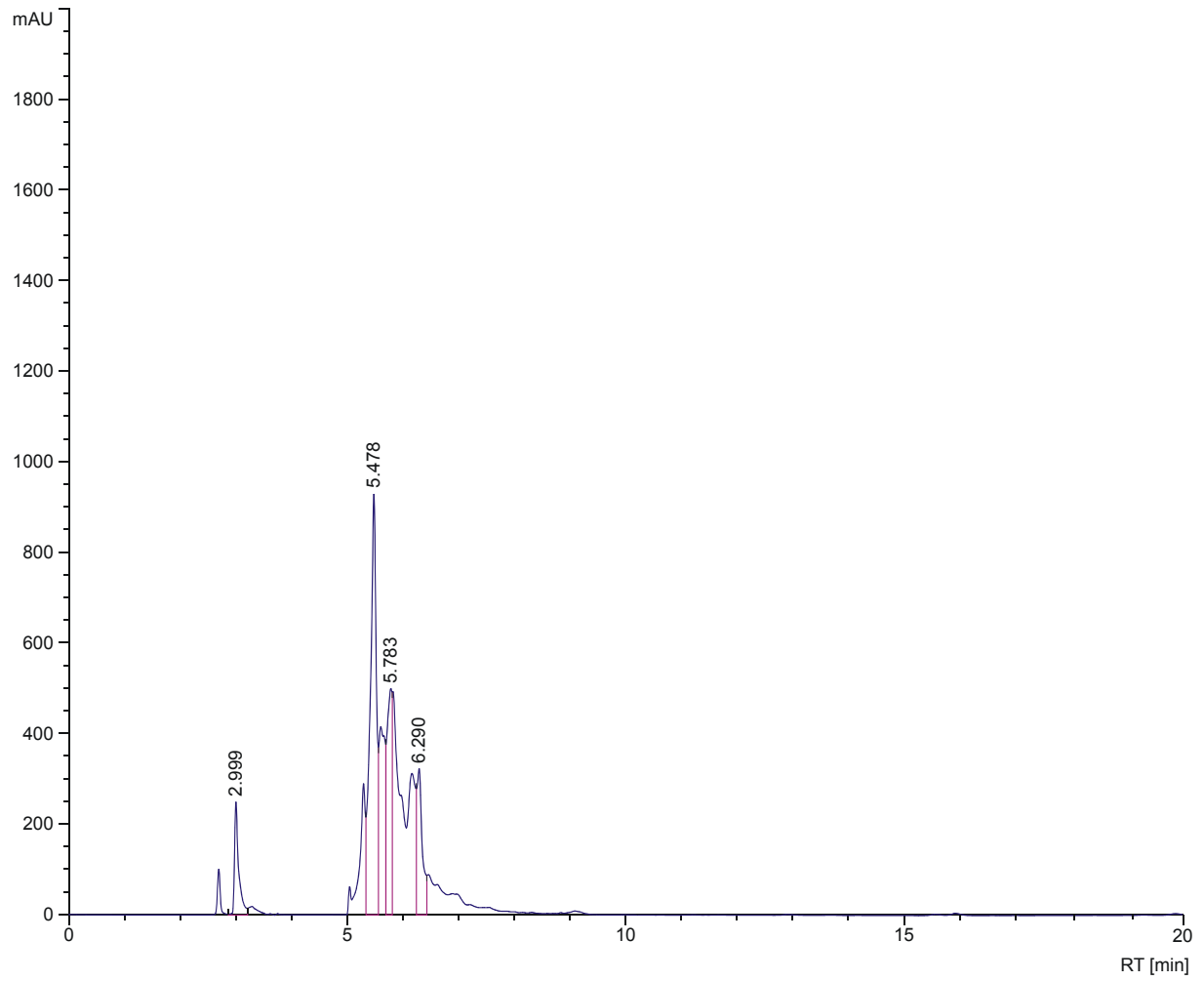


Abb. 8.5.P HPLC-Chromatogramm Extrakt aus Roggenmehl mit 10 % Ackerunkraut-Besatz

