

4. Eigene Untersuchungen

4.1. Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt wird zunächst auf die verwendeten Versuchstiere und deren Haltung während der durchgeführten Versuche eingegangen. Weiterhin erfolgt die Beschreibung der in allen Versuchen angewendeten Methoden zur Tierbehandlung und zur Bestimmung der einzelnen Parameter. Abschließend werden die Durchführungsprotokolle der einzelnen Versuche mit Angaben der Tierzahl, Behandlungsdauer und -form sowie der Einsatz der zuvor beschriebenen Methoden aufgeführt.

Verwendete Materialien werden namentlich erwähnt, weitere Angaben befinden sich im Anhang.

Materialien, soweit bisher relativ neu im Forschungsgeschehen eingesetzt, werden ausführlicher beschrieben.

4.1.1. Versuchstiere

Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden weibliche Ratten der Rasse Wistar aus der Schering-Zucht verwendet. Zu Beginn der Versuche waren die Tiere mindestens 12 Wochen alt. Für den Versuch I wurden die Ratten zyklusvorsortiert, d.h. am Tag des Versuchsbeginns (Versuchstag 0) befanden sich die Tiere im Zyklusstadium des Diöstrus. Für die Versuche II und III wurden die Ratten ebenfalls zyklusvorsortiert und befanden sich am Versuchstag 0 im Proöstrus.

Die Versuchstiere wurden in vollklimatisierten, fensterlosen Räumen mit einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 14/10 h und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% gehalten. Die Unterbringung erfolgte in Makrolonkäfigen zu zweit oder dritt. Die Raumtemperatur betrug konstant 20-22 °C. Die Tiere erhielten standardisiertes Trockenfutter (Altromin 1324®) und Wasser *ad libitum*.

Alle Tierversuche wurden im Rahmen genehmigter Tierversuchsvorhaben der Schering AG (GEN 0532, ANZ 0112) durchgeführt.

4.1.2. Operationstechniken

4.1.2.1. Ovarektomie

Die Narkose der Versuchstiere erfolgte mit Aether. Die auf dem Bauch liegende Ratte wurde dann im Rücken-Lendenwirbelbereich geschoren und desinfiziert. Mit einer Schere wurde cranial der Schenkelfalte genau über der Wirbelsäule ein etwa 1 cm langes und etwa 0,5 cm breites Stück Fell herausgeschnitten. Mit einer anatomischen Pinzette wurde das Fell nach ventral gezogen und mit einer zweiten spitzen anatomischen Pinzette durch die Muskulatur der seitlichen Bauchwand in die Bauchhöhle gestochen. Durch Spreizen der Pinzette wurde eine Öffnung zur Bauchhöhle präpariert. Uterus, Ovar und das sie umgebene Fettgewebe wurden mit einer weiteren Pinzette vorsichtig nach außen gezogen und das Ovar abgeschnitten. Der gleiche Eingriff erfolgte auf der anderen Körperseite. Bei den Kontrolltieren wurden die Ovarien nur vorgelagert und dann wieder in die Bauchhöhle verbracht. Durch diese sogenannte Scheinoperation wurden Begleitfaktoren einer Operation, wie Narkosestreß und Wundschmerz, welche sich auf die Knochendichte auswirken könnten, in allen Versuchsgruppen verursacht.

Die Hautwunde wurde mit drei bis vier Wundverschlußklammern verschlossen und nochmals desinfiziert.

4.1.2.2. Implantation der osmotischen Pumpen

Um den Versuchstieren die zu testenden Substanzen möglichst stressfrei, gut verträglich und über einen langen Zeitraum zu verabreichen, wurden ihnen osmotische Pumpen 2ML4 (Fa. Alzet, USA) subcutan implantiert. Die Narkose erfolgte ebenfalls mit Aether. Dorsomedial im Nacken wurde nach dem Scheren und Desinfizieren ein etwa 2 cm langer Hautschnitt ausgeführt, mit einer stumpf-stumpfen Schere subcutan nach caudal eine Tasche präpariert, in welche die osmotische Pumpe verbracht wurde. Die Wundöffnung wurde mit drei bis vier Wundklammern verschlossen und nochmals desinfiziert. Bei den im Versuch I und im Versuch III ovarektomierten Tieren wurde die bei diesem Eingriff entstandene Hautöffnung genutzt, um die Pumpen unter die Haut zu implantieren.

