

Der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen
eingereicht von Prof. Dr. med. W. Wuttke

Metabolisches Syndrom:
Die Effekte von 20-Hydroxyecdysen und 17 β -Östradiol auf den
Knochen und die Muskulatur der ovariectomierten Ratte

INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von
Matthias Schumann
aus
Aachen

Göttingen 2016

(Vorlage für Dissertationen, die vor dem 01.07.2015 angemeldet wurden; ,alte Promotionsordnung')

Die Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Endokrinologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen im Zeitraum von März 2011 bis Mai 2016 angefertigt.

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

Referent/in: PD Dr. Dana Seidlova-Wuttke

Ko-Referent/in: Prof. Dr. Heide Siggelkow

Drittreferent/in: Prof. Dr. Sabine Mihm

Datum der mündlichen Prüfung: 12. Juli 2017

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	3
1.1 Das Klimakterium	4
1.2 Der Knochen	5
1.2.1 Der Aufbau des Knochens	6
1.2.2 Osteoblasten	7
1.2.3 Osteozyten	7
1.2.4 Osteoklasten	8
1.2.5 Knochenstoffwechsel	8
1.2.6 Marker des Knochenstoffwechsels	9
1.2.7 Der Knochen der Ratte	10
1.3 Die Osteoporose	11
1.3.1 Definition und Epidemiologie	11
1.3.2 Ursachen und Risikofaktoren	12
1.4 Metabolisches Syndrom	13
1.5 Sarkopenie	16
1.6 20-Hydroxyecdysen	17
1.7 Zielsetzung	19
2. Material und Methoden	21
2.1 Tierversuche	21
2.1.1 Versuchstiere	21
2.1.2 Ablauf der Knochenvolumenmineraldichtemessung	22
2.1.3 Ovariectomie	23
2.1.4 Applikation der Wirkstoffe	23
2.1.5 Obduktion	25
2.2 Auswertung	26
2.2.1 Ermittelte Parameter	26
2.2.2 Serumdiagnostik	29
2.2.3 Statistische Methoden	29

3. Ergebnisse	30
3.1 Futteraufnahme und Körpergewicht	31
3.2 Muskulatur	33
3.2.1 Muskelfläche	34
3.2.2 Muskeldichte	35
3.3 Knochengewebe	36
3.3.1 Endosteale Dichte	36
3.3.2 Endosteale Fläche	38
3.3.3 Kortikale Dichte	39
3.3.4 Kortikale Fläche	40
3.3.5 Endosteale Zirkumferenz	41
3.3.6 Periosteale Zirkumferenz	42
3.4 Serumparameter	43
3.4.1 Serum-Osteokalzin	43
3.4.2 Serum-CrossLaps	44
4. Diskussion	46
4.1 Analyse von Futteraufnahme und Körpergewicht	46
4.2 Analyse des Muskelgewebes mit qCT	47
4.2.1 Muskelfläche	47
4.2.2 Muskeldichte	49
4.3 Analyse des Knochengewebes mit qCT	51
4.3.1 Endosteale Dichte	51
4.3.2 Endosteale Fläche	53
4.3.3 Kortikale Dichte	54
4.3.4 Kortikale Fläche	55
4.3.5 Endosteale und periosteale Zirkumferenz	56
4.3.6 Serumparameter	57
5. Zusammenfassung	59
6. Literaturverzeichnis	61
7. Abbildungsverzeichnis	70
8. Tabellenverzeichnis	71

Abkürzungsverzeichnis

Δ BW	<i>delta body weight</i> , Körpergewichtszunahme
AHA	American Heart Association
BAP	<i>bone alkaline phosphatase</i>
BMD	<i>bone mineral density</i>
BMI	<i>body mass index</i>
BW	<i>body weight</i> , Körpergewicht
Ca ²⁺	Kalzium
CL	CrossLaps
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
DVO	Deutscher Dachverband für Osteologie
DXA	<i>dual energy x-ray absorptiometry</i> , Dual-Röntgen-Absorptiometrie
E2	17 β -Östradiol bzw. Östradiolbenzoat
Ecd	β -Ecdyson, 20-Hydroxyecdyson
ED	endosteale Dichte
EF	endosteale Fläche
GH	<i>growth hormone</i> , Wachstumshormon
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HRT	<i>hormone replacement therapy</i> , Hormonersatztherapie
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IL-6	Interleukin-6
i.v.	intravenös
KD	kortikale Dichte
KF	kortikale Fläche
Ko	Kontrollgruppe / Kontrolltiere
LDL	low density lipoprotein
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
n	number, Anzahl
NHLBI	National Heart, Lung and Blood Institute
OC	Osteokalzin
OPG	Osteoprotegerin
ovx, Ovx	ovarektomiert, Ovarrektomie

präovx	vor Ovariektomie
PBM	<i>peak bone mass</i> (Knochengipfelmasse)
PPAR γ 2	<i>peroxisome proliferator activated receptor gamma</i>
qCT	quantitative Computertomographie
RANK	<i>receptor activator of nuclear factor kappa B</i>
RANKL	<i>ligand of receptor activator of nuclear factor kappa B</i>
RUNX 2	<i>runt-related transcription factor</i>
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SERM	selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator
S.D.-Ratte	Sprague-Dawley-Ratte
sf	soyafrei
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
WHI	Women's Health Initiative
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

Die Auswirkungen des Östrogenmangels der menopausalen Frau reichen von Hitzewallungen und Schlafstörungen bis hin zu manifesten Organstörungen (Hammar et al. 1984). Besonders die steigende Zahl der an Osteoporose erkrankten Patienten stellt ein zunehmendes gesellschaftliches Problem dar (Kolios et al. 2011). Zudem hat sich gezeigt, dass bei der postmenopausalen Frau ein deutlich gesteigertes Risiko besteht, ein Metabolisches Syndrom zu entwickeln (Carr 2003; Park et al. 2003). Bei dem Metabolischen Syndrom handelt es sich um eine Kombination stoffwechselbedingter Erkrankungen: Viszerale Adipositas, woraus der Hypertonus, Dyslipidämie und eine erhöhte Insulinresistenz resultieren. Neben der genetischen Disposition spielt vor allem der Lebensstil eine entscheidende Rolle in der Entstehung des Metabolischen Syndroms. Der zunehmende Bewegungsmangel und Fehlernährung fördern diese. Besonders aufgrund des gestiegenen kardiovaskulären Risikos durch das Metabolische Syndrom ergibt sich eine hohe gesellschaftliche Relevanz (Kaaja 2008). In Studien der letzten Jahre konnte vermehrt eine Verbindung zwischen dem Metabolischen Syndrom und der Osteoporose aufgedeckt werden. Somit kann das Metabolische Syndrom als weiterer Risikofaktor in der Entwicklung des Knochenschwundes angesehen werden (Hsu et al. 2006; Migliaccio et al. 2011). Ebenfalls Beachtung finden sollte die Muskulatur, die als wichtiger Bestandteil des muskuloskelettalen Systems Einfluss auf die Stabilität, aber auch den Stoffwechsel unseres Organismus nimmt. Eine zunehmende Immobilität mündet nicht nur in einer Sarkopenie, sondern erhöht auch das Risiko einer Osteoporose (Blain et al. 2001; Marzetti und Leeuwenburgh 2006; Möllenhoff 2007). In der Therapie klimakterischer Beschwerden spielte die

Hormonersatztherapie eine wesentliche Rolle. Aufgrund einer karzinogenen Wirkung auf das Mammagewebe und eines Anstiegs des kardiovaskulären Risikos (Rossouw et al. 2002; Beral 2003) wird nach adäquaten Alternativen geforscht. Diese Arbeit untersucht die Auswirkungen des Phytosteroids Ecdyson auf den Knochen und die Muskulatur der ovariectomierten (ovx) Sprague-Dawley-Ratte (S.D.-Ratte).

1.1 Das Klimakterium

Der Übergang im Leben einer Frau von der reproduktiven zur postmenopausalen Phase wird als Klimakterium beschrieben. Das Klimakterium lässt sich in eine Prämenopause, Menopause, Perimenopause und Postmenopause unterteilen. Die Menopause ist definiert als Zeitpunkt 12 Monate nach der letzten Menstruationsblutung (Greendale et al. 1999; Göretzlehner et al. 2003). Im Klimakterium kommt es zu einer deutlichen Abnahme der ovariellen Funktion und damit auch der Östrogenproduktion, was sich in einem Östrogenmangel widerspiegelt. Da viele Gewebe im menschlichen Körper über Östrogenrezeptoren verfügen, hat der Mangel Auswirkungen, die sich nicht nur auf die weiblichen Geschlechtsorgane reduzieren, sondern den gesamten Organismus betreffen (Blumel et al. 2000; Nelson 2008). Dementsprechend reichen die Beschwerden in Abhängigkeit von Dauer und Ausprägung des Östrogenmangels von Schlafstörungen, Atrophie des Scheidenepithels mit daraus resultierender vaginaler Trockenheit, Hitzewallungen begleitet von Schweißausbrüchen bis hin zu psychischen und manifesten Organstörungen (Hammar et al. 1984).

Anders als der Mensch erreicht die weibliche Ratte physiologischerweise keinen Hormonzustand, der dem des Klimakteriums entspricht. Ab ihrem 15. Lebensmonat

wird sie sogar hyperestrin und verstirbt etwa drei Monate darauf. Um die Ratte nun in einen Zustand zu versetzen, der dem der klimakterischen Frau entspricht, hat es sich bewährt, den Tieren in einem Eingriff die Eierstöcke zu entfernen. Da es nun zu einem raschen hormonellen Wandel kommt, hat sich die ovx Ratte zu einem anerkannten Modell in der endokrinologischen Forschung entwickelt (Bellino 2000). Darüber hinaus ähneln sich die hormonellen Regelkreise des Menschen und der Ratte, was ebenfalls für die Bedeutung der Ratte als Modell entscheidend ist (Liu und Bachmann 1998). Bei anderen Tiermodellen, wie z.B. Affen, Ziegen, Schafen und Schweinen, ist der Zeitraum, bis diese einen gewünschten hormonellen Zustand erreichen, wesentlich länger. Außerdem spricht sie auf hormonelle Änderungen, sei es durch Mangel oder Substitution, sehr rasch und gezielt an, was sie für Forschungen prädestiniert, die für einen kurzen Zeitraum angelegt sind (Kalu 1991; Frost und Jee 1992).

1.2 Der Knochen

Die Knochen in unserem Körper haben komplexe Funktionen, die sich nicht nur darauf beschränken, uns Stabilität, Form und Schutz zu verleihen. Natürlich ist die Stütz- und Haltefunktion der Knochen eine wesentliche, die sie im Zusammenspiel mit der Muskulatur und dem Binde- und Stützgewebe erfüllt. Ebenfalls essentiell ist die Aufgabe der Knochen, innere Organe und das zentrale Nervensystem vor mechanischen Einflüssen zu schützen. Darüber hinaus ist der Knochen aber auch ein vitaler, sich ständig verändernder Bestandteil unseres Organismus, der wesentlich dazu beiträgt, Zellen unseres Blutes und Immunsystems zu bilden. Des Weiteren stellt der Knochen den Speicher des Mineralstoffes Kalzium dar und ist

somit auch an der Mineralstoffregulation des Körpers wesentlich beteiligt. All diese unterschiedlichen Aufgaben sollten nicht isoliert betrachtet werden, sondern als ganzheitliches System verstanden werden (Lorenzo et al. 2008).

1.2.1 Der Aufbau des Knochens

Knochen sollen eine hohe Zug- und Druckfestigkeit aufweisen, ein Maß an Elastizität und dies mit einer Leichtbauweise vereinen. Darunter darf der Stoffwechsel jedoch nicht leiden (Seeman 2008). Dies realisiert Knochen durch seine Zusammensetzung. Die Knochenmatrix besteht aus einem organischen und anorganischen Teil. Die organische Phase, die etwa 20% vom Gesamtanteil ausmacht, besteht zu 95% aus Kollagen Typ 1. Die restlichen 5% bestehen aus Proteoglykanen und nicht-kollagenösen Proteinen. Der anorganische Teil besteht aus Mineralien, die größtenteils Kalzium und Phosphate beinhalten. Er bildet etwa 70% des Knochengewebes und bildet eine sehr feste Substanz. Die verbliebenen 10% werden von Wasser gebildet. Die langen Röhrenknochen kann man in eine Epiphyse, Metaphyse und Diaphyse unterteilen. Die Epiphyse liegt gelenknah. Die Metaphyse bildet die Übergangsregion zum Knochenschaft, der Diaphyse. Das Knochengewebe lässt sich in eine Substantia Spongiosa und Substantia Compacta, die man auch als Kortikalis bezeichnet, unterteilen. Die Kortikalis stellt die äußere Schicht des Knochens dar und erfüllt eine wichtige Rolle in der Stabilität des Knochens. Die Spongiosa ist ein im Innenraum des Knochens angelegtes, schwammartiges Trabekelsystem, in dessen Hohlräumen sich das Knochenmark befindet. Der Knochen wird von der Knochenhaut, dem Periost, umgeben. Dieses ist gut durchblutet und nerval versorgt und spielt bei der Frakturheilung eine wesentliche

Rolle (Niethard und Pfeil 2005). Im Knochenstoffwechsel dominieren drei Zelltypen, die für die Dynamik und Anpassungsfähigkeit verantwortlich sind: Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten.

1.2.2 Osteoblasten

Osteoblasten sind die Zellen des Knochengewebes, die für die Matrixbildung verantwortlich sind. Die von den Osteoblasten produzierte Matrix ist noch nicht mineralisiert. Man bezeichnet sie als Osteoid. Neben einer Vielzahl an Proteinen, wie dem Kollagen, Proteoglykanen und Osteokalzin, produzieren sie auch Wachstumsfaktoren (Delmas 1993). Sie stehen über Nexus miteinander in gegenseitigem Kontakt und besitzen Rezeptoren, um auf dynamische Prozesse reagieren zu können.

1.2.3 Osteozyten

Osteozyten sind in ihrer Gestalt und Struktur veränderte Osteoblasten. Sie liegen in einem Lakunensystem der Knochenmatrix und bilden mit ihren Ausläufern Nexus zu benachbarten Osteozyten aus. Somit besteht auch ein Stoffaustausch zwischen den Osteoblasten, die sich an der Oberfläche der Knochen befinden und den Osteozyten in der Matrix. Durch mechanische Beanspruchung und Reize werden sie stimuliert, so dass sie mit den Osteoblasten kommunizieren und so am langsamen Knochenumbau beteiligt sind (Chan et al. 2009).

1.2.4 Osteoklasten

Im lebenslangen Prozess des Umbaues und der Neubildung des Knochens liegt die Aufgabe der Osteoklasten in der Resorption der Knochenmatrix (Lee und Lorenzo 2006). Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen, die an der Oberfläche des Knochens in Höhlen liegen. Die Resorption in den Lakunen gelingt mithilfe von Hydrolasen, welche die Osteoklasten sezernieren. Das Aktivitätsniveau der Osteoklasten wird von vielerlei Faktoren beeinflusst. So unterdrückt Kalzitinin unter anderem ihre Aktivität. Interleukine aus Osteoblasten regen sie zur Resorption des Knochens an. Dies zeigt außerdem, dass Osteoblasten neben dem Knochenaufbau auch eine regulierende Funktion im Abbau besitzen, um das Gleichgewicht zu wahren (Roodman 1993).

1.2.5 Knochenstoffwechsel

Unser Skelettsystem sieht sich lebenslangen Belastungen und Reizen konfrontiert und unterliegt somit auch einem fort dauernden Umbauprozess. Bei diesem Umbauprozess werden Resorption und Neubildung durch vielfältige Stimuli angeregt und abgebautes Gewebe erneuert (Iqbal et al. 2009). Diese Vorgänge können in unserem System in großer Zahl parallel ablaufen (Boyce und Xing 2008). So wird unser Skelett regelmäßig vollständig erneuert. Kompakter Knochen benötigt ungefähr die doppelte Dauer wie trabekulärer Knochen, der etwa vier Jahre für eine komplette Erneuerung erfordert. Dies verdeutlicht, weshalb die unten beschriebenen Schäden im Bereich der Kompakta später auffällig werden als an der Spongiosa. Auf zellulärer Ebene erfolgt die Regulation des Knochenstoffwechsels unter anderem

durch Zytokine (Roodman 1993). Von besonderer Bedeutung sind hier RANK und RANKL. RANK ist ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF-11A) und hat resorptionsfördernde Eigenschaften. RANK findet man zum Beispiel in Osteoklasten-Vorläuferzellen, Osteoklasten und in Dendritischen Zellen. RANK wird von RANKL gebunden, einem Protein aus der Familie der Tumornekrosefaktoren (TNFSF-11), welches wesentlich an der Regulation von Knochenauf- und abbau beteiligt ist. Es ist somit ein Ligand des *receptor activator of nuclear factor- κ B* (RANK) und stimuliert als Botenstoff die Resorptionsaktivität von reifen Osteoklasten. Außerdem regt es den Reifungsprozess von Vorläuferzellen der Osteoklasten an. Sezerniert wird RANKL von Osteoblasten und einigen Knochenmarkszellen. Bindet nun also RANKL an seinen Rezeptor RANK, erfolgt ein Anstieg des Knochenabbaus. Osteoprotegerin (OPG), ebenfalls ein Produkt der Osteoblasten und ein weiteres Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF-11B), bindet kompetitiv an RANKL und hemmt dadurch dessen Bindung an RANK. OPG ist also ein Decoy-Rezeptor. Somit ist die Wirkung von Osteoprotegerin eine Abbau hemmende und Knochen protektive (Lee und Lorenzo 2006). Die Sekretion von Osteoprotegerin wird durch Östrogene gesteigert. Außerdem hemmen Östrogene Osteoblasten in ihrer RANKL-Sekretion, was die knochenprotektive Funktion von Östrogenen erklärt (Hofbauer et al 1999).

1.2.6 Marker des Knochenstoffwechsels

Es existieren verschiedene Serumparameter, die es uns ermöglichen, Aussagen über den Stoffwechsel des Knochens, mögliche Krankheiten und die Kalziumhomöostase zu treffen. Diese Marker kann man in zwei Gruppierungen

unterteilen: Jene, die einen Aufbau des Knochengewebes anzeigen und solche, die für einen erhöhten Abbau des Knochengewebes stehen. Die Knochenspezifische Alkalische Phosphatase (BAP) und Osteokalzin (OC) geben Auskunft über den Aktivitätslevel der Osteoblasten. Beide Marker weisen eine hohe Spezifität auf. Zum Monitoring des Abbaus finden unter anderem die tartratresistente saure Phosphatase und die CrossLaps (CL) Verwendung (Garnero und Delmas 1996), welche Abbaufragmente des Typ-1-Kollagens sind.

1.2.7 Der Knochen der Ratte

Für eine aussagekräftige Vergleichbarkeit ist es von großer Bedeutung, dass eine möglichst hohe Übereinstimmung zwischen Mensch und Ratte hinsichtlich der Eigenschaften der gemessenen Parameter vorliegt. Da das Knochengewebe der Ratte mit dem des Menschen vergleichbar ist und die relevanten Regulationsmechanismen und Parameter dieser Arbeit sowohl bei der postmenopausalen Frau als auch der ovariectomierten Ratte vorkommen, lassen sich die Ergebnisse übertragen (Martin et al. 2003). Als Unterschied wäre anzuführen, dass sich die Wachstumsfugen bei Ratten nicht verschliessen. Beim Menschen kommt es zu solch einem Schluss der Epiphysenfuge (Kapur et al. 2010). Physiologischerweise entwickelt die intakte Ratte keine Osteoporose. Um diese nun in einen solchen Zustand zu versetzen, werden die Tiere ovariectomiert. Dies bewirkt einen Substanzverlust, welcher der postmenopausalen und senilen Osteoporose des Menschen ähnelt. Zu Beginn des Östrogenmangels ist ein schneller Knochenverlust zu verzeichnen, der bei längerer Dauer langsamer fortschreitet (Kalu 1991). Hier gilt primäres Augenmerk der Tibia der Ratte, da dies der Ort ist, der besonders sensibel auf hormonelle Änderungen

reagiert und bereits zwei Wochen nach der Ovariectomie osteoporotische Merkmale aufweist. Dementsprechend eignet sich die Tibia besonders für Untersuchungen (Wronski et al. 1986). An anderen Knochen manifestiert sich die Osteoporose erst deutlich später (Wronski et al. 1989 a; Wronski et al. 1989 b). Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass sich die Ratte als Tiermodell in endokrinologischen Untersuchungen am Knochen bewährt hat (Bellino 2000; Turner 2011).