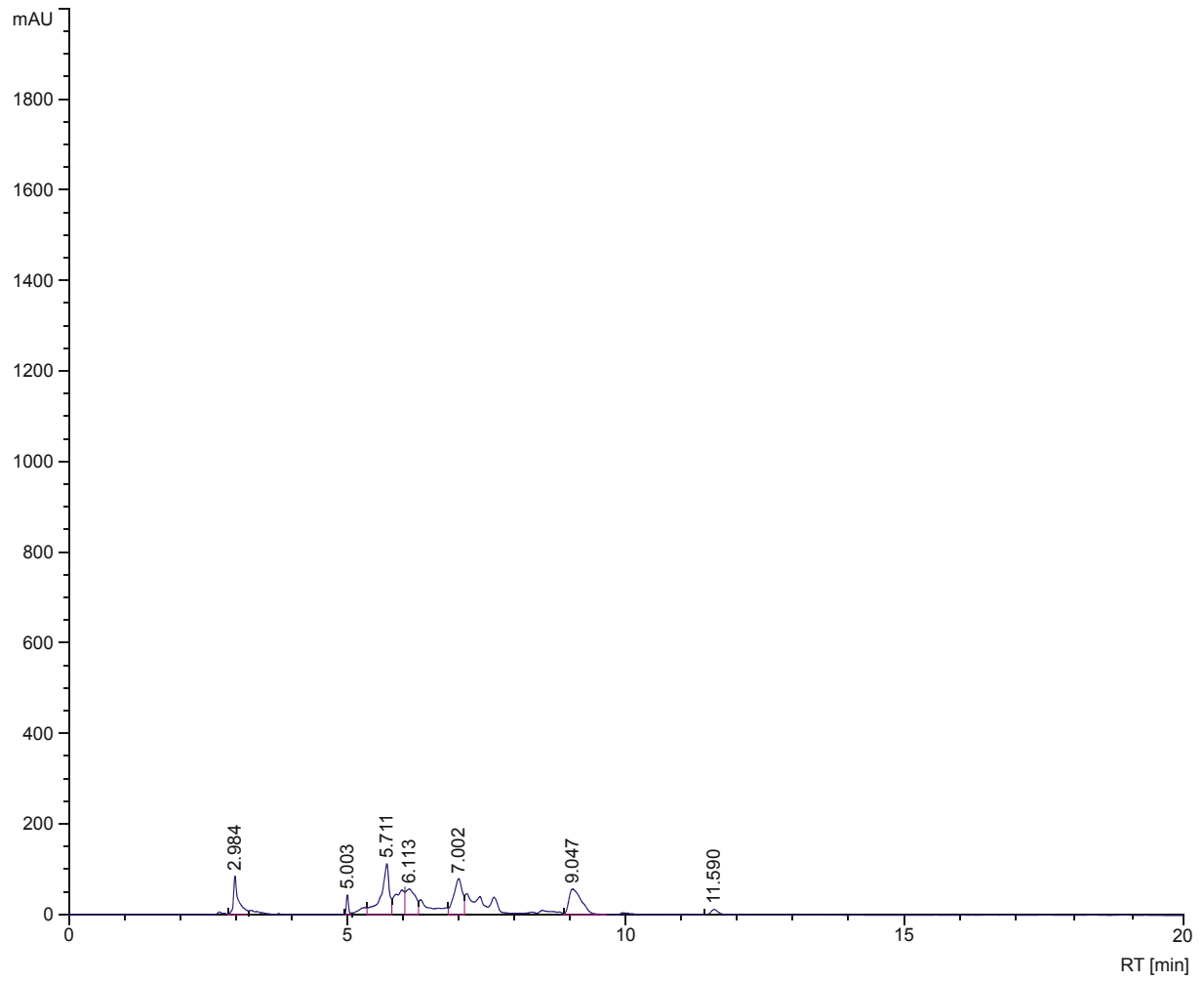


Abb. 8.5.Q HPLC-Chromatogramm Extrakt aus Rotklee-Samen

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bernd Herrmann gilt mein Dank für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie zahlreiche inhaltliche Anregungen.

Bei Herrn Dr. Hartmut Wischmann bedanke ich mich für seine Geduld und Gründlichkeit bei der Einarbeitung in die chemischen Methoden, zahllose anregende Gespräche und die netten privaten Stunden außerhalb des Labors.

Bei Frau Dr. Susanne Hummel möchte ich mich für ihre Unterstützung in Form von Gesprächen, ihr Engagement bei der Beantragung des Projektes und die weitere Zusammenarbeit bedanken.