Nach den beschriebenen Operationen wurden die Tiere wieder in die Ställe verbracht und nach ca. zwei Stunden auf ihr Befinden kontrolliert. Alle Tiere erholten sich innerhalb eines Tages. Die Heilung der Hautwunde verlief stets komplikationslos. Die Pumpen wurden über die Versuchszeiträume gut toleriert, und das Normalverhalten durch sie nicht beeinträchtigt.

Beschreibung der osmotischen Pumpe 2ML4 (Fa. Alzet, USA)

Der Querschnitt der kokonförmigen osmotischen Pumpe besteht aus einer äußeren semipermeablen Membran, einer Kammer mit einem osmotischen Agents (hochkonzentrierte Natriumchloridlösung) und der inneren nicht permeablen, jedoch flexiblen Wand des Behälters für die zu verabreichende Substanzlösung.

Die Funktionsweise beruht auf einem Einströmen von Körperflüssigkeit durch die semipermeable Membran, der daraus folgenden Volumenerhöhung in der äußeren Kammer und der damit verbundenen Kompression der inneren Kammer. Durch diese Kompression gelangt die Testflüssigkeit durch eine Auslauföffnung an einem der Pumpenpole in den Tierkörper.

4.1.3. Blutentnahme

Zur Bestimmung von Östradiol und Osteocalcin im Serum wurde zu Beginn und während des Versuchs retroorbital mit einer Pasteurpipette Blut entnommen. Vor diesem Eingriff wurden die Ratten kurz mit CO₂ narkotisiert. Die Blutentnahmen erfolgten zu festgelegten Zeitpunkten (10-12 Uhr), um diurnale Schwankungen der zu messenden Parameter zu minimieren.

Unmittelbar nach der Blutabnahme wurden die Proben bei 4°C über einen Zeitraum von drei Stunden, in denen es zur Gerinnung kam, gekühlt. Das Serum wurde vom Blutkuchen durch Zentrifugieren mit 1500 g 10 Minuten lang getrennt. Das Serum wurde abpipettiert und für weitere Bestimmungen aliquotiert bei -20°C gelagert.

4.1.4. Kontrolle der Ovulationshemmung

Im Versuch II und III war es wichtig, die ovulationshemmende Wirkung der verabreichten Gestagene zu kontrollieren, denn ein Effekt auf die Knochendichte war nur bei vollständiger, andauernder Ovulationshemmung und einer niedrigen E₂-Serumkonzentration zu erwarten.

Um die Sicherheit der Aussage über die Ovulationshemmung zu erhöhen, wurden vier verschiedene Methoden kombiniert. Keine dieser Methoden ließ für sich allein eine 100 % sichere Aussage zu, da jede nur über einen bestimmten Zeitabschnitt Auskunft gab.

4.1.4.1. Zykluskontrolle/ Vaginalabstrich

Die für alle Versuche verwendeten vorsortierten Ratten zeigten einen regelmäßigen viertägigen Sexualzyklus, wobei die Zyklusabschnitte Diöstrus, Proöstrus, Östrus und Metöstrus jeweils etwa über einen Tag präsent waren. Jeder Zyklusabschnitt zeigt ein typisches Vaginalabstrichbild (Siehe dazu auch Abbildung 1a+b). Täglich vormittags erfolgten Vaginalabstriche mittels kleiner in Kochsalzlösung getauchter Wattestäbchen, welche auf einem Objektträger ausgedrückt und im Mikroskop sondiert wurden. Eine Färbung des Abstrichs, wie beispielhaft gezeigt in Abbildung 1, war nicht nötig, da sich im Nativpräparat alle Zelltypen gut differenzieren ließen. Tägliche Abstrichbilder des Diöstrus über den Behandlungszeitraum wurden als Zyklushemmung des Tieres gewertet.