1.3 Die Osteoporose

1.3.1 Definition und Epidemiologie

Bei der Definition der Osteoporose richtet sich der Deutsche Dachverband für Osteologie (DVO) nach den Ergebnissen, die 1993 auf der „Consensus Development Conference on Osteoporosis“ festgelegt wurden. Demnach handelt es sich bei der Osteoporose um eine systemische Erkrankung des Skeletts, die eine verminderte Knochenmasse und einen qualitativen Verlust der Mikroarchitektur des Knochengewebes mit sich bringt, bei der die Fragilität des Knochens und die damit verbundene Frakturrisiko ansteigt (Consensus development conference 1993). Grundsätzlich kann man die Osteoporose in eine primäre und sekundäre Form einteilen. Die primäre Form stellt mit 95% die größte Gruppe. Hierzu zählen die postmenopausale Osteoporose, die senile und idiopathische juvenile Form. Die sekundäre Osteoporose kann beispielsweise als Folge einer Grunderkrankung, Medikamenteneinnahme oder Immobilität entstehen (Herold 2011). Alleine in Deutschland sind 7,8 Millionen Menschen an Osteoporose erkrankt. Hiervon waren 6,5 Millionen weiblich. Der Schwerpunkt bei den Betroffenen scheint hier auf der

postmenopausalen Frau zu liegen, da es bei mehr als 25% der Frauen nach der Menopause zu der Entwicklung einer Osteoporose kommt (Häussler et al. 2007). 2006 wurde angenommen, dass weltweit um die 200 Millionen Menschen an Osteoporose erkrankt waren, was die globale Bedeutung dieser Krankheit verdeutlicht (Reginster und Burlet 2006). Ebenfalls große Relevanz haben die klinischen Folgen, da jährlich ungefähr 8,9 Millionen Frakturen weltweit als Auswirkung der Osteoporose anzusehen sind (WHO 2004).

1.3.2 Ursachen und Risikofaktoren

Der menschliche Knochen erreicht in der vierten Lebensdekade seine maximale Knochenvolumenmineralisierungsdichte, was man auch als peak bone mass (PBM) bezeichnet. Ab diesem Zeitpunkt kommt es zu einem Abbau des Knochengewebes, welcher individuell stark variiert. Eine besondere Bedeutung in der Entstehung der Osteoporose besitzt der postmenopausal bedingte Östrogenmangel (Riggs und Melton 1986). Dieser Mangel kann in einem Verlust von 35-40% der Kortikalis und 55-60% der Spongiosa des Knochens münden (Niethard und Pfeil 2005). Der Auf- und Abbau von Knochengewebe befindet sich normalerweise in einer Balance. Wird diese Balance nun gestört, wie beispielsweise durch einen Östrogenmangel, kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts Richtung vermehrter Knochenabbau (Ivey und Baylink 1981). Durch den Östrogenmangel kommt es zu einer gesteigerten Aktivität sowohl der Osteoblasten als auch der Osteoklasten. Dies geschieht jedoch nicht in gleichem Maße. Bei den Osteoklasten ist die Steigerung der Aktivität ausgeprägter, was den Knochenstoffwechsel Richtung Abbau verschiebt. Dies zeigt sich ebenfalls in einem Anstieg der Knochenmarker. Im Blut sind gesteigerte Werte

der Marker für den Knochenaufbau, wie beispielsweise das Osteokalzin, und noch stärker erhöhte Werte der Marker für den Knochenabbau, wie die CrossLaps, nachweisbar (Riggs et al. 1998). Adulte mesenchymale Stammzellen entwickeln sich zu Osteoblasten, Adipozyten, Myoblasten, Chondroblasten und Fibroblasten. Die Entwicklung aus adulten mesenchymalen Stammzellen ist nun vermehrt in Richtung Adipozyten und weniger zu Osteoblasten verschoben (Manolagas 2000). Die postmenopausale Osteoporose ist in den ersten Jahren vor allem durch einen Verlust von Spongiosa geprägt (Riggs et al. 1998). Im Gegensatz hierzu ist bei der senilen Osteoporose ein langsamer Abbau zu verzeichnen, der gleichermaßen Spongiosa und Kompakta betrifft (Herold 2011). Hierzu kommen noch weitere Risikofaktoren, welche den Knochenabbau zusätzlich negativ beeinflussen können. Dazu gehören Faktoren, die den Lebensstil betreffen wie mangelnde körperliche Aktivität, Alkohol- und Zigarettenkonsum oder aber auch eine mangelhafte Ernährung. Ebenfalls Beachtung finden sollten Vorerkrankungen und Medikamente, die den Knochenstoffwechsel beeinträchtigen (Vokes und Favus 2010). Bei Variablen, die nicht zu beeinflussen sind, handelt es sich beispielsweise um das Geschlecht, das Alter und die genetische Disposition.

1.4 Metabolisches Syndrom

Beim Metabolischen Syndrom handelt es sich um eine Kombination aus stoffwechselbedingten Symptomen. Hierzu zählen arterieller Hypertonus, viszerale Adipositas, Dyslipidämie und eine Insulinresistenz. Diese Faktoren erhöhen deutlich das kardiovaskuläre Risiko (Kaaja 2008). Das Metabolische Syndrom ist auch als „Wohlstandssyndrom“ bekannt. Verursacht vor allem durch Mangel an Bewegung

und Fehlernährung, tritt es hauptsächlich in Wohlstandsgesellschaften auf. Inzwischen sind in Deutschland mehr als 20% der Bevölkerung betroffen (Neuhauser und Ellert 2005). Neben dem Einfluss des Lebensstils ist auch eine genetische Disposition von Bedeutung. Des Weiteren besteht ein Zusammenhang zwischen dem hormonellen Lebensabschnitt einer Frau und dem Metabolischen Syndrom. Bei postmenopausalen Frauen besteht ein deutlich größeres Risiko der Ausprägung eines Metabolischen Syndroms (Carr 2003; Park et al. 2003). Sowohl Bindegewebszellen als auch Adipozyten, Osteoblasten, Myoblasten und Chondroblasten stammen alle von mesenchymalen Stammzellen ab (Akune et al. 2004). Verschiedene Faktoren können Einfluss darauf haben, zu welcher Zelle sich diese Stammzelle nun differenziert. Der Transkriptionsfaktor *runt-related transcription factor* (RUNX 2) spielt in der Differenzierung der Osteoblasten eine Rolle. Die Initiierung des *peroxisome proliferator activated receptor gamma* (PPAR γ 2) hingegen regt die Adipogenese an (Akune et al. 2004; Zhao et al. 2008). Mit zunehmendem Lebensalter nimmt die Aktivierung von PPAR γ 2 zu, was sich in einer zunehmenden Verfettung des Knochenmarks und abnehmenden Knochenaufbau zeigt (Rodríguez et al. 2000). Eine vermehrte Verfettung des Knochenmarks lässt sich auch bei der Osteoporose beobachten (Yeung et al. 2005). Die vermehrte Bildung von Fettzellen im Knochenmark schädigt diesen direkt und zeigt sich in einer negativen Knochenbilanz (Justesen et al. 2001; Verma et al. 2002). Insgesamt werden die Effekte des Fettgewebes auf den Knochen auch als lipotoxisch charakterisiert (Duque 2008). Diese Infiltrate wurden vor allem bei der postmenopausalen Osteoporose beobachtet (Yeung et al. 2005). Es hat sich in jüngster Zeit gezeigt, dass ein negativer Zusammenhang zwischen Fett- und Knochenmasse besteht (Zhao et al. 2008). Aufgrund der viszeralen Fettleibigkeit kommt es zu einer

Steigerung der Adipokinproduktion der Adipozyten, die zu einem inflammatorischen Milieu beiträgt (Fontana et al. 2007). In diesem entzündlichen Milieu findet man hohe Spiegel von Zytokinen wie Interleukin-6 (IL-6) und TNF- α , welche die Resorptionsaktivität der Osteoklasten steigern (Hofbauer und Schoppet 2010; Russel et al. 2010; Cao 2011). Der Anstieg der Adipokine resultiert außerdem in einer Steigerung der RANKL-Synthese und einer Inhibition der OPG-Produktion. Diese Mechanismen münden in einer weiteren Aktivierung der Osteoklasten (Luo et al. 2006). Zudem hat die Fettstoffwechselstörung des Metabolischen Syndroms weitere Auswirkungen. Besonders der LDL-Anstieg beeinflusst die Knochendichte negativ (Poli et al. 2003). Auch das Leptin, ein Hormon der Adipozyten, nimmt Einfluss auf den Metabolismus des Knochens. Zu hohe Leptinspiegel stören das Gleichgewicht zwischen Resorption und Aufbau des Knochens (Hsu et al. 2006; Cao 2011). So konnte immer deutlicher der negative Einfluss des Metabolischen Syndroms auf die Qualität des Knochens dargelegt werden (Hwang und Choi 2010). All diese Aspekte verdeutlichen zudem, dass man das Metabolische Syndrom durchaus als Risikofaktor in der Entstehung einer Osteoporose betrachten kann. Zusätzlich gilt zu beachten, dass die postmenopausale Frau, wie zuvor bereits erwähnt, ein um 60% erhöhtes Risiko trägt, am Metabolischen Syndrom zu erkranken (Carr 2003). Der Östrogenmangel führt zu einer direkten Abnahme der Knochenprotektion und zu einem Fettverteilungstypen, der typisch für das männliche Geschlecht ist. Durch die vermehrte abdominelle Fettanreicherung kommt es zu dem bereits oben beschriebenen Zytokinanstieg mit dessen Auswirkungen. Änderungen des Lebensstils, also Maßnahmen im Bereich der Ernährung und Bewegung, sowie ein medikamentöses Vorgehen sind nicht nur als Therapie des Metabolischen Syndroms im Sinne einer Reduzierung des kardiovaskulären Risikos anzusehen, sondern

erweisen sich auch in der Prophylaxe und Therapie der Osteoporose und Sarkopenie als relevant.

1.5 Sarkopenie

Die Sarkopenie beschreibt den Verlust von Muskelmasse und den damit einhergehenden Verlust der Muskelkraft vor allem beim älteren Menschen (Norman et al. 2009). Sie beginnt im Alter von 50 Jahren und zeigt eine fortschreitende Progredienz mit dem Alter. So kann ein anfänglicher Muskelschwund von ca. 1,5% pro Jahr zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr mit zunehmendem Alter auf 3% ansteigen (Evian und Campbell 1993; Bauer et al. 2008). Die Ursachen der Sarkopenie sind multifaktoriell. Wesentliche Faktoren sind die mangelnde körperliche Aktivität, eine neuronale Degeneration und oxidativer Stress (Möllenhoff 2007). Auch der Mangel an Sexualhormonen bedingt durch das Klimakterium kann eine Ursache für die Entstehung einer Sarkopenie darstellen (Sirola und Rikkonen 2005). Dieser resultiert in einem Muskelabbau und einer Zunahme des BMI. Desweiteren kommt es zu Fett- und Bindegewebsinfiltraten der Muskulatur (Bauer et al. 2008). Ebenfalls Beachtung finden sollte der Proteinstoffwechsel der Muskulatur. Es wird angenommen, dass die Muskulatur mit steigendem Alter vermehrt Proteine benötigt und demzufolge der Proteinmangel eine wichtige Rolle in der Kausalität der Entstehung und des Fortschreitens der Sarkopenie einnimmt (Janssen et al. 2002; Norman et al. 2009). Desweiteren wird die Entstehung und das Fortschreiten einer Sarkopenie zusätzlich gefördert durch eine Beeinträchtigung der vestibulären und visuellen Wahrnehmung (Mayer et al. 2011). Die Gefahren der Sarkopenie liegen unter anderem in der Vielzahl von Stürzen und damit einhergehenden Verletzungen

(Morley et al. 2005). Eine daraus resultierende verletzungsbedingte Immobilität verschärft die Situation zusätzlich. Ebenfalls von Bedeutung sind die Auswirkungen der Muskulatur auf den Rest des Organismus. Die Muskulatur bildet mit dem Skelett eine funktionelle Einheit. So stellt der Muskel einen Stabilisator und Stimulus für den Knochen dar. Eine Sarkopenie hat somit direkte Auswirkungen auf den Metabolismus des Knochens (Blain et al. 2001). Desweiteren wird durch die bereits angesprochene Immobilisation die Ausprägung einer Osteoporose gefördert (Marzetti und Leeuwenburgh 2006). Die momentanen Ansätze in der Therapie der Sarkopenie beinhalten vor allem ein Krafttraining (Janssen et al. 2002).

1.6 20-Hydroxyecdysol

Bei der Testsubstanz handelt es sich um das Ecdysteroid 20-Hydroxyecdysol (β -Ecdysol, E20, Ecd). Dieses wurde zuerst von Butenandt und Karlson isoliert (Butenandt und Karlson 1954). Ecdysteroide können sowohl von Pflanzen als auch von Insekten produziert werden (Dinan et al. 2001). Bei Arthropoden übernehmen sie unter anderem eine hormonelle Funktion. Dazu kann die Einleitung der Häutung bei Insekten zählen oder aber die Steuerung des Ablaufes der Metamorphose bei Schmetterlingen (Báthori et al. 2008). Bei Pflanzen spielen sie unter anderem bei der Verteidigung vor Insektenfraß eine Rolle. Bei Spinat und Quinoa handelt es sich um Pflanzen, die eine besonders hohe Konzentration des Phytoecdysteroids enthalten (Findeisen 2005). Säugetiere besitzen nicht die Fähigkeit der Ecd Produktion. Ebenfalls konnten bei Säugetieren keine Ecdysteroidrezeptoren ausfindig gemacht werden (Dinan und Lafont 2006). Die Aufnahme von Ecd über die Nahrung ist für Säuger jedoch möglich. Die Auswirkungen von Ecd auf den Menschen werden seit

längerem erforscht und bereits in den siebziger Jahren wurden antidiabetische und hypoglykämische Effekte nachgewiesen (Yoshida et al. 1971). Ebenfalls wurden senkende Eigenschaften von Ecdyson auf die Serumlipide beschrieben (Mironova et al. 1982; Catalan et al. 1985). Ecdyson besitzt zusätzlich eine anabole Wirkung auf die Muskulatur und vermag eine Reduktion des Körperfettes herbeizuführen (Seidlová-Wuttke et al. 2010b). Desweiteren unterstützt Ecd die Muskulatur in ihrem Regenerationsprozess nach Belastungen. Diese Effekte versucht man sich in der Fitness Industrie zu Nutze zu machen mit der Produktion Ecd-haltiger Präparate (Dinan und Lafont 2006). Es wurden positive Effekte auf Risikofaktoren des Metabolischen Syndroms nachgewiesen. Neben den bereits beschriebenen antidiabetischen Wirkungen konnte eine Fettgewebsreduktion beobachtet werden (Kizelsztejn et al. 2009). Diese positiven Auswirkungen konnten in Untersuchungen der Abteilung bestätigt werden (Seidlová-Wuttke et al. 2010b). Desweiteren konnten knochenprotektive Effekte von Ecd nachgewiesen werden. Diese wurden sowohl bei Messungen des trabekulären Knochens erzielt (Kapur et al. 2010) als auch bei Knochenvolumenmineraldichtemessungen und Analysen der Knochenmarker dieser Abteilung (Seidlová-Wuttke et al. 2010a). Das Wirkprinzip von Ecd beim Menschen ist bislang nicht vollständig erklärt. Wie oben bereits erwähnt, wird die Wirkung von Ecd nicht über Ecdysteroidrezeptoren vermittelt. Ebenfalls ist Ecd nicht in der Lage an Östrogenrezeptoren zu binden (Seidlová-Wuttke et al. 2010b). Bei Arthropoden entwickelt Ecd seine Wirkung durch die Bindung intrazellulärer Rezeptoren. Dieser funktionelle Rezeptor entsteht durch die Dimerisierung des Ecd-Rezeptors und des Ultraspiracle-Proteins (USP). Nach Bindung des Liganden fungiert er als Transkriptionsfaktor. Das Analogon zum USP bei Säugetieren stellt der Retinoid-X-Rezeptor (RXR) dar (Yao et al. 1993; Mangelsdorf et al. 1995). Somit birgt eine

Einnahme von Ecd nicht die Gefahren einer Östrogentherapie. Selbst bei höher dosierter Ecd-Einnahme über einen längeren Zeitraum bei Kraftsportlern konnten keine Nebenwirkungen beobachtet werden (Dinan und Lafont 2006).

1.7 Zielsetzung

Inhalt dieser Dissertation ist die Untersuchung der Wirkung von Ecd und E2 auf den Knochen und die Muskulatur der ovx Ratte. Ebenfalls Beachtung finden soll der Effekt auf bedeutende Serumparameter des Knochenstoffwechsels. Zudem sollen die Gewebearten in ihrer Entwicklung und einer möglichen gegenseitigen Einflussnahme betrachtet werden. Für die Versuche wurde die ovx S.D.-Ratte ausgewählt, da sie ein etabliertes Modell der postmenopausalen Frau darstellt (Bellino 2000). In früher durchgeführten Untersuchungen konnten bereits die positiven Auswirkungen von Ecd auf den Knochen beobachtet werden (Kapur et al. 2010). Ein positiver Effekt des pflanzlichen Steroids auf das Metabolische Syndrom wurde innerhalb dieser Abteilung bereits nachgewiesen (Seidlová-Wuttke et al. 2010b). Es gilt nun diese Ergebnisse zu bestätigen, um in Zukunft eine weitere, möglichst nebenwirkungsarme Alternative in der ganzheitlichen Therapie der vielfältigen Beschwerden der klimakterischen Frau anbieten zu können. Vor diesem Hintergrund ist das Ziel dieser Arbeit die Beantwortung der folgenden Fragen:

1. Welchen Einfluss haben die Testsubstanzen Ecd und E2 auf das Knochengewebe von S.D.-Ratten nach einer Applikation von vier Wochen? Sind hier Unterschiede in den verschiedenen Kompartimenten des Knochens festzustellen?

2. Besitzt Ecd innerhalb von vier Wochen regulatorische Effekte auf die Serumparameter des Knochenstoffwechsels?

3. Welche Effekte üben Ecd und E2 auf die Skelettmuskulatur von S.D.-Ratten nach einer vierwöchigen Gabe aus? Stellt Ecd ein geeignetes Präparat in der Therapie der altersbedingten Sarkopenie dar?