Für die Möglichkeit der Hospitation in der Klinischen und Experimentellen Endokrinologie der Universitäts-Frauenklinik Göttingen danke ich Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wuttke; für die Unterstützung bei den Tierexperimenten danke ich Frau Prof. Dr. Ivonne Balzer; mein größter Dank gilt Prof. Dr. Hubertus Jarry und Maria Metten für zahllose Hilfestellungen bei der Durchführung der Radioimmunoassays, die stete Bereitschaft zur Diskussion, und die freundliche Atmosphäre, in die ich aufgenommen wurde.

Für die freundliche Überlassung von Probenmaterial habe ich zu danken: Herrn Prof. Dr. Georg Bauer, Frau Prof. Dr. Andrea Berzlanovich, Institut für gerichtliche Medizin, Wien; Herrn Prof. Dr. Wolfgang Eisenmenger, Herrn C. Sc. Evgueni Gazov, Institut für Rechtsmedizin, München; Herrn Prof. Dr. Heinz-Joachim Radzun, den Herren Sektionsgehilfen H.-G. Tölle und H. Schulz, Zentrum Pathologie, Göttingen; Herrn Dr. Stefan Flindt, Landkreis Osterode am Harz, Archäologische Denkmalpflege; Herrn Dr. Lothar Klappauf, Niedersächsisches Landesamt für Denkmalpflege, Arbeitsstelle Montanarchäologie, Goslar und Herrn Wolfgang Bauch, M.A., Archäologisches Landesamt Schleswig-Holstein.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen studentischen Hilfskräften im Labor, Friederike Wünscher, Nancy Banko und Oliver Krebs; besonderer Dank gilt Annegret Becker, die mit großem Fleiß und hoher Präzision zahlreiche Experimente begleitet hat. Sibylle Hourticolon und Ed George hatten immer ein offenes Ohr für mich, bei technischen wie persönlichen Problemen, ihnen sei herzlich gedankt.

Allen Freunden und Bekannten innerhalb und außerhalb des Institutes, den Kommilitonen, die mich im Studium und während der Zeit im Institut begleitet haben, gilt mein Dankeschön, auch wenn sie hier nicht namentlich genannt werden.

Schließlich geht der Dank an meine Eltern, die mir Studium und so vieles Andere ermöglicht haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Holger Zierdt

27.01.1969 geboren in Kassel

ledig

Berufstätigkeit

- 01.10.2000
- 31.03.2004
Wissenschaftlicher Angestellter der Georg-August-Universität Göttingen, Historische Anthropologie und Humanökologie; Aufgabengebiete: Leitung des Labors Gaschromatographie/ Massenspektrometrie, Forschungsprojekt „Die Knochenmatrix als Datenspeicher individueller und kollektiver biographischer Ereignisse und Verhaltensweisen“; Lehre; Verwaltung; Administration der IT-Infrastruktur; Webseitenerstellung
- 1999-2000
Stipendiat des BMBF an der Universität Göttingen, Historische Anthropologie und Humanökologie
- 1996-1998
Wissenschaftlicher Angestellter der Universität Göttingen, Klinische Strahlenphysik und Klinische Strahlenbiologie
- 1995-1996
Studentische Hilfskraft

Außerberufliche Tätigkeit

- seit 1998
Dozent an der Schule für Medizinisch-Technische Radiologieassistenten, Göttingen, für die Fächer EDV und Statistik
- 1996-2000
Netzwerkadministration und EDV-Beratung, Triops Consult, Environmental Consulting, Göttingen und Halle/Saale

Außerberufliche Fortbildung

- 1995-2002
Teilnahme an zahlreichen IT-Fortbildungskursen zu den Themen Internet-Techniken, Netzwerktechnik, Administration von Netzwerken sowie Anwendungsprogrammen

Ausbildungsweg und Schule

- 1989-1995
Studium der Biologie und Chemie an der Universität Göttingen
Abschluß: Diplom, 03.03.1995, Note: sehr gut
- 1986-1988
Gymnasium Jacob-Grimm-Schule Kassel
Abschluß: Abitur, Note: 1,0
- 1980-1985
Gymnasium Heinrich-Schütz-Schule, Kassel
- 1976-1979
Grundschule Kassel-Harleshausen

Göttingen, 14.03.2005