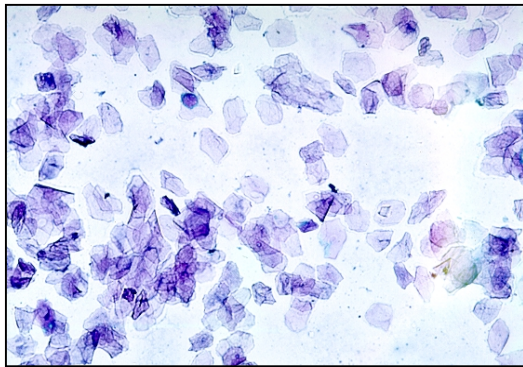


Abb.1a

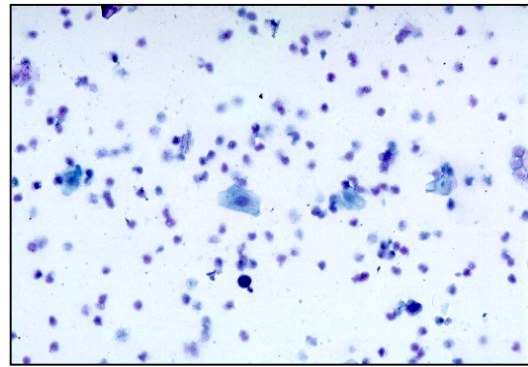


Abb.1b

Abbildung 1 Vaginalabstrich der Ratte gefärbt nach Papanicolaou: a. Darstellung des Zyklusstadiums Östrus; zahlreiche verhornte Epithelzellen sind als blaue, kernlose Schollen sichtbar b. Darstellung des Zyklusstadium Diöstrus; vorherrschend sind neutrophile Granulozyten, vereinzelt auch kernhaltige Epithelzellen.

4.1.4.2. Östradiol-Serumspiegel

In allen Versuchen wurde mindestens einmal wöchentlich eine Blutprobe genommen, um unter anderem den Verlauf des Östradiol-Serumspiegels über den Behandlungszeitraum erstellen zu können. Die Blutproben wurden fast immer an den Tagen entnommen, an denen sich die Tiere aufgrund ihrer Zyklusvorsortierung im Zyklusstadium Proöstrus befinden sollten. Ein Unterscheiden der dauerhaft ovulationsgehemmten Ratten von nicht ovulationsgehemmten Ratten wird durch einen konstant niedrigen Östradiol-Serumspiegel und das Ausbleiben des präovulatorischen Östradiolanstiegs, welcher den Proöstrus charakterisiert (Butcher et al. 1973), möglich. Im Gegensatz dazu muß bei den Kontrolltieren der präovulatorische Östradiolanstieg deutlich feststellbar sein.

4.1.4.3. Makroskopische Beurteilung des Ovars

Da sich auf dem Ovar der intakten zyklischen Ratte immer drei und mehr Generationen Gelbkörper finden (Long and Evans, 1922) und die makroskopische Unterscheidung zwischen ihnen schwer fällt, wurde die folgende Methode nur im Versuch III angewendet. Nach siebenwöchiger Gestagenbehandlung wurden am Versuchsende die Ovarien nach dem Vorhandensein frischer Gelbkörper observiert. Ovarien ohne Gelbkörper wurden als konstant ovulationsgehemmt gewertet.

4.1.4.4. Eizellensuche in der Tube

Um die Chancen zu erhöhen, durch die vorhergehend beschriebenen Methoden nicht entdeckte, ovulierende Tiere zu ermitteln, wurde der Ovulationshemmungstest (Neumann et al. 1966, Labhsetwar and Bainbrigde 1971) modifiziert. Diese Methode ist ebenfalls eine, die Abstrichmethode unterstützende Maßnahme, da sie nur einen Zeitraum von zwei Tagen abdeckt. Am Tag vor der Sektion wurden alle Tiere einseitig ovarrektomiert und die präparierten Tuben im Quetschpräparat mikroskopisch nach Eizellen abgesucht, welche ein Indiz für eine zuvor stattgefundenene Ovulation sind (Siehe dazu Abb. 2a+b). Dieser Eingriff wurde am Sektionstag mit der verbliebenen Tube wiederholt.

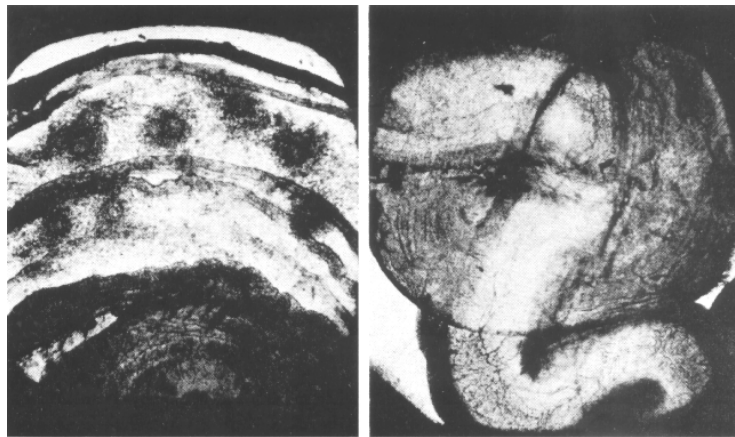


Abb.2a

Abb.2b

Abbildung 2 Quetschpräparat von Rattentuben; a. Beweisend für die stattgefundenene Ovulation sind die von Granulosazellen umgebenen Eizellen, hier als kugelförmige dunkle Wolken zu erkennen b. Darstellung der unterdrückten Ovulation (aus Neumann et al. 1966)