2. Material und Methoden

2.1 Tierversuche

2.1.1 Versuchstiere

Bei den Tierversuchen wurden 40 Sprague-Dawley-Ratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln) zu jeweils fünf Tieren in acht Käfigen (Makrolon®-Käfig Typ IV, Firma Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg) gehalten. Die Versuche standen unter der Aufsicht von Priv.– Doz. Dr. med. D. Seidlová–Wuttke und wurden von meinem Co-Doktoranden Moritz Pettenkofer und mir zu gleichen Teilen eigenständig ausgeführt. Unabhängig von dieser Arbeit untersuchte mein Co-Doktorand die Effekte auf das Fettgewebe und die subkutane Körpertemperatur. Die Untersuchungen erstreckten sich über einen Zeitraum vom 16. März 2011 (qCT1) bis zum 30. April 2011 (Obduktion). Bei der Ankunft waren die Tiere ungefähr drei Monate alt. Eine Genehmigung der Haltung in der Zentralen Tierexperimentellen Abteilung der Universitätsmedizin Göttingen lag durch die Bezirksregierung Braunschweig 33.11.42504-04-043/08 vor. Die Tiere waren in einem Raum untergebracht, der eine konstante Raumtemperatur von 23° Celsius und eine relative Luftfeuchtigkeit zwischen 50 und 55% aufwies. Die Beleuchtung des Raumes war von 6.00 – 18.00 Uhr eingeschaltet. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Bei Ankunft wogen die Ratten zwischen 227 und 284 Gramm. Die Tiere wurden nun so in die einzelnen Gruppen eingeteilt, dass das mittlere Körpergewicht pro Gruppe ausgeglichen war. So stellte dieses einen Referenzwert dar, welcher Vergleiche zwischen den Gruppen bezüglich der Zu- oder Abnahme des Körpergewichts vereinfachte und auch Entwicklungen der Gruppen sichtbar machte. Moritz Pettenkofer und ich führten wöchentlich einen Futterwechsel durch und wogen das Restfutter.

2.1.2 Ablauf der Knochenvolumenmineraldichtemessung

Bei den Versuchstieren wurde vor der ovx und vier Wochen nach der ovx und Applikation der getesteten Substanzen eine Messung durchgeführt. Somit konnten die Effekte der Substanzen auf Knochen, Muskulatur und Fettgewebe überprüft werden. Dies erfolgte mit einem quantitativen Computertomographen (Norland Stratec XCT Research SA+, Firma Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim). Hierbei wurden die Ratten mittels einer Isoflurannarkose (Forene®, Abbott, Illinois, USA) narkotisiert, um anschließend einen Transponder (IPPT-300, ELAMS PLEXX, Elst, Niederlande) subkutan im Bereich des Nackens zu implantieren und sie zu wiegen. Jedem Tier wurde über den Transponder eine Nummer zugewiesen und mithilfe eines Lesegerätes (ELAMS PLEXX System, Elst, Niederlande) konnten diese identifiziert und deren Körpertemperatur bestimmt werden. Anschließend wurden die Versuchstiere seitlich in eine spezielle Vorrichtung gelegt und in derselben Position mit einer Klemme fixiert. Die anschließende Messung der Tibia dauerte etwa 15 Minuten. Die Messung der Lendenwirbelsäule erfolgte für die Tiere auf dem Rücken liegend in einer von der Abteilung angefertigten Vorrichtung und beanspruchte 10 Minuten. Bei dieser Messung lagen die Tiere auf dem Rücken und als Orientierungspunkt für die richtige Höhe der Messung dienten die Beckenkämme. Somit wurden die computertomographischen Messungen aller Tiere an exakt denselben Stellen der metaphysialen Tibia und Vertebra durchgeführt. Dann wurde die Zufuhr des Narkosegases eingestellt, die Tiere aus den Vorrichtungen gelöst und in einen zweiten, mit Zellstoff gepolsterten Käfig gelegt, um dort von der Narkose aufzuwachen. Eine Zusammenfassung der theoretischen Grundlage der qCT-

Messung ist in Abschnitt 2.2.1. zu finden, da diese bereits mehrfach in anderen Arbeiten dieser Abteilung ausführlich beschrieben wurde.

2.1.3 Ovariectomie

Wenige Tage nach den ersten qCT-Messungen wurden die Ratten beidseits ovariectomiert. Dies geschah unter Isoflurannarkose (Forene®, Abbott, Illinois, USA) und postoperativer Analgesie mit Rimadyl® (Pfizer GmbH, Karlsruhe). Den Eingriff leitete Priv.-Doz. Dr. med. Seidlová-Wuttke mit der Assistenz von Moritz Pettenkofer und mir. Zur Vorbereitung wurden die Ratten beidseits im Bereich des Abdomens bilateral rasiert. An diesen Stellen wurde jeweils ein Einschnitt vorgenommen und die Bauchhöhle eröffnet. Anschließend wurde der Uterus samt Adnexen nach außen verlagert, wo die Ovarien abgeklemmt und dann entfernt wurden. Der Uterus wurde nun wieder in der Bauchhöhle platziert und diese mit Nähten (Vicryl®, Firma Ethicon, Norderstedt) der Muskulatur und des Peritoneums verschlossen. Die Haut wurde abschließend mit Michel-Klammern® (Firma Martin, Tuttlingen) versorgt. Zum Aufwachen wurden die Ratten in einen zweiten Käfig gelegt, um sicherzustellen, dass postoperativ keine Komplikationen, wie etwa Nachblutungen, auftraten. Anschließend wurden sie wieder in ihren ursprünglichen Käfig zu ihrer Gruppe gebracht.

2.1.4 Applikation der Wirkstoffe

Bis zwei Wochen vor Versuchsbeginn, in der Eingewöhnungsphase der Tiere, erhielten diese sojafreies Futter. Dieses wurde zwei Wochen vor Versuchsbeginn

durch das sojafreie Kontrollfutter ssniff® EF R/M Kontrolle (E 15000-04, 10 Pellets, ssniff® Spezialitäten GmbH, Soest) ersetzt. Vor Beginn der Untersuchungen wurden die Ratten in vier Gruppen aufgeteilt. Die Gruppen bestanden aus jeweils zehn Tieren, welche zu fünf in einem Käfig zugeteilt wurden, damit diese ein ähnliches mittleres Gewicht hatten (siehe 2.1.2). Die Wirkstoffe wurden den Tieren per Futter (ssniff® Spezialitäten GmbH, Soest) nach ovx verabreicht. Die vier Gruppen gliederten sich wie folgt:

- sojafreies Kontrollfutter bei Ko, ovx Tieren
- sojafreies Kontrollfutter bei intakten Tieren
- ecdysonhaltiges sojafreies Futter bei Ecd, ovx Tieren (3g/kg Futter)
- östradiolhaltiges Futter bei E2, ovx Tieren (10mg/kg Futter)

Dieses stand ihnen frei zur Verfügung. Während des Versuches wurde alle sieben Tage die Menge des verbliebenen Futters gewogen. So konnte die mittlere Aufnahme des Futters und die mittlere Aufnahme des Wirkstoffes für jedes Tier pro Tag bestimmt werden. Die Angaben hierzu kann man aus Tabelle 1 entnehmen.

Tabelle 1. Mittlere Futtermenge eines Versuchstieres pro Tag in Gramm und die damit durchschnittlich aufgenommene Substanz pro Tier/Tag in Milligramm.		
Testsubstanz	Futtermenge (g/Tier/Tag)	Substanzmenge (mg/Tier/Tag)
sojafrei (Ko,ovx)	18,66	-
sojafrei (intakt)	16,38	-
Ecd (Ecd,ovx)	21,9	65,7
E2 (E2,ovx)	15,48	0,1548

2.1.5 Obduktion

Nach vierwöchiger Gabe der Wirkstoffe und abschließender computer-tomographischer Messung fand die Obduktion aller Tiere unter Leitung von Priv.-Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke und Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke statt. Ihnen zur Seite standen die Doktorandinnen der Abteilung Lea Lass und Maria Tschernova. In einem Raum wurden die Tiere randomisiert und nach Identifikation mittels Transponder und Lesegerät durch Moritz Pettenkofer und mich einzeln in den Raum gebracht, in dem die Obduktion stattfand. Dort wurden die Tiere von Prof. Dr. rer. nat. Hubertus Jarry mit CO₂ narkotisiert und anschließend dekapitiert. Direkt nach der Enthauptung wurde das Blut der Tiere aufgefangen, um es später zur Analyse der Serumparameter zu verwenden. Während der Obduktion wurden eine Vielzahl an Organen und Gewebe entnommen, welche die Grundlage anderer histologischer Arbeiten darstellt. Für diese Arbeit waren die Serumparameter

CrossLaps und Osteokalzin, das Knochengewebe der Tibia und Vertebra sowie das Muskelgewebe von besonderer Bedeutung.

2.2 Auswertung

2.2.1 Ermittelte Parameter

Das Verfahren, welches den Knochenvolumenmineraldichtemessungen mit dem qCT zugrunde liegt, wurde bereits in mehreren Arbeiten dargestellt (Seidlová-Wuttke et al., 2010 b). Eine Zusammenfassung soll aber auch hier helfen, einen Eindruck über das Verfahren zu gewinnen. Gemessen wurde im Bereich der Tibia und Vertebra bei jedem der 40 Versuchstiere vor Ovx und als Abschluss des Versuches nach vierwöchiger Gabe der Substanzen. Diese fanden bei der Tibia in drei spezifischen Ebenen statt. Die ersten beiden Ebenen waren für die Gewinnung der Daten des trabekulären Knochens und des Muskel- und Fettgewebes von Bedeutung. Die dritte Ebene lieferte Informationen über die Kortikalis des Knochens. Die drei Ebenen befanden sich in einem Abstand von 3,75, 4,25 und 15 mm distal des Referenzpunktes. Die Messpunkte der drei Ebenen und die Dichtebereiche der verschiedenen Gewebe veranschaulicht Abbildung 1. Die Messungen der Vertebra fanden ebenfalls in drei verschiedenen Ebenen statt, die in einem Abstand von 0,1 mm proximal und kaudal des Referenzpunktes lagen. Analog zu den Parametern der Tibia waren auch hier die Daten der ersten beiden Ebenen trabekulär und die dritte Ebene kortikal. Diese Messpunkte sind in Abbildung 2 dargestellt. Die gewonnenen Daten aller qCT-Messungen wurden auf einen Computer übertragen und konnten dort mit einem speziellen Programm (XCT5,40; Stratec, Pforzheim) von

Moritz Pettenkofer und mir ausgewertet werden. Im besonderen Fokus dieser Arbeit lagen die endosteale Dichte (ED), endosteale Fläche (EF), kortikale Dichte (KD) und die kortikale Fläche (KF). Die endosteale Dichte (ED) ist definiert als Dichte der Knochenbälkchen (Trabekel) innerhalb der Spongiosa und wird in mg/cm^3 angegeben. Die endosteale Fläche (EF) ist die Fläche des Querschnitts des endostealen Raumes, der von Kortikalis umgeben ist und in mm^2 gemessen wird. Die kortikale Dichte (KD) ist die Dichte der Kortikalis, welche die Spongiosa umschließt. Sie wird in mg/cm^3 angegeben. Die kortikale Fläche (KF) ist die Querschnittsfläche der Kortikalis. Ihre Angaben erfolgen ebenfalls in mm^2 . Ebenfalls bedeutsam ist die endosteale und periosteale Zirkumferenz, welche das Ausmaß des endostealen und periostealen Gewebes beschreibt und in mm angegeben wird. Einen Querschnitt der Metaphyse abzüglich der knöchernen und muskulären Bestandteile bezeichnet man als paratibiales Fettdepot. Ein Querschnitt der Tibia abzüglich des Fettgewebes und des Knochens ergibt die Muskelfläche in mm^2 . Eine bestimmte Gewebedichte entspricht der Muskulatur. Im Folgenden sind Dichteeinteilungen aufgelistet und das hierfür definierte Gewebe.

- $\leq 40 \text{ mg}/\text{cm}^3$ - Fettgewebe
- $40 - 99 \text{ mg}/\text{cm}^3$ - Muskelgewebe
- $280 - 400 \text{ mg}/\text{cm}^3$ - trabekuläres Knochengewebe (Spongiosa)
- $> 710 \text{ mg}/\text{cm}^3$ - kortikales Knochengewebe (Kortikalis)

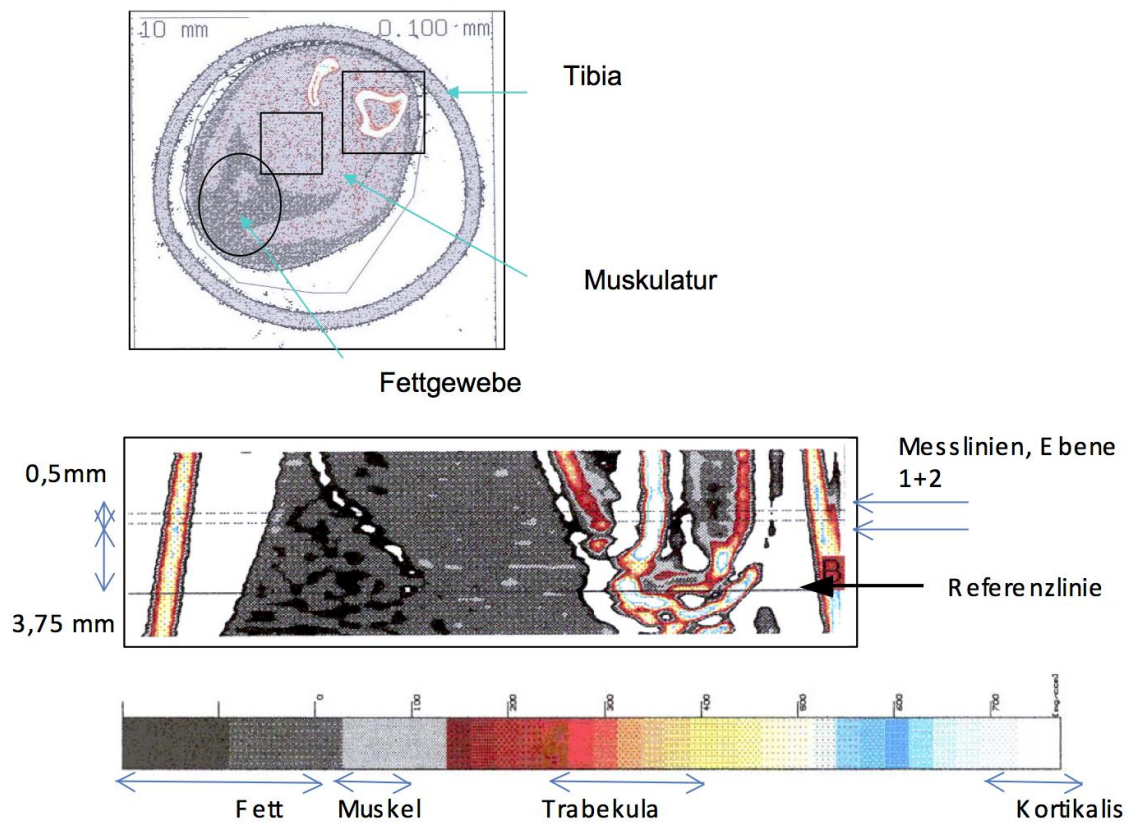


Abbildung 1. Messlinie und Dichtebereiche der verschiedenen Gewebetypen bei der qCT-Auswertung im Bereich der Tibia.

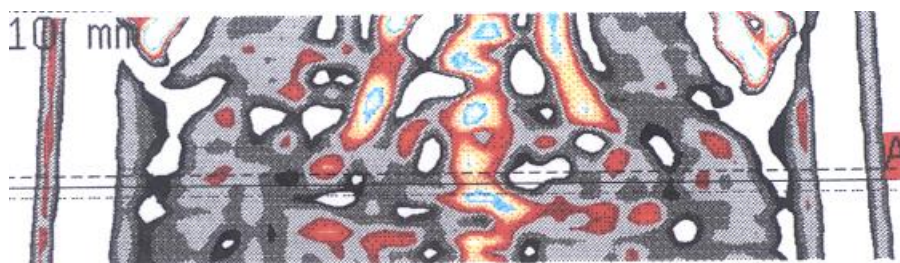


Abbildung 2. Messlinie bei der qCT-Auswertung im Bereich des Abdomens.

2.2.2 Serundiagnostik

Nachdem die Tiere in CO₂-Narkose enthauptet worden waren, wurde ihr Blut in einem Behältnis aufgefangen, um später eine Diagnostik ihrer Blutbestandteile durchführen zu können. Bei den Serumparametern stehen für diese Arbeit die CrossLaps und das Osteokalzin im Vordergrund. Die Bestimmung und Analyse der Parameter erfolgte mit dem Hitachi 902 automatic Analyzer (Boehringer, Mannheim). Bei der Serundiagnostik liegen keine Vergleichsdaten vor, da keine Tiere zur alleinigen Analyse des Serums vor der Ovakteromie mit anschließender Wirkstoffapplikation getötet wurden.

2.2.3 Statistische Methoden

Nachdem die Ergebnisse der qCT-Messungen auf den Computer übertragen wurden, wurde zur weiteren statistischen Auswertung das Computerprogramm PRISM® (GraphPadPrism 5.0, San Diego, USA) verwendet. Diese Auswertung beinhaltete das Erstellen von Graphen, sowie die weitere Berechnung statistischer Daten durch Moritz Pettenkofer und mich. Hierbei spielte die Varianzanalyse (ANOVA), also das erneute Messen eines Faktors, eine Rolle sowie der anschließende Vergleichstest nach Dunnett, bei dem die jeweiligen Gruppen immer mit der Kontrollgruppe verglichen wurden. Um die Mittelwerte der Kontrollgruppe mit den Werten einer anderen Gruppe präzise zu vergleichen, wurde ein ungepaarter T-Test herangezogen. Hierbei lag ein definiertes Signifikanzniveau von $P < 0,05$ vor. Bei Korrelationen wurden lineare Regressionsanalysen angewendet.

3. Ergebnisse

Der nachfolgende Abschnitt soll dazu dienen, die gesammelten Ergebnisse zu präsentieren. Die Ergebnisse beruhen hauptsächlich auf Knochenvolumen-mineraldichtemessungen, die mit dem qCT an ovx Sprague-Dawley-Ratten vorgenommen wurden. Ebenfalls Verwendung finden Serumwerte, die nach vierwöchiger Versuchsdauer und erfolgter Dekapitation untersucht wurden. Da kein Tier vor ovx zur alleinigen Bestimmung der Serumparameter getötet wurde, existieren keine Vergleichswerte zu Präovx. Im Zentrum dieser Arbeit stehen die Effekte der Wirkstoffe Ecdyson und E2 auf das Knochen- und Muskelgewebe.

3.1 Futteraufnahme und Körpergewicht

In der Abbildung 3 erkennt man die Entwicklung des durchschnittlichen Körpergewichts einer Ratte in ihrer Versuchsgruppe nach vierwöchiger Versuchsdauer. Zu Beginn des Versuches lag das mittlere Gewicht aller Tiere bei 254,1g. Am stärksten haben die Tiere der Ecdyson- und der Kontrollgruppe mit 332,7g und 327,9g zugenommen. Die intakten Tiere erreichten ein durchschnittliches Gewicht von 273,5g. Nur die Tiere der Östradiolgruppe konnten trotz regelmäßiger Nahrungsaufnahme ihr Körpergewicht nicht steigern. Verglichen mit dem Ausgangswert verloren sie sogar an Körpergewicht.

Der Effekt von ECD und E2 bei intakten und ovx S.D.-Ratten (4 Wochen per Futter) auf: BW-Entwicklung

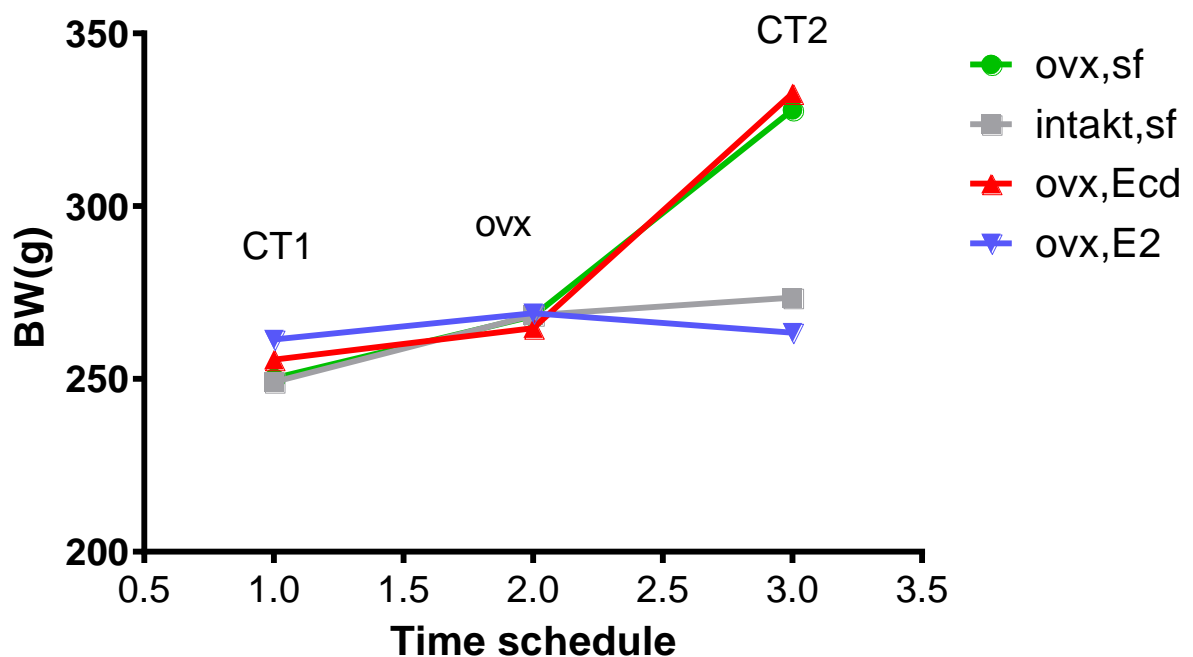


Abbildung 3. Die Entwicklung des durchschnittlichen Körpergewichts aller S.D.-Ratten in ihren jeweiligen Gruppen vor Versuchsbeginn und nach Versuchsende.

In Abbildung 4 ist die Futtermittelaufnahme in den einzelnen Gruppen dargestellt. Der Gewichtszuwachs der Tiere war nicht proportional zu der gefressenen Menge an Futter (g/Tier/Tag). Die Tiere der Ecdysongruppe haben am meisten gefressen und nahmen am stärksten an Körpergewicht zu. Die Tiere der Östradiolgruppe jedoch verloren trotz regelmäßiger Nahrungsaufnahme, die der Gruppe mit den intakten Tieren stark ähnelte, an Körpergewicht.

Futtermittelaufnahme

ovx,sf	intakt,sf	ovx,Ecd	ovx.E2
18.66	16.38	21.90	15.48

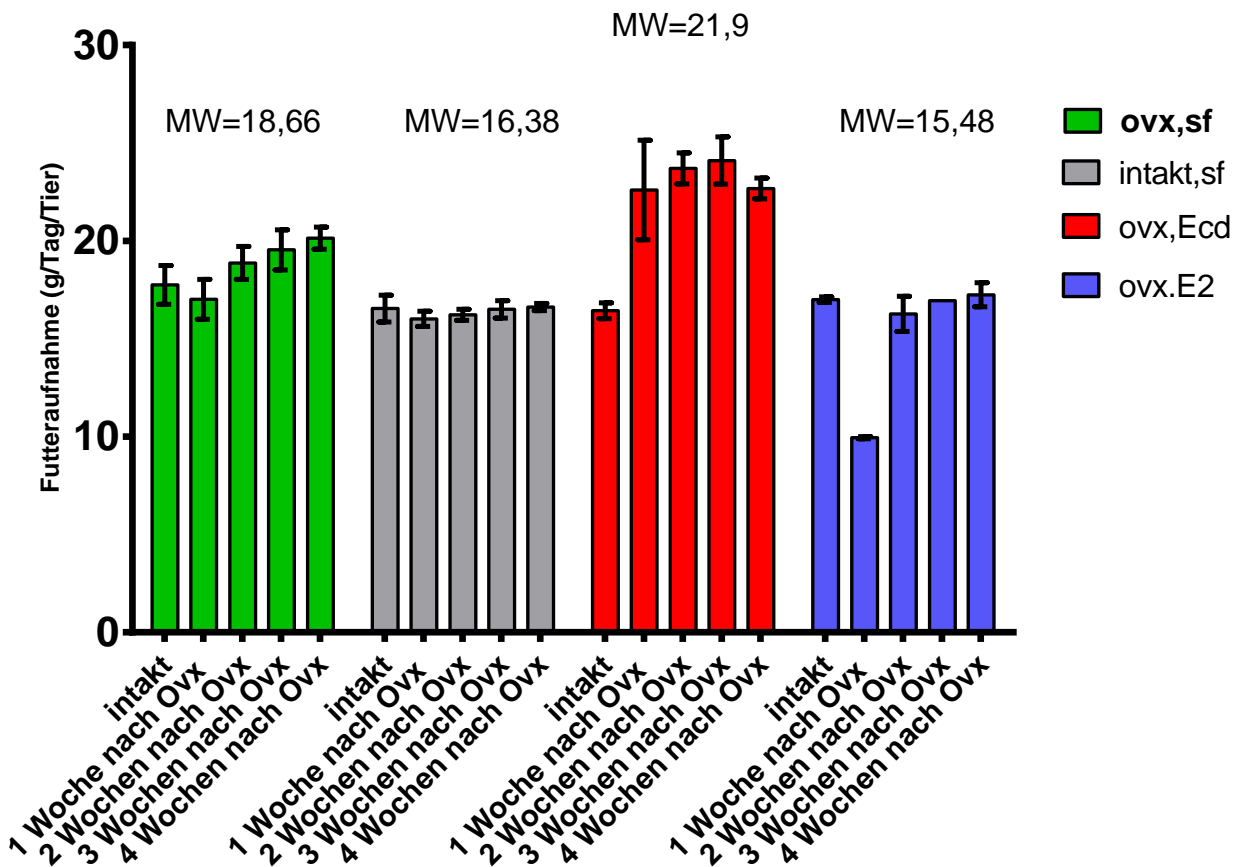


Abbildung 4. Die durchschnittliche Futtermittelaufnahme der S.D.-Ratten in ihren jeweiligen Gruppen über den Versuchszeitraum.

3.2 Muskulatur

Im folgenden Abschnitt stehen die Auswertungen der Muskelparameter im Fokus. Hierbei insbesondere die Größe des Muskels, dargestellt als Muskelfläche, und die Beschaffenheit als Muskeldichte, welche ausdrückt, wie viele Elastinfasern sich pro Fläche befinden.

3.2.1 Muskelfläche

Während des Versuches haben alle Tiere ihre Muskelfläche vermehrt. Hierbei gab es deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Wie man in Abbildung 5 sieht, konnten die Kontrollgruppe und die Ecdysongruppe den größten Zuwachs verbuchen. Der Zuwachs der intakten Tiere und der Östradiolgruppe war im Vergleich mit allen Tieren vor der Ovariectomie nicht signifikant.

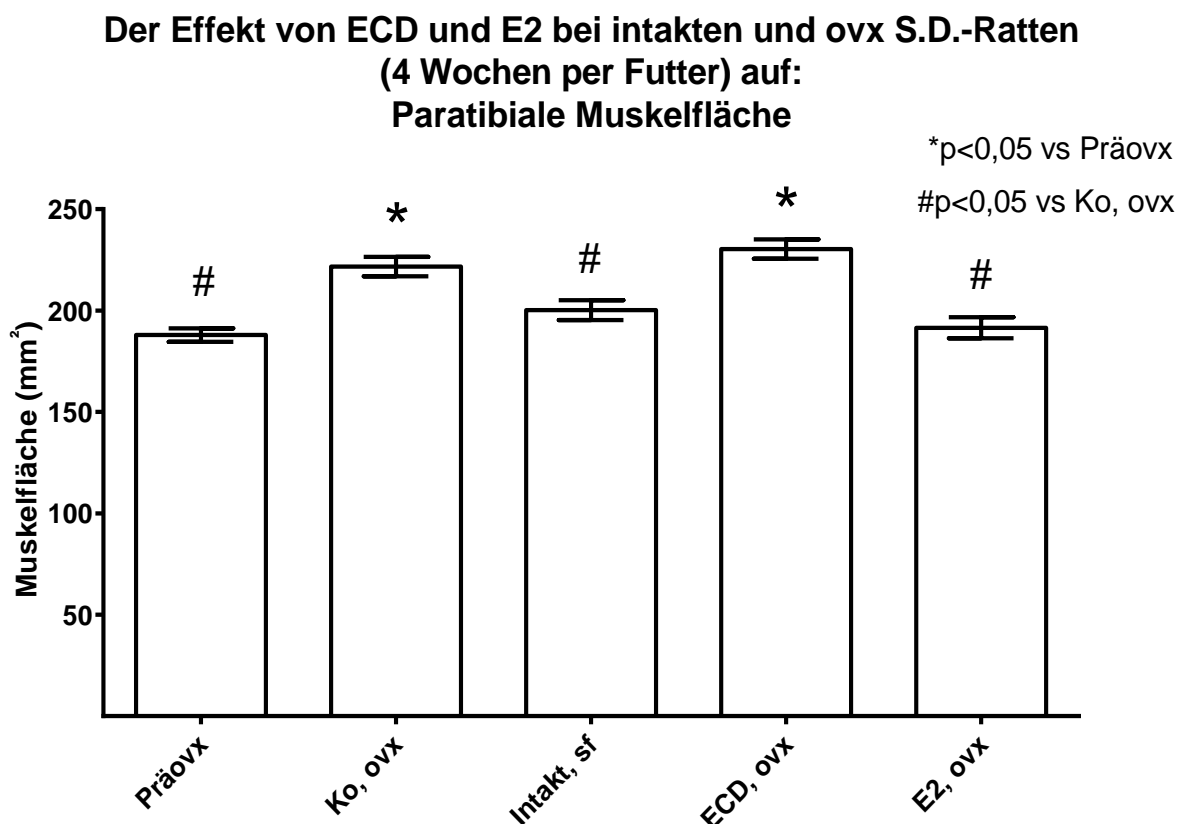


Abbildung 5. Die Muskelfläche der S.D.-Ratten gemessen in der tibialen Metaphyse. Die Muskelfläche hat in allen Gruppen zugenommen, jedoch sind die Unterschiede zu den Tieren vor der Ovariectomie nur in der Kontroll- und Ecdysongruppe signifikant.

3.2.2 Muskeldichte

Wie Abbildung 6 verdeutlicht, bestanden teils signifikante Unterschiede unter den verschiedenen Gruppen im Bereich der Muskeldichte. Die Gruppe mit den intakten Tieren wies hier die größte Muskeldichte mit $82,13 \text{ mg/cm}^3$ auf. Die Ecdysongruppe hatte mit $81,28 \text{ mg/cm}^3$ die geringste Dichte und war signifikant kleiner als die der Tiere vor der Ovariectomie. Abbildung 7 stellt die Korrelation des Körpergewichts mit der Muskelfläche aller Gruppen dar. Es besteht kein signifikanter linearer Zusammenhang.

Der Effekt von ECD und E2 bei intakten und ovx S.D.-Ratten (4 Wochen per Futter) auf: Paratibiale Muskeldichte

* $p < 0,05$ vs Präovx

$p < 0,05$ vs Ko, ovx

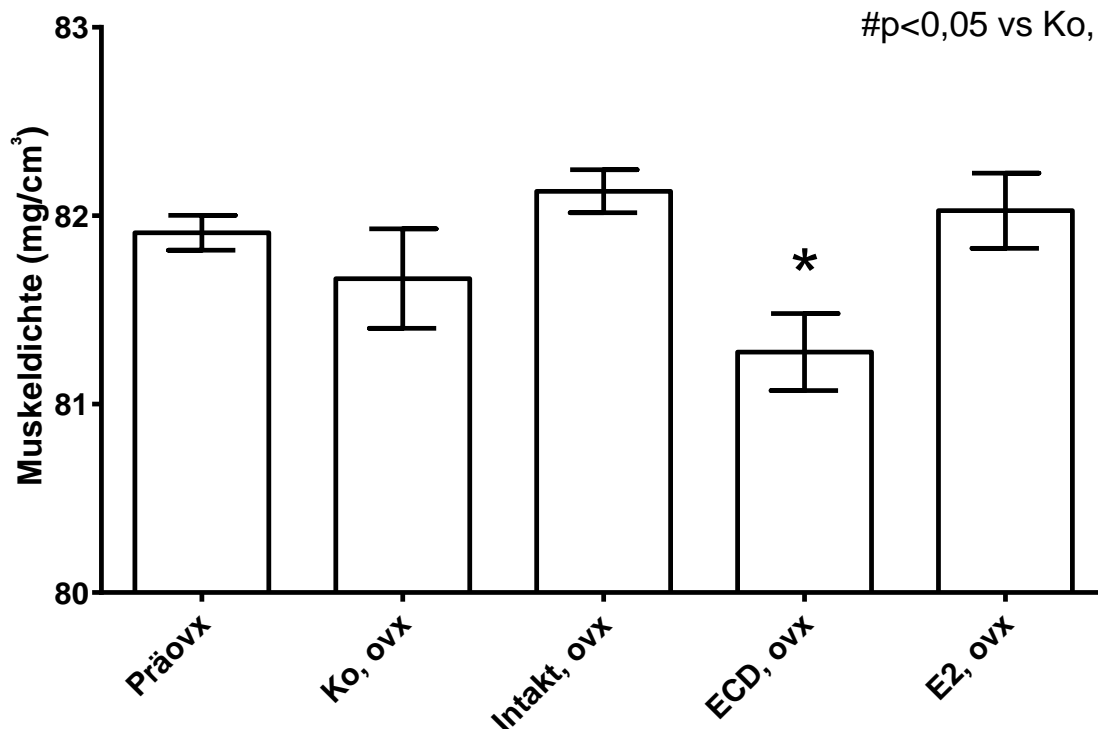


Abbildung 6. Die Muskeldichte der S.D.-Ratten gemessen in der tibialen Metaphyse. Die Tiere der Ecdysongruppe zeigen hier eine signifikant kleinere Dichte als der Durchschnitt aller Tiere vor der Ovariectomie.

Korrelation Körpergewicht und Muskelfläche in der Metaphyse der Tibia

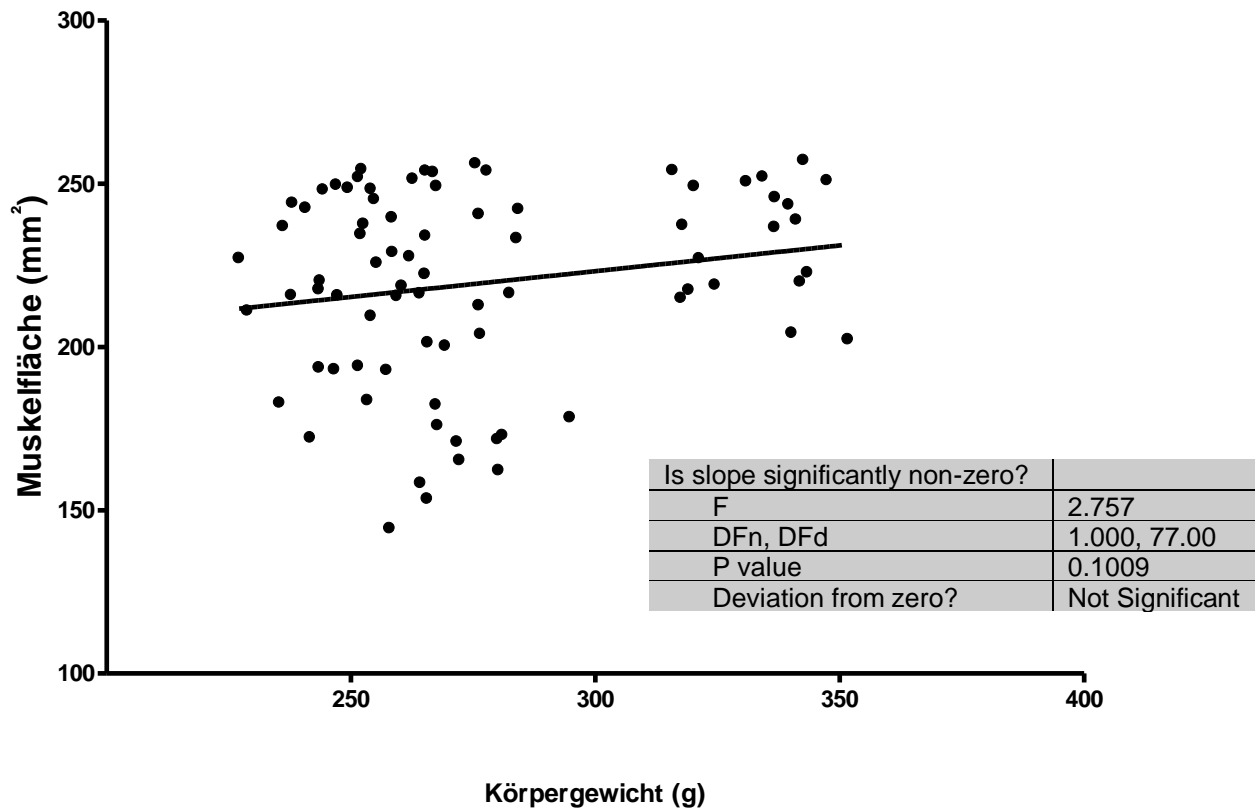


Abbildung 7. Korrelation des Körpergewichts mit der Muskelfläche aller S.D.-Ratten in der Metaphyse der Tibia nach vierwöchiger Gabe der Wirkstoffe. Es besteht kein signifikanter linearer Zusammenhang.

3.3 Knochengewebe

3.3.1 Endosteale Dichte

Bis auf die Gruppe mit den intakten Tieren hat die endosteale Dichte in allen Gruppen nach dem vierwöchigen Versuchsablauf abgenommen. In der Kontrollgruppe sank die Dichte sogar um 32%. Obwohl der Verlust der Ecdysongruppe deutlich geringer war als in der Kontrollgruppe, sank er dennoch so

stark ab, dass der Unterschied sowohl zu Präovx als auch zur Kontrollgruppe signifikant war. Die Östradiolgruppe hat ebenfalls einen Dichteverlust zu verzeichnen. Dieser fällt etwas weniger aus, zeigt jedoch trotzdem Signifikanzniveau gegenüber Präovx und der Kontrollgruppe.