4.1.5. Sektion

Am Versuchsende fand die Sektion aller im Versuch eingesetzten Ratten statt. Die Tiere wurden gewogen, anschließend in der CO₂-Box getötet und folgende Organe entnommen: Uteri, Ovarien, Nebennieren, beide Tibien. Es wurden die Feuchtgewichte von Uteri und Nebennieren bestimmt. Die entnommenen Organe wurden bis auf die Tibien in eine PBS-gepufferte 4%ige Formalinlösung verbracht. Von den Tibien wurde sofort nach Entnahme alles Weichteilgewebe entfernt. Die linke Tibia wurde für die Knochenhistologie im distalen Bereich um etwa 1 cm gekürzt. Nach achtundvierzig Stunden in einer 4°C kalten 40%igen ethanolischen Lösung wurde sie bis zur Analyse in einer ebenfalls 4°C kalten 70%igen Ethanollösung aufbewahrt. Die rechte Tibia wurde bis zur Knochendichtebestimmung im QCT in 70%iger Ethanollösung bei 4°C aufbewahrt.

Tierverluste:

Im Versuch I starb ein Tier zum Versuchsbeginn in der Narkose. Zwei Tier starben im Versuchsverlauf bei den Blutabnahmen. Während des Versuchs II verstarb ein Tier während der Blutabnahme. Im Versuch III starben ein Tier zu Versuchsbeginn in der Narkose und zwei Tiere während der Blutabnahmen. Dies bedeutet einen Gesamtverlust von 7/172 Tieren. Die Tiere wurden nicht seziert. Die Tierverluste wurden nicht ersetzt.

4.1.6. Verwendete Substanzen

Die Strukturformeln der in den Versuchen II und III eingesetzten Gestagene sind in den Abbildung 3a-c, sowie die Strukturformel des in Versuch I verwendeten 17- β -Östradiols in der Abbildung 4 abgebildet.