**Der Effekt von ECD und E2 bei intakten und ovx S.D.-Ratten
(4 Wochen per Futter) auf:
Endosteale Dichte in der Metaphyse der Tibia**

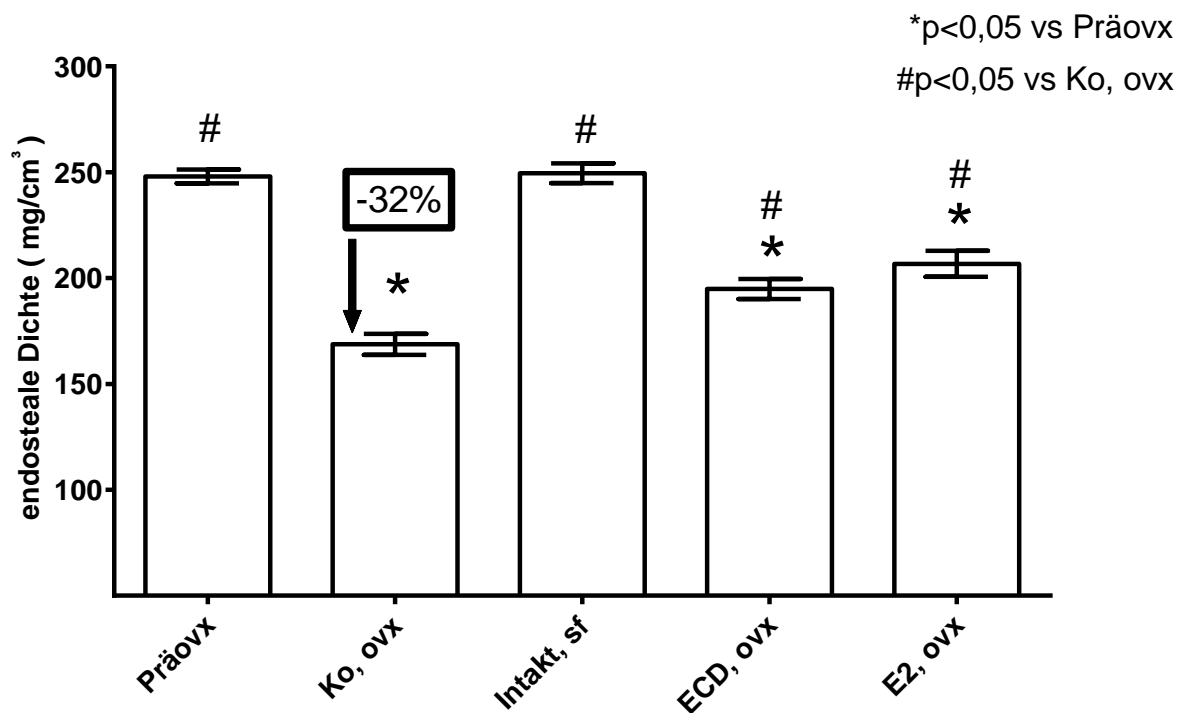


Abbildung 8. Die endosteale Dichte in der tibialen Metaphyse der S.D.-Ratten. Bis auf die intakten Tiere ist in allen anderen Gruppen ein Dichteverlust zu erkennen. Bei der Kontrollgruppe ist er besonders deutlich und beträgt 32%.

3.3.2 Endosteale Fläche

Die endosteale Fläche ist in der Kontrollgruppe und der Ecdysongruppe signifikant gestiegen. Bei den intakten Tieren und der Östradiolgruppe finden sich signifikant niedrigere Werte als bei der Kontrollgruppe.

Der Effekt von ECD und E2 bei intakten und ovx S.D.-Ratten (4 Wochen per Futter) auf: Endosteale Fläche in der Metaphyse der Tibia

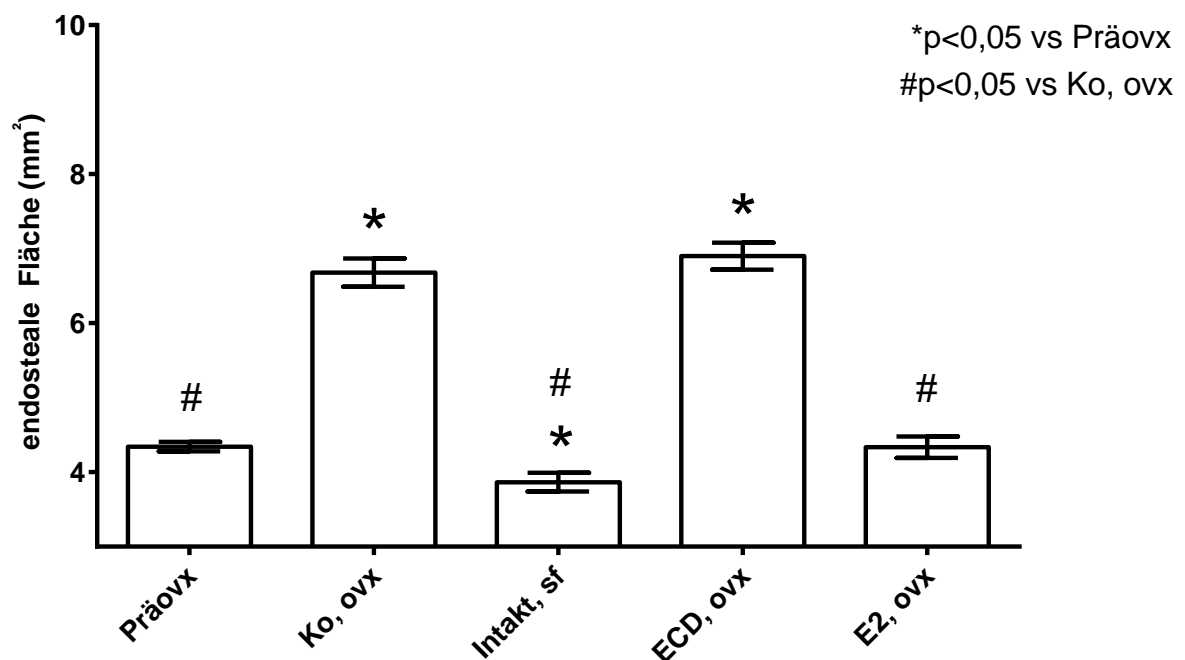


Abbildung 9. Die endosteale Fläche in der Metaphyse der Tibia der S.D.-Ratten. Die Fläche nimmt bei der Kontroll- und Ecdysongruppe signifikant zu und fällt bei den intakten Tieren und der Östradiolgruppe signifikant.

3.3.3 Kortikale Dichte

Die kortikale Dichte hat in allen Gruppen im Laufe des Versuches zugenommen und signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Tieren vor der Ovariectomie erzielt. Die Östradiolgruppe hat so deutlich zugenommen, dass sie auch einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe erreicht hat.

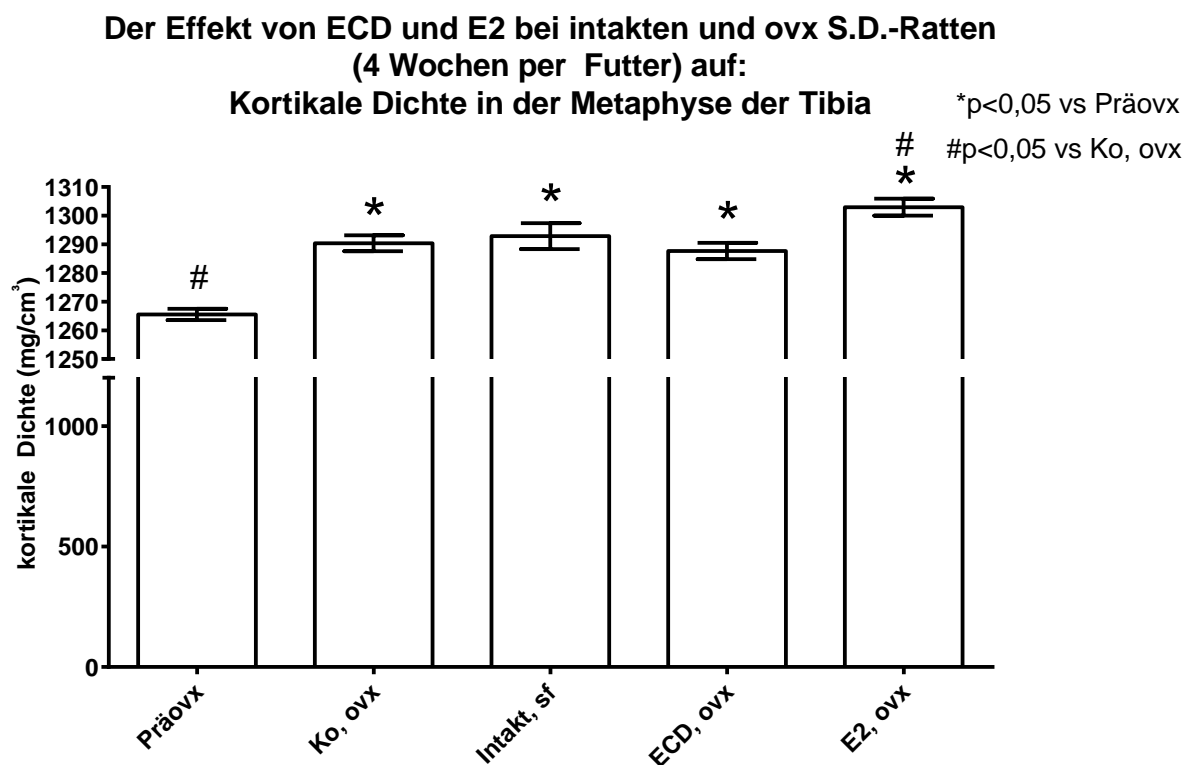


Abbildung 10. Die kortikale Dichte in der Metaphyse der Tibia bei S.D.-Ratten. Bei allen Tieren nahm die Dichte nach Ovariectomie signifikant zu. Die Östradiolgruppe nahm so stark zu, dass sie sich auch signifikant von der Kontrollgruppe unterschied.

3.3.4 Kortikale Fläche

Die kortikale Fläche in der Metaphyse der Tibia hat sich bei allen Gruppen im Laufe des Versuchsablaufs vergrößert. Die Vermehrung der Fläche war bei allen signifikant. Die Kontrollgruppe hatte hierbei den größten Zuwachs. Die intakten Tiere und die Östradiolgruppe hatten im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine signifikant geringere Zunahme.

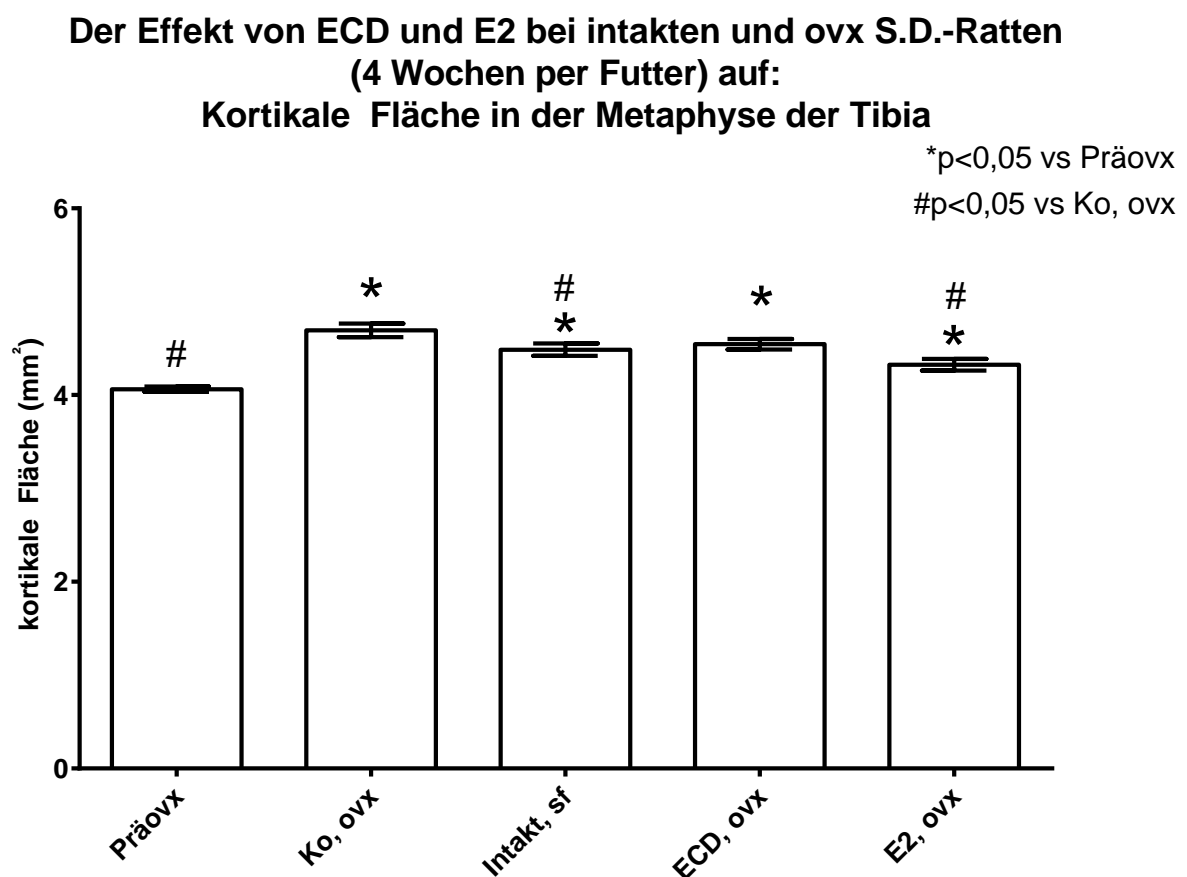


Abbildung 11. Die kortikale Fläche in der Metaphyse der Tibia bei S.D.-Ratten. Bei allen Tieren nahm die Fläche nach Ovariectomie signifikant zu. Die Östradiolgruppe und die Gruppe mit den intakten Tieren nahmen etwas geringer zu und unterschieden sich signifikant von der Kontrollgruppe.

3.3.5 Endosteale Zirkumferenz

Die endosteale Zirkumferenz ist über den Versuchszeitraum bei der Ecdysongruppe signifikant gestiegen. Bei der Östradiolgruppe nahm der Umfang nach der Applikation im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ab. Dies veranschaulicht Abbildung 12.

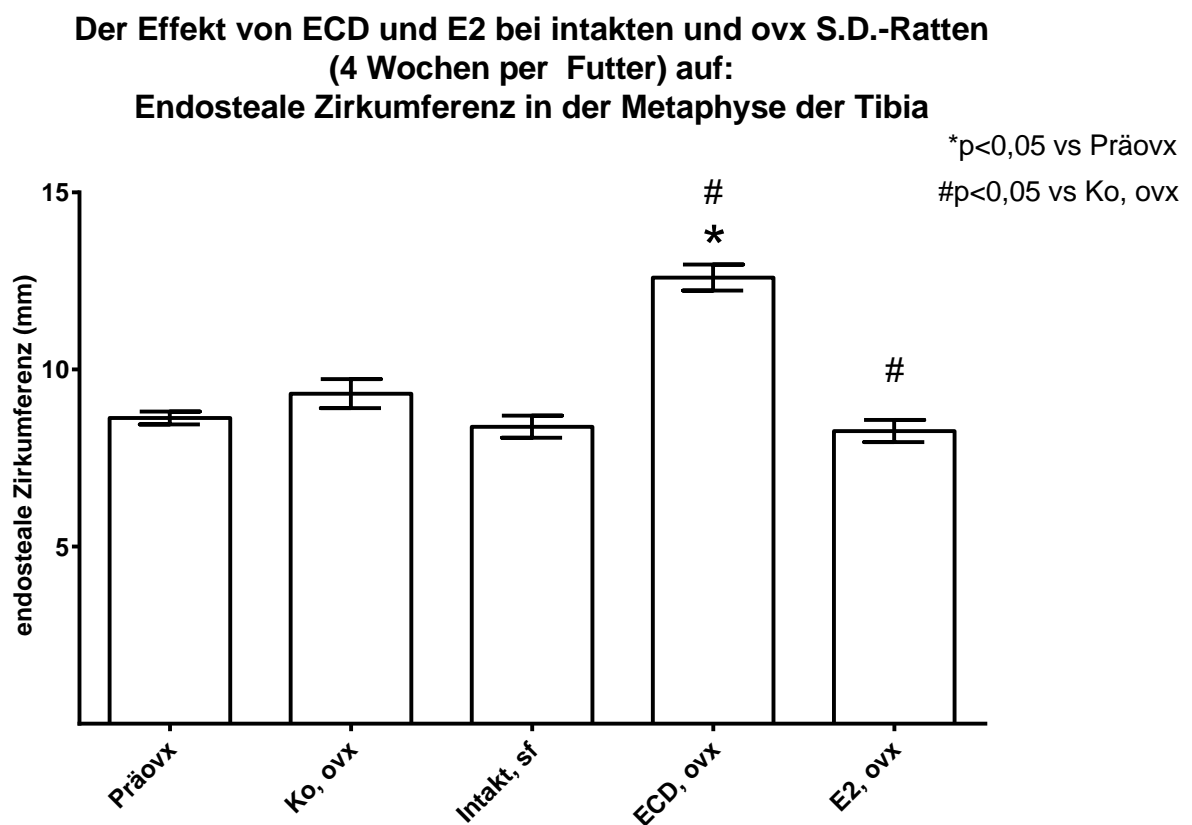


Abbildung 12. Die endosteale Zirkumferenz in der Metaphyse der Tibia der S.D.-Ratten. Der Umfang vergrößerte sich in der Ecdysongruppe signifikant. Östradiol bewirkte eine signifikante Abnahme im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

3.3.6 Periosteale Zirkumferenz

Der Umfang des Periosteums erreichte in der Ecdyson- und Kontrollgruppe einen signifikanten Zuwachs. Die Tiere vor der Ovariectomie und die Östradiolgruppe unterschieden sich signifikant von der Kontrollgruppe.

Der Effekt von ECD und E2 bei intakten und ovx S.D.-Ratten (4 Wochen per Futter) auf: Periosteale Zirkumferenz in der Metaphyse der Tibia

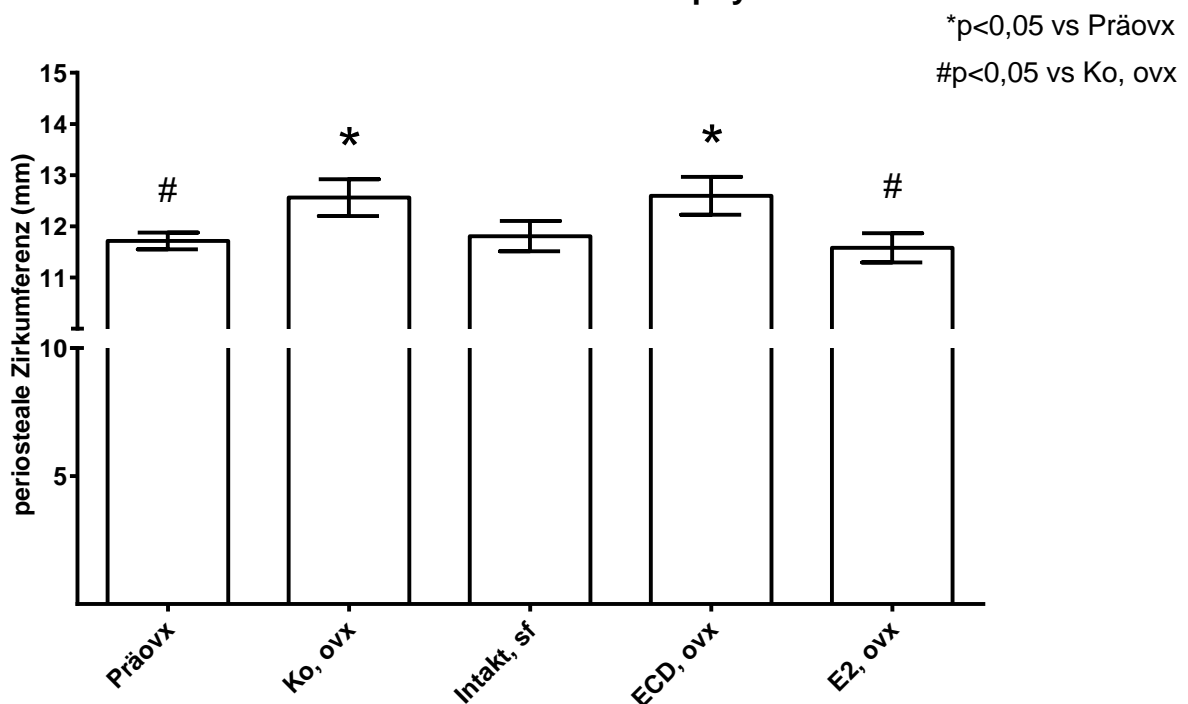


Abbildung 13. Die periosteale Zirkumferenz in der Metaphyse der Tibia der S.D.-Ratten. Die Werte der Kontroll- und Ecdysongruppe erreichten Signifikanzniveau. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe wiesen die Tiere vor der Ovariectomie und die Tiere der Östradiolgruppe signifikant niedrigere Werte auf.