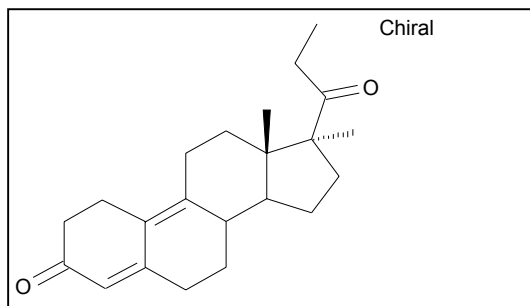


Abbildung 3a Promegeston

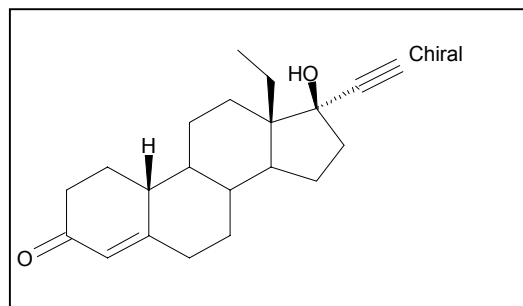


Abbildung 3b Levonorgestrel

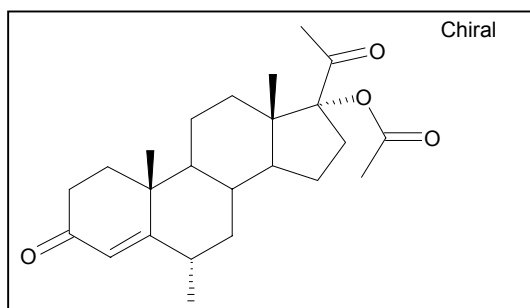


Abbildung 3c Medroxyprogesteronacetat

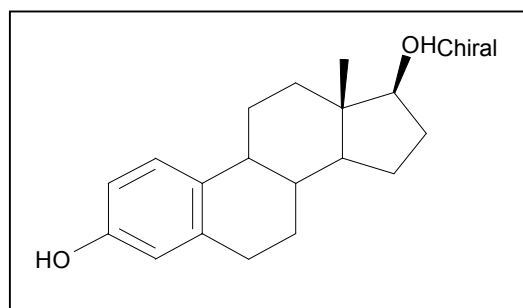


Abbildung 4 17- β -Östradiol

Die Applikation der genannten Substanzen erfolgte über osmotische Pumpen. Laut Hersteller beträgt das Reservoirvolumen der Pumpen 2000 μl . Gepumpt werden 2,5 $\mu\text{l}/\text{h}$ bei einer konstanten Temperatur von 37°C. Die Pumprate beträgt pro Tag 60 μl , d.h. die pro Tier und Tag zu applizierende Substanzmenge (x) muß in 60 μl gelöst sein. Folgend kann die ins Pumpreservoir zu verbringende Gesamtmenge (y) berechnet werden:

$$x / 60\mu\text{l} = y / 2000 \mu\text{l}$$

x = Substanzmenge/Tag,

y = die Menge, die über einen Zeitraum von 28 Tagen benötigt wird + Sicherheitrest

y μg ist die in 2000 μl (5 % Ethanol+95 % Propylenglycol) zu lösende Menge, die in eine Pumpe verbracht wird. Insgesamt enthält die Pumpe nun eine Substanzmenge für 33,3 Tage. Der Hersteller garantiert nur eine ordnungsgemäße Pumpleistung über 28 Tage. Die verbleibende Menge wird als Sicherheitsrest betrachtet.

Die Kontrolltiere erhielten mit o.g. Lösungsmittel (Vehikel) gefüllte Pumpen.

4.1.7. Biochemische Untersuchungen aus dem Serum

4.1.7.1. Bestimmung von 17- β -Östradiol

Die Serumkonzentrationen von 17- β -Östradiol wurden im Radioimmunoassay (RIA) bestimmt. Der Radioimmunoassay (RIA) wurde nach der Charcoal-Methode (Hasan et al. 1971) durchgeführt.

Eine definierte Menge des ^3H -markierten Östradiol-Tracers (heißes Antigen) konkurriert mit einer unbekanntem Menge unmarkierten Östradiols der Serumprobe (kaltes Antigen) um die Bindungsstelle am entsprechenden Antikörper (Kaninchenantikörper).

Um eine möglichst tiefe Nachweisgrenze zu erlangen, wurde das Probenserum vorher einmal in jeweils 2,5 ml Buthylether extrahiert.

Nach Zusammenpipettieren von Tracer, Probe und Antikörper und nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden bei 4 °C kommt es zur Einstellung eines Gleichgewichts zwischen radioaktiven und nicht radioaktiven AG-AK-Komplexen, freiem Antigen und Antikörper. Die Trennung der gebildeten AG-AK-Komplexe vom Rest erfolgt durch eine Aktivkohle-Dextranlösung. Gebunden wird das nicht umgesetzte AG. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand in Szintillationsgefäße dekantiert und mit Atomlight (NEN #NEF-968) versetzt und im Szintillationsmeßgerät (Liquid Scintillator Counter, Wallac 1410, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) die Radioaktivität bestimmt. Gemessen werden die radioaktiven AK-AG-Komplexe. Die Radioaktivität verhält sich umgekehrt proportional zur Östradiolmenge der Probe. Das heißt, je weniger radioaktiv die Probe ist, desto mehr unmarkiertes Östradiol aus der Probe ist in Komplexen gebunden.

Die Auswertung erfolgte mit der Software Ria Calc LM/DM (Ria Lab and Data Management Program) der Fa. Wallac Distribution GmbH, Freiburg.

Tracer:	[2,4,6,7,16,17- ^3H]Östradiol,#TRK 587, 250 μCi , AmerSHAM, USA
Tracerverdünnung:	5000cpm in 200 μl
Kaninchen-Antikörper:	Rabbit Anti-E2-6-CMO-Serum, Dr.Stevens, USA
Antikörperverdünnung:	1 : 3000
Probenvolumen:	300 μl
Interassayvariationskoeffizient-Spannweite:	7,9-16,0 %
Intraassayvariationskoeffizient-Spannweite:	5,0-16,6 %
Meßbereich:	15,3-2934 pmol/l
Kreuzreaktivitäten: Äthinylöstradiol:	0,14 %