3.4 Serumparameter

Bei den Serumparametern sollen vor allem das Osteokalzin und die CrossLaps Beachtung finden.

3.4.1 Serum-Osteokalzin

Beim Serum-Osteokalzin gab es signifikante Unterschiede in den einzelnen Gruppen. So waren die Werte der intakten Tiere und der Östradiolgruppe signifikant niedriger als die der Kontrolltiere. Die Tiere der Ecdysongruppe waren mit ihren Werten auf dem Niveau der Tiere der Kontrollgruppe.

Der Effekt von ECD und E2 bei intakten und ovx S.D.-Ratten (4 Wochen per Futter) auf: Serum-Osteokalzin

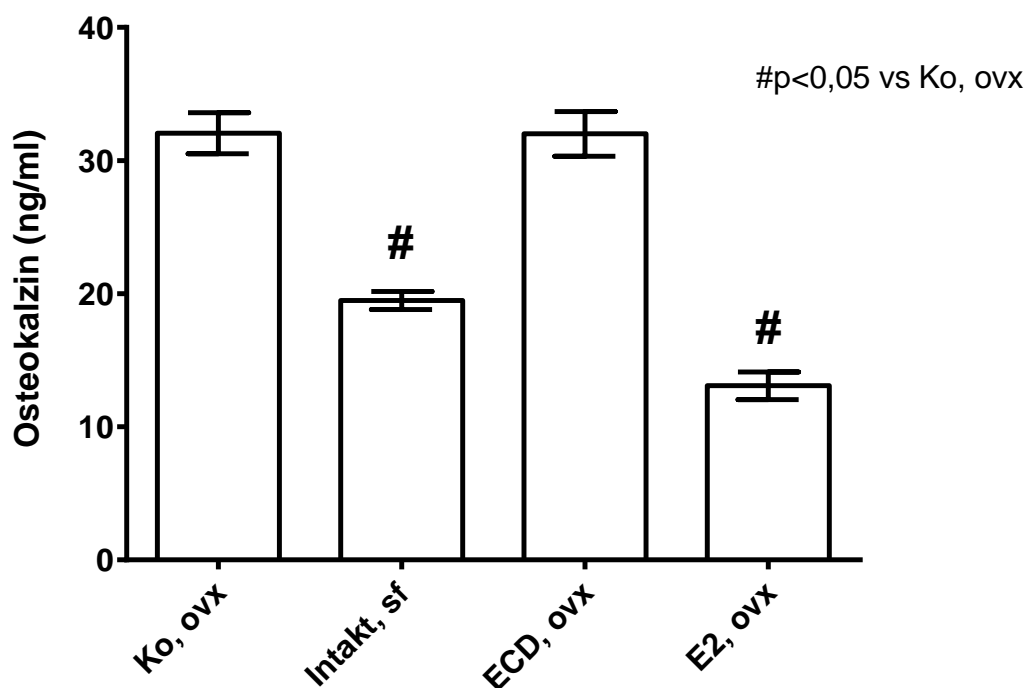


Abbildung 14. Serum-Osteokalzin nach dem vierwöchigen Versuchsablauf. Die Gruppe der intakten Tiere und die Östradiolgruppe weisen signifikant niedrigere Werte auf als die der Kontrollgruppe.

3.4.2 Serum-CrossLaps

Die vierwöchige Verabreichung der Wirkstoffe bewirkte bei den intakten Tieren und der Östradiolgruppe eine signifikant niedrigere Konzentration der Serum- CrossLaps als bei den Kontrolltieren und denen der Ecdysongruppe. Deren Konzentrationen waren nahezu identisch. Führt man eine Korrelation mit den Werten der endostealen Fläche aller Gruppen mit den Werten der Serum-CrossLaps durch, zeigt sich keine signifikante Regressionsgerade. Dies veranschaulicht Abbildung 16.

Der Effekt von ECD und E2 bei intakten und ovx S.D.-Ratten (4 Wochen per Futter) auf: Serum-CrossLaps

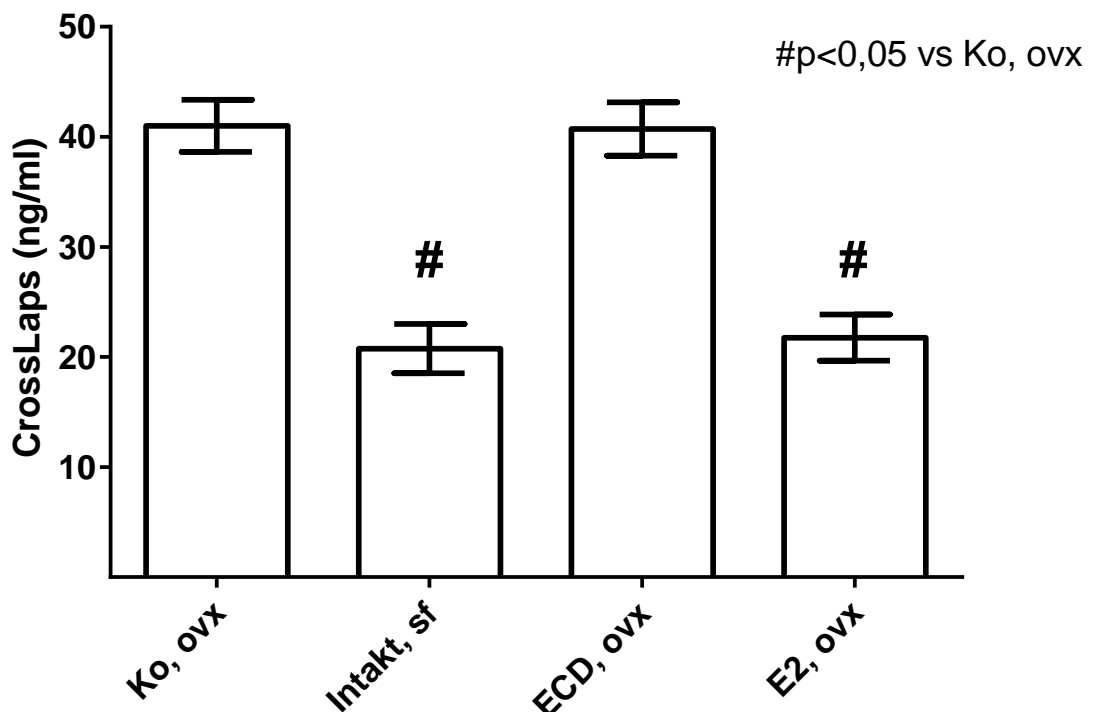
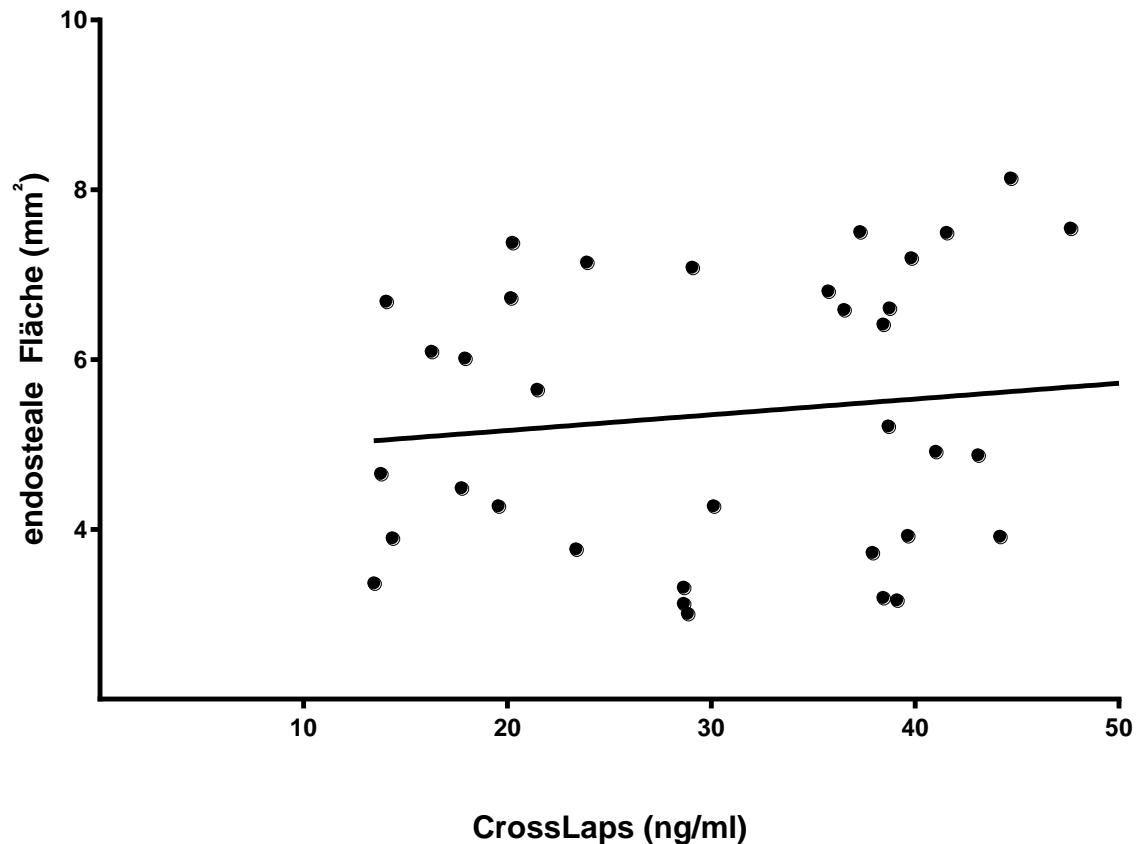


Abbildung 15. Serum-CrossLaps nach dem vierwöchigen Versuchsablauf. Die Gruppe der intakten Tiere und die Östradiolgruppe weisen signifikant niedrigere Werte auf als die der Kontroll- und Ecdysongruppe.

Korrelation endosteale Fläche und Serum-CrossLaps in der Metaphyse der Tibia



Is slope significantly non-zero?	
F	0.7078
DFn, DFd	1.000, 35.00
P value	0.4059
Deviation from zero?	Not Significant

Abbildung 16. Korrelation der endostealen Fläche in der Metaphyse der Tibia aller S.D.-Ratten mit Serum-CrossLaps nach vierwöchiger Gabe der Wirkstoffe. Es besteht kein signifikanter linearer Zusammenhang.

4. Diskussion

Die Experimente, die dieser Arbeit zugrunde liegen, beschäftigen sich mit den Effekten von Ecd und E2 auf das Knochen- und Muskelgewebe. Die Ergebnisse, die mittels qCT-Messung und Serumanalyse gewonnen wurden, sind das Resultat eines vierwöchigen Versuches mit ovariectomierten Versuchstieren. Die Wirkstoffe wurden den Tieren (n=40) per Futter verabreicht und deren Wirkung nach statistischer Analyse jeweils mit der Kontrollgruppe verglichen.

4.1 Analyse von Futteraufnahme und Körpergewicht

Vor Beginn des Versuches wurden die Tiere so in ihre Gruppen aufgeteilt, dass jede Gruppe ein ähnliches mittleres Körpergewicht aufwies. Dieser Wert lag präovx durchschnittlich bei 254,1 g und dient als Referenz. Die Tiere der Ecd-Gruppe fraßen mit 21,9 g/Tier/Tag am meisten und nahmen übereinstimmend hierzu mit 26,7% am meisten Gewicht zu. Die Kontrollgruppe zeigte ein etwas geringeres Fressverhalten (18,66 g/Tier/Tag) und steigerte ihr Körpergewicht um 23,5%. Im Vergleich zur Ecd-Gruppe war dieser Unterschied nicht signifikant und bestätigte die Ergebnisse eines vorangegangenen zwölfwöchigen Versuches der Abteilung (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b). Trotz einer ähnlichen Körpergewichtszunahme beider Gruppen liegt diese jeweils in einer anderen Kausalität. Während die Tiere der Kontrollgruppe ihr Körpergewicht vor allem durch eine vermehrte Fettanreicherung erhöhten (Seidlová-Wuttke et al. 2011), erfolgte der Zuwachs bei den Tieren der Ecd-Gruppe zu einem großen Teil durch ein gesteigertes Muskelwachstum mit geringerer Fettanreicherung (Dinan und Lafont 2006; Gorelick-Feldman et al. 2008; Seidlová-Wuttke et al. 2010b). Dies unterstreicht die Tatsache, dass die Tiere der Ecd-Gruppe mehr Futter

aufgenommen haben als die Tiere der Kontrollgruppe, jedoch mehr verbraucht haben müssen, da sie ein ähnliches Endgewicht erzielt haben. Der Grund für den größeren Verbrauch der Ecd-Gruppe liegt in einer gesteigerten Bewegung. Die Tiere der E2-Gruppe nahmen täglich eine Futtermenge (15,48 g/Tier/Tag) zu sich, die der Menge der intakten Tiere (16,38 g/Tier/Tag) stark ähnelte. Trotz dieses ähnlichen Konsums kam es bei den Tieren der E2-Gruppe zu einem geringen Gewichtsverlust von -2,2%, während die intakten Tiere ihr Gewicht zumindest um 9,6% steigern konnten. Auch diese Ergebnisse konnten bereits in einer zwölfwöchigen Untersuchung der Abteilung erzielt werden und wurden hier bereits nach vier Wochen bekräftigt (Seidlová-Wuttke et al. 2010b). Dieser Gewichtsverlust trotz des ähnlichen Fressverhaltens liegt begründet in einer durch E2 induzierten erhöhten lokomotorischen Aktivität, die zu einer Abnahme des Fettdepots geführt hat. Eine Gewichtssteigerung durch Muskelzuwachs konnte unter E2 nicht nachgewiesen werden (Seidlová-Wuttke et al. 2010b).

4.2 Analyse des Muskelgewebes mit qCT

Im folgenden Abschnitt folgt die Auseinandersetzung mit der Fragestellung Nr. 3 (siehe Zielsetzung).

4.2.1 Muskelfläche

Alle Tiere haben während des vierwöchigen Versuches ihre Muskelfläche vergrößert. Im Vergleich zu Präovx war der Zuwachs jedoch nur bei der Kontroll- und Ecd-Gruppe signifikant. Dieser Zuwachs war jedoch so deutlich, dass nun sogar ein

signifikanter Unterschied zwischen den Tieren der Kontroll- und Ecd-Gruppe und den intakten Tieren und den Tieren der E2-Gruppe bestand. Dies lässt vermuten, dass es sich nicht nur um eine Steigerung handelt, die man mit dem Größenwachstum der Tiere begründen kann. Da die Tiere der Ecd-Gruppe, also jene mit der geringsten Muskeldichte, nun die größte Muskelfläche aufweisen, scheint, wie oben beschrieben, die Größenzunahme der Fläche auch mit Fettgewebs- oder Flüssigkeitseinlagerungen im Bereich der Muskulatur in Verbindung zu stehen. Bei den Tieren der Kontrollgruppe verhielt es sich ähnlich, auch wenn deren muskuläre Dichte nicht ganz so gering war. Diese Annahme wird bestätigt in einer Korrelation zwischen der Muskelfläche und dem Körpergewicht der Tiere. Hier besteht kein linearer Zusammenhang über die Versuchsdauer von vier Wochen. Die Tiere mit der geringsten Muskelfläche besitzen auch das geringste Körpergewicht. Umgekehrt sind die Tiere der Ecd- und Kontrollgruppe die schwersten und verfügen über die größte Muskelfläche. Dennoch besteht kein Zusammenhang, was die Bedeutung der Muskeldichte veranschaulicht. Die Tiere mit der größten Muskelfläche wiesen die geringste Muskeldichte auf. Wie oben beschrieben, kann hierfür eine vermehrte Durchblutung des Gewebes, eine Verwässerung oder Fettgewebs- einlagerungen der Muskulatur ursächlich sein, die im qCT eine geringere Dichte aufweisen. Die genaue Ursache hierfür kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden. In einem Versuch dieser Abteilung über einen Zeitraum von 3 Monaten wurde ebenfalls die Muskelfläche gemessen. Es zeigte sich eine deutlich größere Zunahme der Muskelfläche der Tiere der Ecd-Gruppe im Vergleich zu den ovariectomierten Kontrolltieren (Seidlová-Wuttke et al. 2010b). Dies lässt die Vermutung zu, dass ein länger angesetzter Versuch prägnantere Ergebnisse bezüglich der Muskelfläche liefern könnte.

4.2.2 Muskeldichte

Die verschiedenen Gruppen zeigen keine homogene Entwicklung bezüglich der Muskeldichte. Die intakten Tiere und die Tiere der E2-Gruppe konnten ihre Muskeldichte im Vergleich zu präovx steigern. Die Tiere der Kontroll- und Ecd-Gruppe verloren sogar Muskeldichte. Es bestanden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen nach Beendigung der Versuche. Als Gründe für diesen signifikanten Schwund der Dichte scheint eine Verwässerung oder Steigerung der Durchblutung des Gewebes ursächlich zu sein. Ebenfalls kann es sich um eine vermehrte Fettgewebseinlagerung handeln. All diese Strukturen weisen im qCT eine geringere Dichte auf als die Elastinfasern des Muskelgewebes. So ließe sich eine Abnahme der Muskeldichte erklären. Eine Zunahme des Organ- und Körpergewichts, sowie der Muskulatur nach ovx konnte bereits mehrfach dargelegt werden (Fisher et al. 2000; McClung et al. 2006; Moran et al. 2007). Ursächlich hierfür scheint eine Hochregulation von GH und IGF-1 (Fisher et al. 2000). Bereits hier wurde jedoch der Muskelzuwachs auf eine Flüssigkeitsansammlung extrazellulär in der Muskulatur zurückgeführt und nicht etwa durch eine Steigerung der Proteinbiosynthese (McClung et al. 2006; Moran et al. 2007). Zusätzlich wurde eine Abnahme der Ca^{2+} -Konzentration bis zu 30% nach ovx festgestellt, die mit einer abgeschwächten Muskelkontraktilität einhergeht (Moran et al. 2007). Möglicherweise ist das Wachstum der Muskulatur der Ecd-Gruppe die Summation beider Effekte (Flüssigkeitsansammlungen und Steigerung der Proteinbiosynthese), da bereits mehrfach der anabole Effekt des Ecd beschrieben wurde (Dinan und Lafont 2006). Dies veranschaulichte eine Studie, in der die Versuchstiere nach Ecd-Gabe ihre Ausdauer beim Laufen und Schwimmen signifikant ausbauten (Azizov und Seifulla 1998; Lafont und Dinan 2003). Zudem wurde der anabole Charakter des Ecds selbst

ohne stimulierendes Training beschrieben (Syrov 1984; Lafont und Dinan 2003). Die Auswirkungen des Östrogenmangels auf die Muskulatur hinsichtlich der Abnahme der Muskeldichte und Kraftverlust wurden in anderen Studien bereits dokumentiert (Moreira et al. 2005). Der wachstumshemmende Effekt des E2 bei ovx-Ratten bezüglich der Körpergröße, des Gewichts und der Muskelmasse (Kobori und Yamamuro 1989; Moran et al. 2007; Suzuki und Yamamuro 1985; Tsai et al. 2007) konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Tiere der E2-Gruppe wiesen sowohl das geringste Körpergewicht als auch die niedrigste Muskelfläche auf. Konträr dazu wird bei Zuchttieren in der Landwirtschaft durch E2-Gabe eine eher anabole Wirkung erzielt (Fisher et al. 1998, 2000; Tsai et al. 2007). Eine Erklärung für die Steigerung der Muskeldichte der Tiere der E2-Gruppe könnte eine erhöhte lokomotorische Aktivität im Sinne eines Krafttrainings sein. Dass die Tiere, die das größte Körpergewicht hatten, über die niedrigste Muskeldichte verfügten, würde die Annahme, dass es zu einer Fettgewebsanreicherung der Muskulatur kam, bekräftigen. Es bleibt offen, ob nicht bei einer längeren Versuchsdauer prägnantere Ergebnisse sichtbar geworden wären. Ebenfalls wäre hier interessant zu beobachten, ob sich das große Körpergewicht der Ecd-Gruppe als zusätzlicher Stimulus im Muskeltraining erwiesen hätte.

4.3 Analyse des Knochengewebes mit qCT

Im folgenden Abschnitt folgt die Auseinandersetzung mit der Fragestellung Nr. 1 (siehe Zielsetzung).

4.3.1 Endosteale Dichte

Bis auf die intakten Tiere zeigten alle Gruppen im Vergleich zu präovx einen signifikanten Dichteverlust. Verglichen mit den Tieren präovx nahm die Dichte der Tiere der Kontrollgruppe um 32% ab. Diese Werte decken sich mit vorherigen Untersuchungen dieser Abteilung. Dort wurden nach vergleichbaren Zeiträumen sogar größere Dichteverluste gemessen. Bei einem länger ausgelegten Versuch zeigten sich nach drei Monaten Verluste im Bereich der endostealen Dichte von mehr als 50% (Seidlová-Wuttke et al. 2003; Seidlová-Wuttke et al. 2010a). Bei kürzerer Versuchsdauer fiel der Dichteverlust dementsprechend etwas geringer aus. Dies legt die Erkenntnis nahe, dass der durch den Östrogenmangel verursachte Dichteverlust sich nach einiger Zeit auf einem konstanten Niveau bewegt. Die endosteale Dichte stellt die Masse der trabekulären Strukturen dar. Bei dem Dichteverlust handelt es sich um eine Rarifizierung, also eine Abnahme, der trabekulären Strukturen. Da es bei der postmenopausalen Osteoporose vor allem zu einem Verlust trabekulärer Strukturen kommt, ist die endosteale Dichte von besonderer Bedeutung. Dies betrifft vor allem die funktionelle Knochenstabilität und eine damit einhergehende Bruch- und Tragfestigkeit. Denn je größer der Verlust der Knochenmineraldichte, desto mehr steigt das Risiko von Frakturen (Seeman 2002). Dieser Knochenschwund ist begründet durch eine Verschiebung der Balance des Knochenstoffwechsels aufgrund des postmenopausalen Östrogenmangels (Bord et al. 2003; Ivey und

Baylink 1981). Des Weiteren ist die Entwicklung von Osteoblasten, Adipozyten, Chondroblasten, Fibroblasten und Myoblasten aus adulten mesenchymalen Stammzellen verschoben. Unter vermehrter Aktivierung des Rezeptors PPAR γ 2 präferieren die Stammzellen nun die Entwicklung zu Adipozyten (Rodríguez et al. 2000). Dies führt zu erhöhter Bildung von Fettzellen im Knochenmark, welche den Knochen direkt beeinträchtigt (Justesen et al. 2001; Verma et al. 2002). Zusätzlich ist der Anstieg des viszeralen Körperfetts durch den Östrogenmangel von Bedeutung (Rachon et al. 2008; Babaei et al. 2010). Das viszerale Fett wirkt als endokrine Drüse und aufgrund der Fettleibigkeit wird die Adipokinproduktion der Adipozyten gesteigert (Fontana et al. 2007). TNF- α und IL-6 gehören zu den Adipokinen, die nun zu einem entzündlichen Milieu beitragen. Sie regen die Aktivität der Osteoklasten an (Hofbauer und Schoppet 2010; Russel et al. 2010; Cao 2011). Zusätzlich steigern sie die RANKL-Produktion und hemmen die OPG-Synthese, was einen weiteren Impuls in der Aktivierung der Osteoklasten darstellt (Luo et al. 2006). So verschiebt sich das Gleichgewicht des Knochenstoffwechsels Richtung vermehrter Knochenabbau. Die Auswirkungen des Fettgewebes auf den Knochen und den Knochenstoffwechsel kann man als lipotoxisch beschreiben (Duque 2008). In dem vorliegenden Versuch war der Dichteverlust gegenüber der Kontrollgruppe sowohl der E2-Gruppe als auch der Ecd-Gruppe signifikant geringer. Dies steht im Zusammenhang mit den Effekten der Wirkstoffe, welche die Rarifizierung der Trabekel in einem gewissen Grad verringern können. Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer Studien. In einer Untersuchung dieser Abteilung wurde die Dichte der Trabekel nach einem Versuchszeitraum von drei Monaten unter Ecd-Applikation mittels qCT bestimmt. Auch hier zeigte Ecd, dass es in der Lage ist, den Verlust an trabekulären Strukturen zu vermindern und eine antiosteoporotische Wirkweise besitzt (Seidlová-Wuttke et al. 2010a). Der Verlust von trabekulären Strukturen war in der E2-Gruppe am

geringsten. Dieses Ergebnis bestätigt vorangegangene Studien und verdeutlicht, dass solch postmenopausale Knochenveränderungen durch Östrogensubstitution vermindert und antiosteoporotische Effekte erzielt werden können (Turner et al. 1994). Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass durch die Wirkstoffe E2 und ECD sowohl die lipotoxische Wirkung als auch eine Beeinträchtigung der Knochenstabilität vermindert werden können.

4.3.2 Endosteale Fläche

Die endosteale Fläche hat bei der Kontrollgruppe und den Tieren der Ecd-Gruppe nach vierwöchigem Versuchsablauf im Vergleich zu präovx signifikant zugenommen. Die E2-Gruppe verzeichnete im Vergleich zu präovx relativ konstante Werte und konnte so einen signifikant geringeren Zuwachs der Fläche als die Kontrollgruppe verzeichnen. Die intakten Tiere büßten sogar im Vergleich mit den Tieren vor der Ovariectomie Fläche ein. Da die Tiere mit der geringsten endostealen Dichte nun auch die größte endosteale Fläche aufweisen, kann die Expansion der endostealen Fläche als Kompensationsmechanismus für den Dichteverlust verstanden werden (Parfitt 1984, Khosla et al. 2008). Dass es bei den intakten Tieren nicht zu solch einer Zunahme gekommen ist, bekräftigt diese Annahme (Seidlová-Wuttke et al. 2008). Ecd vermochte es nicht, die Zunahme der endostealen Fläche einzubremsen. Die Tiere der E2-Gruppe wiesen jedoch ähnliche Werte, wie die intakten Tiere und die Tiere präovx auf. Dieser Effekt des E2 bestätigt die Ergebnisse vorangegangener Studien dieser Abteilung (Moysich 2012).

4.3.3 Kortikale Dichte

Der Dichteverlust der postmenopausalen Osteoporose betrifft vor allem den trabekulären Knochen (Riggs und Melton 1986). Untersuchungen haben gezeigt, dass bei einem länger anhaltenden manifesten Östrogenmangel, im Sinne einer senilen beziehungsweise low-turnover Osteoporose, es ebenfalls zu einem Dichteverlust kortikaler Strukturen kommt (Han et al. 1996; Seeman 2002). In der vorliegenden Arbeit hat die Dichte der Kortikalis in allen Gruppen nach ovx signifikant zugenommen. Es kam aber nicht zu einem statistisch relevanten Unterschied zwischen ovx-Tieren und den intakten Tieren. Die Tiere der E2-Gruppe verzeichneten sogar einen signifikanten Zuwachs im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies kann als Reaktion des Gewebes verstanden werden, um den Verlust des trabekulären Gewebes entgegenzuwirken und diesen zu kompensieren. Da die kortikale Dichte jedoch in allen Gruppen angestiegen ist, lässt sich nicht eindeutig eine osteoprotektive Wirkung den eingesetzten Substanzen zuordnen. Dies bestätigt frühere Studien, die erst 90-120 Tage nach OvX Veränderungen an der Kortikalis messen konnten (Jee und Yao 2001), was die Frage aufwirft, wie sich die kortikale Dichte bei einem länger ausgelegten Versuchszeitraum entwickelt hätte. Dennoch scheint die Testsubstanz Ecd, ähnlich wie E2, eine stabilisierende Wirkung auf die Kortikalis des Knochens zu besitzen. Diese stabilisierende und osteoprotektive Wirkung konnte bereits in mehreren Studien belegt werden (Walliser 2009; Coors 2010; Sunder-Plassmann 2013; Seidlová-Wuttke et al. 2010a; Kapur et al. 2010).

4.3.4 Kortikale Fläche

Nach Ablauf des vierwöchigen Versuches hat sich die kortikale Fläche aller Tiere im Vergleich zu präovx signifikant vergrößert. Die intakten Tiere und die Tiere der E2-Gruppe vergrößerten ihre kortikale Fläche nicht in diesem Ausmaß. Sie verzeichneten, verglichen mit der Kontrollgruppe, eine signifikant kleinere Fläche der Kortikalis. Wie zuvor bereits erwähnt, besteht im Körper eine Art Mechanismus, um auf den Verlust trabekulärer Strukturen zu reagieren. Dies geschieht unter anderem durch den Anbau und die Vergrößerung des kompakten Knochens. Somit soll durch einen Zuwachs der Fläche eine größere Stabilität des Knochens erzielt werden (Seeman 2002). Beziehen wir dies auf die Ergebnisse unseres Versuches, waren die Tiere der Ecd- und Kontrollgruppe diejenigen, die den größten endostealen Dichteverlust hinnehmen mussten und die kortikale Fläche am meisten vergrößert haben. Wie groß letztlich der Zusammenhang dieser Ergebnisse mit der Wirkung der eingesetzten Substanzen ist, bleibt schwierig zu ermessen. Dass nach Ovx durch den Oströgenmangel erzeugte und gesteigerte Wachstum der Tiere könnte ebenfalls eine große Relevanz haben. Bei einem länger andauernden Versuchszeitraum wäre es daher möglich, gezieltere Aussagen bezüglich des Einflusses der Wirkstoffe, des Größenwachstums und der Versuchsdauer zu treffen. Der Effekt des E2, den Verlust trabekulärer Strukturen entgegenzuwirken und beim Anbau der kortikalen Fläche signifikant niedrigere Werte als die Kontrollgruppe zu erzielen, bestätigt die Ergebnisse anderer Studien (Moysich 2012).

4.3.5 Endosteale und periosteale Zirkumferenz

Bei der endostealen Zirkumferenz kam es nur bei den Tieren der Ecd-Gruppe zu einem signifikanten Zuwachs. Die Tiere der E2-Gruppe verzeichneten, verglichen mit der Kontrollgruppe, eine signifikante Abnahme ihres endostealen Umfangs. Bezüglich der periostealen Zirkumferenz kam es bei den Tieren der Kontroll- und Ecd-Gruppe zu einer signifikanten Zunahme verglichen mit präovx. Da sowohl bei der endostealen Zirkumferenz als auch der periostealen Zirkumferenz die Tiere der Kontroll- und Ecd-Gruppe ihre Umfänge vergrößerten, sind diese Veränderungen auf das Größenwachstum und die Gewichtszunahme der Tiere zurückzuführen. Die einzelnen Umfänge verhielten sich tendenziell proportional zu den Zunahmen der endostealen- und kortikalen Fläche. Die Resultate der E2-Gruppe konnten in dieser Form bereits in anderen Arbeiten erzielt werden und bestätigen, dass es unter E2-Gabe reflektorisch nicht zu einer Zunahme der Umfänge des Knochens kommt (Orwoll 2003; Moysich 2012).

Im folgenden Abschnitt folgt die Auseinandersetzung mit der Fragestellung Nr.2 (siehe Zielsetzung).

4.3.6 Serumparameter

Bei den Serumparametern stehen bei dieser Arbeit die Werte des Serum-Osteokalzins und die der Serum-CrossLaps im Fokus. Hierbei handelt es sich um Parameter, die uns einen Auf- oder Abbau des Knochengewebes signalisieren. Sowohl bei den CrossLaps als auch bei dem Osteokalzin zeigten nur die intakten Tiere und die Tiere der E2-Gruppe signifikante Unterschiede zu den Tieren der Kontrollgruppe. Hier wurden bei beiden Parametern niedrigere Werte als bei der Kontrollgruppe gemessen. Die Tiere der ECD-Gruppe zeigten hier keinerlei signifikante Unterschiede, wiesen aber in beiden Fällen ähnlich hohe Spiegel auf wie die der Kontrollgruppe. Vergleicht man die Werte der Serumparameter mit den Ergebnissen der Messung der endostealen Dichte, so zeigen sich Auffälligkeiten: Die Tiere der E2-Gruppe verzeichneten den geringsten Verlust der endostealen Dichte und wiesen deutlich niedrigere Werte, verglichen mit der Kontrollgruppe, der Serum-CrossLaps auf. Die Serum-CrossLaps steigen bei vermehrter Aktivität der Osteoklasten im Blut an und sind somit Marker des Knochenabbaus. Der niedrigere Serumspiegel der E2-Gruppe spricht also für eine verminderte Resorption des Knochengewebes und bestätigt die Werte der endostealen Dichte. Die Werte des Serum-Osteokalzins, eines Markers des Knochenaufbaus, sind in der E2-Gruppe ebenfalls signifikant vermindert. Ein Absinken der Werte der CrossLaps und des Osteokalzins nach E2-Gabe konnte schon in einer früheren Studie dieser Abteilung beobachtet werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass beim Fehlen von E2 sowohl die Marker für den Aufbau als auch für den Knochenabbau ansteigen. Hierbei steigen die Osteoklasten noch stärker als die Osteoblasten (Seidlová-Wuttke et al. 2010a) an. Diese Effekte des E2 wurden schon mehrfach in der Literatur beschrieben. Sowohl die Resorption als auch der Wiederaufbau des Knochens

werden durch E2-Gabe reduziert. Diese Reduktion betrifft die Aktivität der Osteoklasten deutlicher als die der Osteoblasten, was einer Osteoporoseentwicklung letztlich entgegenwirkt (Manolagas 2000, Seidlová-Wuttke et al. 2006, Seidlová-Wuttke et al. 2003). Es kommt somit zu einem neu eingestellten Gleichgewicht auf einem niedrigeren Aktivitätsniveau. Dieses neu eingestellte Gleichgewicht der Serumparameter bietet sich auch als Erklärung für die signifikant verringerte Reduktion der endostealen Dichte der Tiere der ECD-Gruppe an. Bei diesen Tieren hat sich das Gleichgewicht zwischen Serum-Osteokalzin und Serum-CrossLaps auf einem höheren Niveau eingependelt. Dies lässt die Folgerung zu, dass die antiosteoporotische Wirkweise des Ecd nicht über eine Hemmung der Knochenresorption eintritt sondern über eine kompensatorische Steigerung des Knochenaufbaus durch die Osteoblasten (Kapur et al. 2010). Das genaue Wirkprinzip des Ecds ist bislang noch nicht hinreichend erklärt. Jedoch konnte eine Induktion des Östrogensystems mitsamt ihrer Rezeptoren durch Ecd ausgeschlossen werden (Seidlová-Wuttke et al. 2010a). Bei einer Korrelation der Werte der Serum-CrossLaps und der endostealen Fläche entwickelte sich über den Versuchszeitraum von vier Wochen kein direkter linearer Zusammenhang. Das bedeutet, dass es bei einem Anstieg der Marker für den Knochenabbau, den Serum-CrossLaps, nicht zwingend zu einer Vergrößerung der endostealen Fläche kommen muss. Unsere allgemeinen Kenntnisse deuten aber darauf hin, dass bei vermehrter Knochenresorption der Versuch unternommen wird, die Fläche kompensatorisch für den Dichteverlust zu vergrößern.

5. Zusammenfassung

Aufgrund von Bewegungsmangel und Anstieg der Fehlernährung hat das Metabolische Syndrom vor allem in der sogenannten Wohlstandsgesellschaft zunehmend an Bedeutung gewonnen. Ebenfalls hat die Inzidenz der Osteoporose in den letzten Jahrzehnten weltweit zugenommen. Die postmenopausale Frau hat ein erhöhtes Risiko, sowohl ein Metabolisches Syndrom als auch eine Osteoporose zu entwickeln. In Studien der letzten Jahre konnten mehrfach die Verbindungen beider Krankheiten zueinander durch Wechselwirkungen des Fett- und Knochenstoffwechsels nachgewiesen werden. Zusätzlich besteht beim alternden Menschen die Gefahr, an einer Sarkopenie zu erkranken. Dies betrifft vor allem Frauen während des Klimakteriums. Aufgrund einer damit verbundenen weiteren Immobilität und einer Beeinflussung des Knochenstoffwechsels durch die Sarkopenie gewinnt diese zusätzlich an Bedeutung im Zusammenhang mit der Osteoporose und dem Metabolischen Syndrom. Da die Hormonersatztherapie durch das erhöhte Risiko von Brustkrebs und kardiovaskulären Erkrankungen keine Alternative mehr für eine Langzeittherapie darstellt, wird nach nebenwirkungsärmeren Optionen gesucht. Hier wurden in der Phytotherapie mit dem pflanzlichen Steroid Ecdyson bereits positive Effekte auf die Osteoporose und das Metabolische Syndrom erzielt. Der vorliegenden Arbeit liegt die Fragestellung zugrunde, inwiefern der Wirkstoff Ecd im Vergleich mit E2 dazu in der Lage ist, osteoporotischen und sarkopenischen Veränderungen therapeutisch entgegenzuwirken. Hierzu wurden 40 S.D.-Ratten über einen Zeitraum von vier Wochen die Testsubstanzen per Futter verabreicht. Am Knochen zeigte sich, dass Ecd in der Lage dazu war, die Fläche und Dichte der Kortikalis im Vergleich zu präovx auszubauen. In der Wirkung auf die Spongiosa, konnte Ecd eine Verminderung dieses Verlustes verzeichnen. Die Tiere der Ecd-

Gruppe wiesen eine signifikant größere endosteale Dichte auf als die Tiere der Kontrollgruppe. Bei den Serumparametern Osteokalzin und CrossLaps konnte ein erhöhter Spiegel nach Ecd-Gabe festgestellt werden. Es konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ausgemacht werden. Es zeigten sich dennoch deutlich höhere Spiegel als bei der E2-Gruppe. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Ecd sein antiosteoporotisches Potenzial durch kompensatorische Steigerung des Knochenaufbaus abrufen. E2 hingegen vermittelt seine Wirkung durch Hemmung des Knochenabbaus. An der Muskulatur verzeichneten die Tiere der Ecd-Gruppe die geringste Dichte und zeigten eine signifikante Abnahme im Vergleich zu den Tieren präovx. Außerdem zeigten sie die größte Muskelfläche aller Tiere. Zusammenfassend hat sich gezeigt, dass Ecd sowohl den Stoffwechsel des Knochens als auch den der Muskulatur positiv beeinflusst und weiterhin einen hoffnungsvollen Wirkstoff als Alternative zu E2 in der Therapie der Osteoporose, des Metabolischen Syndroms und der Sarkopenie darstellt.