Promegeston:	<0,01 %
Mifepriston:	0,0001 %
Progesteron:	nicht nachweisbar

4.1.7.2. Bestimmung von Osteocalcin

Osteocalcin wurde in einem kommerziellen RIA-Test (J^{125} -RIA/DAK, Fa. Biogenesis) bestimmt. Das Osteocalcin der Serumprobe konkurriert mit dem radioaktiv markierten Antigen um einen Ratten-Osteocalcin-Antikörper von der Ziege. Es wird ein zweiter Antikörper (Esel-Anti-Ziege) hinzugegeben, der die gebildeten AG/AK-Komplexe bindet. Die gebildeten Präzipitate werden abzentrifugiert und im Gammacounter gemessen. Die gemessene Radioaktivität verhält sich umgekehrt proportional zur Serum-Osteocalcinkonzentration. Anhand einer Standardkurve kann die Osteocalcinkonzentration bestimmt werden (Gundberg et al. 1984, Finkelmann et al. 1988).

Standard:	Osteocalcin Ratte (Biogenesis)
Meßbereich:	3,1-400 ng/ml
Antikörper I:	Ziege-Anti-Ratte-Osteocalcin (Biogenesis)
Verdünnung:	1:100 in Puffer I
radioaktives Antigen:	^{125}J Ratten-Osteocalcin
Konzentration:	20000 cpm/100 μ l Puffer I
Antikörper II:	Esel-Anti-Ziegen-IgG Präzipitationsserum (Biogenesis)
Verdünnung:	2,5 % in Puffer II
Puffer:	I: RIA-Puffer pH 7,4 gebrauchsfertig (Biocyc GmbH) II: Antikörper-Phosphat-PEG-Puffer 0,1 M/ pH 7,4 gebrauchsfertig (Biocyc GmbH) NIS-Puffer (Normal Caprine Goat Serum) (Biogenesis) 1:40 in Puffer I NIS-Puffer 1:160 in Puffer I
Inkubationszeiten:	d1: 16-24 Stunden bei 7°C d2: 16-24 Stunden bei 7°C d3: 2 Stunden bei 7°C
Probenvolumen:	2,5 μ l
Interassayvariationskoeffizient–Spannbreite:	21,8-23,3 %
Intraassayvariationskoeffizient–Spannbreite:	1,4-4,8 %

4.1.8. Knochenhistomorphometrie

Aufgrund der Fragestellung nach der Entwicklung der Knochendichte und -struktur wurde es nötig, ein geeignetes quantitatives Meßverfahren zu finden. Zur Anwendung kamen in dieser Arbeit zwei Methoden, die sich in ihren Aussagen ergänzen.

Erstere Methode ist das histomorphometrische Verfahren. Die zweite Methode ist die nachfolgend beschriebene densitometrische Bestimmung der Knochendichte mit dem Quantitativen Computertomographen. Als geeigneter Knochen aufgrund schneller Veränderung der Dichte und Struktur bei knochenbeeinflussender Behandlung wurde für beide Methoden die Tibia bestimmt.

Mit dem histomorphometrischen Verfahren lassen sich quantitative Aussagen über die Struktur, Konnektivität und Zusammensetzung des Knochengewebes erzielen.

Histomorphometrische Parameter lassen sich in statische und dynamische einteilen.

In dieser Arbeit wurden statische Parameter bestimmt. Statische Parameter geben Auskunft über Flächen, Strukturen und Zellen des Knochengewebes.

Die genaue Ausführung der nachfolgend vorgestellten histologischen Methoden befindet sich im Anhang (S. 95) dieser Arbeit.

4.1.8.1. Fixierung, Entwässerung und Einbettung

Die Fixierung und Entwässerung der Tibien erfolgte in aufsteigender Alkoholreihe nach der Methode von Baron et al. (1983), modifiziert nach Schenk et al. (1984). Die Infiltration und die Einbettung in Kunststoff (Methylmethacrylat) wurde nach der Methode von Baron et al. (1984), modifiziert nach Erben (1990) durchgeführt. Die Einbettung der fixierten, entwässerten und mit MMA-Lösung infiltrierten Tibien erfolgte in mit 5 ml MMA 3 - Lösung bei 42°C ein bis drei Tage vorpolymerisierten Gelatine-Steckkapseln. Mit ihrer medialen Seite wurden sie so auf die vorpolymerisierten Böden plaziert, daß die proximale Gelenkfläche dicht am Kapselrand lag. Dieses Vorgehen erleichterte die spätere Orientierung beim Schneiden des Knochens. Nach der Positionierung wurden vorsichtig 10 ml der frisch zubereiteten MMA-3-Lösung darüberschichtet und 24 h bei Raumtemperatur vorpolymerisiert. Die Präparate härteten im Wärmeschrank (42°C) ungefähr drei Tage aus. Nach dem Entfernen der Gelatinekapsel wurde die untere Rundung der ausgehärteten Kunststoffblöcke mit einer Metallsäge abgesägt. Folgend wurde die Tibia so aus dem Methylmethacrylat herausgefeilt, daß allseitig zur Tibia nur ein kleiner Kunststoffrand gelassen wurde und nur noch die Medialseite mit dem Block verbunden war.

4.1.8.2. Schneidetechnik

Die erstellten Präparate wurden mit einem Rotationsmikroskop (Supercut 2050 der Fa. Reichert Jung) und Hartmetallmessern geschnitten. Aufgrund der unterschiedlichen Spongiosadichteverteilung in der Tibia wurde eine Schnittebene für alle Präparate definiert. Diese Schnittebene wurde durch die *Eminentia intercondylaris*, die *Tuberositas tibiae* und durch das weiteste Lumen der Tibia gelegt (Erben, 1990). Beim Schneiden wurden der Probenblock und das Mikrotommesser mit einer Schneidflüssigkeit (WIV Schneidflüssigkeit, Fa. WIV Schwetzingen) benetzt, so daß die Schnitte auf einem geschlossenen Feuchtigkeitfilm auf das Messer glitten (Baron et al.1983, Schenk et al.1984, Malluche und Faugere 1986). Bei Erreichen der gewünschten Schnittebene wurden für die Lichtmikroskopie 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Mit einer feinen gebogenen Pinzette wurden die Schnitte auf einen mit Gelatine beschichteten sowie mit 96%igem Ethanol befeuchteten Objektträger überführt. Durch die Überschichtung mit 96%igem Ethanol und mit Hilfe zweier Haarpinsel wurden die Schnitte gestreckt. Anschließend wurden die Schnitte mit einer Polyethylenfolie bedeckt und mit einem Fotoroller auf den mit Chromalaungelatine beschichteten Objektträger gedrückt. Die in dünne Zellstofflagen eingeschlagenen Objektträger wurden übereinandergestapelt und in einer Objektträgerpresse im Trockenschrank bei 42°C 24-48 Stunden aufbewahrt.

4.1.8.3. Knochenfärbung

Um die Schnitte nachfolgend färben zu können, mußte der Kunststoff nach der Methode von Baron et al. (1983) aus den Knochenschnitten entfernt werden. Die Färbung der Schnitte erfolgte mit der Van Kossa/ McNeals Tetrachromfärbung nach Baron et al. (1983) modifiziert nach Schenk et al. (1984). Diese Methode färbt spezifisch Calciumphosphat. Durch Einbau von Silber in das kalzifizierte Gewebe entsteht eine tiefschwarze Färbung. Nicht mineralisiertes Gewebe wie Osteoid erscheint hellblau, Knorpel blau-violett. Aufgrund der starken Kontraste zwischen kalzifiziertem und nicht kalzifiziertem Gewebe ist die Van Kossa-Färbung für die automatische Bildanalyse geeignet, jedoch kann Osteoid hierbei nicht erfaßt werden.

4.1.8.4. Histomorphometrische Auswertung

Die Auswertung der Knochenschnitte erfolgte vollautomatisch mit dem Bildanalysegerät Quantimet 570 (Cambridge Instruments) und einem über eine Videokamera damit gekoppelten Stereomikroskop. Das auf dem Monitor erscheinende mikroskopische Bild des Präparates läßt sich mit Hilfe eines Computerprogramms in ein Zweifarbenbild verwandeln, d.h. die vielen Farbabstufungen des mikroskopischen Bildes werden in

entweder rot oder weiß gezeichnet. So wird kalzifizierter Knochen und Osteoid rot und der Markraum, Knorpel und aufliegende Knochenzellen weiß dargestellt. Dieses Bild läßt sich weiter bearbeiten. Es können z. B. Mikroartefakte gelöscht und kleine Risse gefüllt werden. Auf derartige Manipulationen wurde vollständig verzichtet, da sie ein hohes Fehlerpotential einbringen. Die gesamte sekundäre Spongiosa des Schnitts ist als Fläche markierbar.