6. Literaturverzeichnis

- Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung U, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, et al. (2004): PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 113, 846–855
- Azizov A P, Seifulla R D (1998): The effect of elton, leveton, fitoton and adapton on the work capacity of experimental animals. *Eksp Klin Farmakol* 61, 61-63
- Babaei P, Mehdizadeh R, Ansar MM, Damirchi A (2010): Effects of ovariectomy and estrogen replacement therapy on visceral adipose tissue and serum adiponectin levels in rats. *Menopause Int* 16, 100-104
- Báthori M, Tóth N, Hunyadi A (2008): Phytoecdysteroids and Anabolic-Androgenic Steroids - Structure and Effects on Humans. *Curr Med Chem* 15, 75-91
- Bauer J M , Wirht R, Volkert D, Werner H, Siebert C, (2008): Malnutrition, Sarkopenie und Kachexie im Alter - Von der Pathophysiologie zur Therapie. *Dtsch Med Wochenschr* 113, 305-310
- Bellino FL (2000): Nonprimate animal models of menopause: workshop report. *Menopause* 7, 14-24
- Beral V (2003): Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362, 419-427
- Bilezikian JP, Matsumoto T, Bellido T, Khosla S, Martin J, Recker RR, Heaney R, Seeman E, Papapoulos S, Goldring SR (2009): Targeting Bone Remodeling for the Treatment of Osteoporosis: Summary of the Proceedings of an ASBMR Workshop. *J Bone Miner Res* 24(3), 373-385
- Blain H, Vuillemin A, Teissier A, Hanesse B, Guillemin F, Jeandel C (2001): Influence of muscle strength and body weight and composition on regional bone mineral density in healthy women aged 60 years and over. *Gerontology* 47, 207-212
- Blumel JE, Castelo-Branco C, Bina L, Gramegna G, Tacla X, Aracena B, Cumsille, MA, Sanjuan A (2000): Quality of life after the menopause: a population study. *Maturitas* 34, 17-23
- Bone HG, Bolognese MA, Yuen CK, Kendler DL, Wang H, Liu Y, San Martin J (2008): Effects of Denosumab on Bone Mineral Density and Bone Turnover in Postmenopausal Women. *JCEM* 93, 2149–2157
- Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE (2003): The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone* 32, 136–141

- Boyce BF, Xing L (2008): Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys* 473, 139-146
- Butenandt A, Karlson P (1954): Über die Isolierung eines Metamorphosehormones der Insekten in kristallisierter Form. *Zeitschrift für Naturforschung* 9, 389-391
- Cao JJ (2011): Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res* 6, 30
- Carr M C (2003): The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2404–2411
- Catalan RE, Martinez AM, Aragonese MD, Miguel BG, Robles A, Godoy JE (1985): Alterations in rat lipid metabolism following ecdysterone treatment. *Comp Biochem Physiol B* 81, 771-775
- Chan ME, Lu XL, Huo B, Baik AD, Chiang V, Guldberg RE, Lu HH, Guo XE (2009): A Trabecular Bone Explant Model of Osteocyte-Osteoblast Co-Culture for Bone Mechanobiology. *Cell Mol Bioeng* 2, 405-415
- Consensus development conference (1993): diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 94, 646-650
- Coors NC: Analyse des Effekts von β -Ecdyson auf die histologische Struktur der proximalen Tibia von gonadektomierten Sprague-Dawley-Ratten. Med. Diss. Göttingen 2010
- Delmas PD (2000): Do we need to change the WHO definition of osteoporosis? *Osteoporos Int* 11, 189-191
- Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux A-C, Shah AS, Huster WJ, Draper M, Christiansen C (1997): Effects of Raloxifene on Bone Mineral Density, Serum Cholesterol Concentrations, and Uterine Endometrium in Postmenopausal Women. *N Engl J Med* 337(23), 1641-1647
- Delmas PD (1993): Biochemical markers of bone turnover. *J Bone Miner Res* 8 Suppl 2, S549-555
- Dinan L, Lafont R (2006): Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. *J Endocrinol* 191, 1–8
- Dinan L, Savchenko T, Whiting P (2001): On the distribution of phytoecdysteroids in plants. *Cell Mol Life Sci* 58, 1121-1132
- Duque G (2008): Bone and fat connection in aging bone. *Curr Opin Rheumatol* 20, 429–434

- Evian W J, Campbell W E (1993): Sarcopenia and Age-Related Changes in Body Composition and Functional Capacity. *Am Inst Nutrit* 93, 465-468
- Findeisen E: Ecdysterioide in der menschlichen Nahrung. Med. Diss. Marburg 2005
- Fisher J S, Hasser M E, Brown M (1998): Effects of ovariectomy and hindlimb unloading on skeletal muscle. *J Appl Physiol* 85, 1316-1321
- Fisher J S, Kohrt M W Brown M (2000): Food restriction suppresses muscle growth and augments osteopenia on ovariectomized rats. *J Appl Physiol* 88, 265-271
- Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S (2007): Visceral Fat Adipokine Secretion Is Associated With Systemic Inflammation in Obese Humans. *Diabetes* 56, 1010–1013
- Frost HM, Jee WS (1992): On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner* 18, 227-236
- Garnero P, Delmas PD (1996): New developments in biochemical markers for osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 59 Suppl 1, S2-9
- Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W (2009): Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature* 457, 219-223
- Gorelick-Feldman J, MacLean D, Ilic N, Poulev A, Lila MA, Cheng D, Raskin I (2008): Phytoecdysteroids Increase Protein Synthesis in Skeletal Muscle Cells. *J Agric Food Chem* 56, 3532-3537
- Göretzlehner G, Lauritzen C, Göretzlehner U; *Praktische Hormontherapie in der Gynäkologie*. 4. Auflage; De Gruyter, Berlin 2003
- Greendale G, Lee N, Arriola E (1999): The menopause. *Lancet* 353, 571-580
- Hammar M, Berg G, Fahraeus L, Larssoncohn U (1984): Climacteric symptoms in an unselected sample of Swedish women. *Maturitas* 6, 345-350
- Han ZH, Palnitkar S, Rao DS, Nelson D, Parfitt AM (1996): Effect of ethnicity and age or menopause on the structure and geometry of iliac bone. *J Bone Miner Res* 11, 1967-1975
- Häussler B, Gothe H, Göl D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D (2007): Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany-the BoneEVA Study. *Osteoporos Int* 18, 77–84
- Herold G: *Innere Medizin*. 7. Auflage; Verlag Arzt + Information, Köln 2011, 749-752

- Hofbauer LC, Schoppet M (2010): Bone Biology Underlying Therapeutic Approaches. *Transl Endocrinol Metab* 1, 117 – 148
- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL (1999): Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 140, 4367-4370
- Hsu Y-H, Venners SA, Terwedow HA, Feng Y, Niu T, Li Z, Laird N, Brain JD, Cummings SR, Bouxsein ML, Rosen CJ, Xu X (2006): Relation of Body Composition, Fat Mass, and Serum Lipids to Osteoporotic Fractures and Bone Mineral Density in Chinese Men and Women. *Am J Clin Nutr* 83, 146–154
- Hwang DK, Choi HJ (2010): The relationship between low bone mass and metabolic syndrome in Korean women. *Osteoporos Int* 21, 425–431
- Iqbal J, Sun L, Zaidi M (2009): Coupling bone degradation to formation. *Nat Med* 15, 729-731
- Ivey JL, Baylink DJ (1981): Postmenopausal osteoporosis: proposed roles of defective coupling and estrogen deficiency. *Metab Bone Dis Relat Res* 3, 3-7
- Janssen I, Heymsfield S B, Ross R (2002): Low Relative Skeletal Muscle Mass (Sarcopenia) in Older Persons is Associated with Functional Impairment and Physical Disability. *J Am Geriatr Soc* 50, 889-896
- Jee WSS, Yao W (2001): Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1, 193-207
- Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M (2001): Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2, 165–171
- Kaaja RJ (2008): Metabolic syndrome and the menopause. *Menopause Int* 14, 21–25
- Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15, 175-191
- Kapur P, Wuttke W, Jarry H, Seidlová-Wuttke D (2010 a): Beneficial effects of beta-Ecdysone on the joint, epiphyseal cartilage tissue and trabecular bone in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17, 350-355
- Khosla S, Amin S, Orwoll E (2008): Osteoporosis in men. *Endocr Rev* 29(4), 441-464
- Kizelsztejn P, Govorko D, Komarnytsky S, Evans A, Wang Z, Cefalu WT, Raskin I (2009): 20-Hydroxyecdysone decreases weight and hyperglycemia in a diet-induced obesity mice model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, 433-439
- Kobori M, Yamamuro T (1989): Effects of gonadectomy and estrogen administration on rat skeletal muscle. *Clin Orthop Rel* 234, 306-311

- Kolios L, Takur C, Moghaddam A, Hitzler M, Schmidt-Gayk H, Suda AJ, Höner B, Grützner PA, Wöfl C (2011): Anamnestic risk factor questionnaire as reliable diagnostic instrument for osteoporosis (reduced bone morphogenic density). *BMC Musculoskelet Disord* 12, 187
- Lafont R, Dinan L (2003): Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J Insect Sci* 3, 7
- Lee S, Lorenzo J (2006): Cytokines regulating osteoclast formation and function. *Curr Opin Rheumatol* 18, 411-418
- Liu D, Bachmann KA (1998): An Investigation of the Relationship Between Estrogen, Estrogen Metabolites and Blood Cholesterol Levels in Ovariectomized Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 286, 561-568
- Lobo RA (2008): Metabolic syndrome after menopause and the role of hormones. *Maturitas* 60, 10–18
- Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y (2008): Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* 29, 403-440
- Luo X-H, Guo L-J, Xie H, Yuan L-Q, Wu X-P, Zhou H-D, Liao EY (2006): Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J Bone Miner Res* 21, 1648–1656
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995): The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839
- Manolagas SC (2000): Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21, 115–137
- Manson JE, Hsia J, Johnson KC, Rossouw JE, Assaf AR, Lasser NL, Trevisan M, Black HR, Heckbert SR, Detrano R (2003): Estrogen plus Progestin and the Risk of Coronary Heart Disease. *N Engl J Med* 349, 523-534
- Marcus R, Greendale G, Blunt BA, Bush TL, Sherman S, Sherwin R, Wahner H, Wells B (1994): Correlates of bone mineral density in the postmenopausal estrogen/progestin interventions trial. *J Bone Miner Res* 9, 1467–1476
- Martin EA, Ritman EL, Turner RT (2003): Time course of epiphyseal growth plate fusion in rat tibiae. *Bone* 32, 261-267
- Marzetti E, Leeuwenburgh C (2006): Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age. *Exp Gerontol* 41, 1234–1238
- Mayer F, Scharhag-Rosenberger F, Carlson A, Cassel M, Müller S, (2011): Intensität und Effekt von Krafttraining bei Alter. *Dtsch Arztebl* 21, 359-365

- McClung J M, Davis J M, Wilson M A, Goldsmith E C (2006): Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy. *J Appl Physiol* 100, 2012-2023
- Migliaccio S, Greco EA, Fornari R, Donini LM, Lenzi A (2011): Is obesity in women protective against osteoporosis? *Diabetes Metab Syndr Obes* 4, 273–282
- Mironova VN, Kholodova ID, Skachkova TF, Bondar OP, Datsenko ZM (1982): Hypocholesterolemic effect of phytoecdysones during experimental hypercholesterolemia in rats. *Vopr Med Khim* 28, 101-105
- Möllenhoff H (2007): Best Ager on the Slope. *Aktuel Ernährungsmed* 32, 148-150
- Moran A L, Nelson S A, Landisch R M, Warren G L (2007): Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. *J Appl Physiol* 102, 1387-1393
- Moreira Mde A, Brito MV, Brito NM, Freire Filho Mde S (2005): Skeletal muscle histomorphometric study of rats in anestrus. *Acta Cir Bras* 20 (4), 329–335
- Morley J E, Kim M J, Haren M T, Kevorkian R, Banks W A (2005): Frailty and the aging male. *Aging Male* 8, 135–140
- Moysich S: Effekt von Equol, Puerarin, Daidzein und Quercetin auf die Knochenparameter bei der ovariectomierten Ratte. *Med. Diss. Göttingen* 2012
- Nelson HD (2008): Menopause. *Lancet* 371, 760-770
- Neuhauser H, Ellert U: Prävalenz des metabolischen Syndroms in Deutschland: eine Sensitivitätsanalyse. *German medical science* 2005. Unter: <http://www.egms.de/static/en/meetings/gmds2005/05gmds183.shtml> (abgerufen am 12.06.2015)
- Niethard FU, Pfeil J: *Duale Reihe Orthopädie*. 5. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005, 144–146
- Norman K, Bauer J, Smoliner C, Lochs H, Pirlich M (2009): Bedeutung der Proteinzufuhr bei der Entstehung und Behandlung der Sarkopenie. *Akt Ernährungsmed* 34, 171–177
- Okazaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S, Ooka H, Tomiyama H, Sakamoto Y, Matsumoto T (2002): Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology* 143, 2349–2356
- Orwoll ES (2003): Men, bone and estrogen: unresolved issues. *Osteoporos Int* 14, 93-98
- Parfitt AM (1984): Age-related structural changes in trabecular and cortical bone: cellular mechanisms and biomechanical consequences. *Calcif Tissue Int* 36 Suppl 1: S123-128

- Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB (2003): The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med* 163, 427–436
- Poli A, Bruschi F, Cesana B, Rossi M, Paoletti R, Crosignani PG (2003): Plasma low-density lipoprotein cholesterol and bone mass densitometry in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 102, 922–926
- Rachon D, Vortherms T, Seidlová-Wuttke D, Wuttke W (2008): Effects of black cohosh extract on body weight gain, intra-abdominal fat accumulation, plasma lipids and glucose tolerance in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Maturitas* 60, 209-215
- Reginster J-Y, Burlet N (2006): Osteoporosis: a still increasing prevalence. *Bone* 38, 4–9
- Riggs BL, Melton LJ (1986): Involutional osteoporosis. *N Engl J Med* 314, 1676-1686
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ (1998): A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 13, 763-773
- Robertson RP, Khosla S, Giudice LC, Jameson JL, Kahn BB, Moore DD, et al. (2010): *Translational Endocrinology & Metabolism: Osteoporosis Update*. The Endocrine Society 1, 70-72
- Rodríguez JP, Montecinos L, Ríos S, Reyes P, Martínez J (2000): Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. *J Cell Biochem* 79, 557–565
- Roodman GD (1993): Role of cytokines in the regulation of bone resorption. *Calcif Tissue Int* 53 Suppl 1, S94-98
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson R, Beresford SA, Howard B, Johnson K et al. (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288, 321-333
- Russell M, Mendes N, Miller KK, Rosen CJ, Lee H, Klibanski A, Misra M (2010): Visceral Fat Is a Negative Predictor of Bone Density Measures in Obese Adolescent Girls. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 1247–1255
- Seeman E (2002): Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet* 359, 1841-1850
- Seeman E (2008): Structural basis of growth-related gain and age-related loss of bone strength. *Rheumatology (Oxford)* 47 Suppl 4, iv2-8

Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Becker T, Christoffel V, Wuttke W (2003): Pharmacology of Cimicifuga racemosa extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. *Maturitas* 44 Suppl 1, 39-50

Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Jäger Y, Wuttke W (2008): Bone development in female rats maintained with soy-free or soy-containing food as determined by computer-assisted tomography and serum bone markers. *J Bone Miner Metab* 26, 321-327

Seidlová-Wuttke D, Christel D, Kapur P, Nguyen BT, Jarry H, Wuttke W (2010 a): Beta-ecdysone has bone protective but not estrogenic effects in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17, 884-889

Seidlová-Wuttke D, Ehrhardt C, Wuttke W (2010 b): Metabolic effects of 20-OH-Ecdysone in ovariectomized rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 119 (3-5), 121-126

Seidlová-Wuttke D, Wuttke M, Moses K, Senft A, Jarry H, Wiese KG, Wuttke W (2011) Comparison of effects of castration and vibration therapy of female and male rats on bone, muscle and fat tissue. (*Calcif Tissue Int*, im Druck)

Sirola J, Rikkonen T (2005): Muscle performance after the menopause. *J Br Menopause Soc* 11, 45-50

Sunder-Plassmann M: Die Wirkung von 20-OH-Ecdyson auf Osteoporose und das Fett im Kniegelenk im Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom. Med. Diss. Göttingen 2013

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

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

Taylor HS, Manson JE (2011): Update in Hormone Therapy Use in Menopause. *JCEM* 96, 255–264

Tsai W-J A, McCormick K M, Brazeau D E (2007): Estrogen Effects on Skeletal Muscle Insulin-Like Growth Factor-1 and Myostatin in Ovariectomized Rats. *Exp Biol Med* 1314-1325

Turner AS (2001): Animal models of osteoporosis-necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 1, 66-81

Verma S, Rajaratnam JH, Denton J, Hoyland JA, Byers RJ (2002): Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. *J Clin Pathol* 55, 693–698

Vokes TJ, Favus MJ (2010): Clinical Management of the Patient with Osteoporosis. *Transl Endocrinol Metab* 1(1), 9-54

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

- WHO 2004: WHO Scientific Group on the assessment of Osteoporosis at primary Health Care Level. Summary meeting Report Brussels 2004
- Wronski TJ, Walsh C, Ignaszewski L (1986): Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 7, 119-123
- Wronski TJ, Dann LM, Horner SL (1989 a) Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 10, 295-301
- Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M (1989 b): Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 45, 360-366
- Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM (1993): Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* 366, 476-479
- Yeung DKW, Griffith JF, Antonio GE, Lee FKH, Woo J, Leung PC (2005): Osteoporosis is associated with increased marrow fat content and decreased marrow fat unsaturation: a proton MR spectroscopy study. *J Magn Reson Imaging* 22, 279–285
- Yoshida T, Otaka T, Uchiyama M, Ogawa S (1971): Effect of ecdysterone on hyperglycemia in experimental animals. *Biochem Pharmacol* 20, 3263-3268
- Zhao H, Tian Z, Hao J, Chen B (2005): Extragonadal aromatization increases with time after ovariectomy in rats. *Reprod Biol Endocrinol* 3, 6
- Zhao L-J, Jiang H, Papasian CJ, Maulik D, Drees B, Hamilton J, Deng H-W (2008): Correlation of Obesity and Osteoporosis: Effect of Fat Mass on the Determination of Osteoporosis. *J Bone Miner Res* 23, 17–29

7. Abbildungsverzeichnis		Seite
Abbildung 1.	Messlinie und Dichtebereiche bei der qCT - Auswertung der Tibia	28
Abbildung 2.	Messlinie bei der qCT - Auswertung des Wirbelkörpers	28
Abbildung 3.	Die Entwicklung des Körpergewichts der einzelnen Gruppen über den Versuchszeitraum	31
Abbildung 4.	Die Futteraufnahme der S.D.-Ratten in ihren Gruppen über den Versuchszeitraum	32
Abbildung 5.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Paratibiale Muskelfläche	34
Abbildung 6.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Paratibiale Muskeldichte	35
Abbildung 7.	Korrelation des Körpergewichts mit der Muskelfläche der Tibia	36
Abbildung 8.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Endosteale Dichte der Tibia	37
Abbildung 9.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Endosteale Fläche der Tibia	38
Abbildung 10.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Kortikale Dichte der Tibia	39
Abbildung 11.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Kortikale Fläche der Tibia	40
Abbildung 12.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Endosteale Zirkumferenz	41
Abbildung 13.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Periosteale Zirkumferenz	42
Abbildung 14.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Serum-Osteokalzin	43
Abbildung 15.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Serum-CrossLaps	44
Abbildung 16.	Korrelation der endostealen Fläche der Tibia mit den Serum-CrossLaps	45

8. Tabellenverzeichnis

Seite

Tabelle 1.	Futteraufnahme (g/Tier/Tag) und aufgenommene Substanzmenge (mg/Tier/Tag)	25
------------	---	----

Danksagung

Ich möchte Frau Priv.- Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke und Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke sehr herzlich für die Möglichkeit dieser wissenschaftlichen Arbeit in der endokrinologischen Abteilung der Universitätsmedizin in Göttingen sowie für die persönliche und professionelle Betreuung danken. Auch meinem Freund und Co-Doktoranden Moritz Pettenkofer möchte ich für die enge und gute Zusammenarbeit während der Durchführung der Experimente und Auswertung der Ergebnisse danken. Abschließend möchte ich mich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen und involvierten Mitarbeitern der Abteilung für ihre Hilfe bedanken.