Folgende Parameter wurden in dieser markierten Fläche analysiert:

Konventionelle histomorphometrische Parameter nach Parfitt (1987)

Knochenfläche (Bone area); (B.Ar [%])

-prozentualer Anteil der Knochenfläche an der gemessenen Gesamtfläche

Knochenumfang (Bone perimeter); (B.Pm [mm/ mm²])

-die Gesamtlänge des vorhandenen Knochenflächenumfangs pro mm² gemessener Fläche

Trabekuläre Separation (Tb.Sp [mm])

-durchschnittlicher Abstand der Trabekel zueinander

Trabekelfläche (Tb.Ar [mm²])

-durchschnittliche Trabekelfläche pro mm² gemessener Fläche

Trabekelanzahl (Tb.No [# / mm²])

-durchschnittliche Trabekelanzahl pro mm² gemessener Fläche

Durchschnittliche Trabekeldicke (Tb.Wi [µm])

Trabekuläre Node-Strut-Analyse nach Garrahan (1986), modifiziert nach Shen (1993)

Diese Methode ist hilfreich, um über die Konnektivität der Spongiosa eine gezieltere Aussage treffen zu können. Die trabekuläre Struktur wird zu Knotenpunkten (NODES) und Strichen (STRUTS) vereinfacht. Ein Knoten ist definiert als ein Punkt der Verknüpfung von drei oder mehreren Trabekeln. Ein freies Ende ist definiert als ein Punkt an dem kein Zusammentreffen von Trabekeln stattfindet. Struts, als die individuellen Trabekel, werden immer als Prozent der totalen Strut-Länge ausgedrückt.

Parameter der Node-Strut-Analyse:

- Anzahl der Trabekelknotenpunkte (No.Nodes [# /])
- Anzahl der freien Trabekelenden [# / mm²]
- Totale Strut-Länge (TSL [mm / mm²])
- Strut-Länge von freien Trabekelenden zu freien Trabekelenden (SL.FF [% of TSL])
- Strut-Länge von Trabekelknotenpunkten zu Trabekelknotenpunkten (SL.NN [% of TSL])
- Strut-Länge von Trabekelknotenpunkten zu freien Trabekelenden (SL.NF [% of TSL])
- Verhältnis Trabekelknotenpunkten zu freien Trabekelenden (ratio No.No/No.FE)

4.1.9. Bestimmung der Knochenmineraldichte von Ratten mit dem Quantitativen Computertomographen QCT Stratec 960A

Mit dem Quantitativen Computertomograph QCT Stratec 960A ist eine schnelle und genaue Ermittlung der Knochenmineraldichte von Ratten zu erreichen. Der zuerst in der Spongiosa der Extremitätenknochen ovariectomierter Ratten einsetzende Knochenverlust ist mit dem QCT schon bereits vier Wochen nach Ovariectomie deutlich festzustellen. QCT-Meßergebnisse für den Parameter Knochendichte lassen sich mit anderen densitometrischen Meßmethoden vergleichen (Gasser 1995, Sato 1995)).

Im Rahmen der Etablierung der Knochenmessung mit dem QCT für Labortiere wurde

1. die Reproduzierbarkeit der Messungen *in vivo* und *in vitro*,
2. die optimale Scanposition für die sekundäre Spongiosa und Kortikalis,
3. der Einfluß der Ovariectomie auf die Knochendichte untersucht (pers. Mitteilung Dr. U. Kollenkirchen; Schering AG).

Funktionsweise des QCT:

Die Absorption von Röntgenstrahlen durch ein Objekt (Knochen) liefert ein Absorptionsprofil. Durch mathematische Auswertung von möglichst vielen Absorptionsprofilen aus verschiedenen Winkelstellungen lassen sich Querschnittsbilder berechnen, die dem ursprünglichen Objekt weitgehend entsprechen. Jedem Bildpunkt ist ein entsprechender Schwächungskoeffizient zugeordnet, der in cm^{-1} angegeben wird. Durch Kalibrierung mit Phantomen bekannter Hydroxylapatit-Konzentrationen lassen sich die Schwächungskoeffizienten in Dichtewerte (mg/cm^3) umrechnen. Durch die Kalibrierung wird nur der Mineralanteil des Knochens berücksichtigt. Die Röntgenröhre arbeitet bei einer Spannung von 47,4 - 48,8 kV. Durch spezielle Filterung wird eine schmalbandige Röntgenlinie im Bereich von 38,5 keV emittiert. Das CT-Bild wird aus 72 Einzelrechnungen berechnet. Die Schichtdicke beträgt 1 mm, die Kantenlänge der Pixel kann zwischen 0,092 und 0,689 mm^2 eingestellt und somit die maximale Auflösung bestimmt werden. Die Auflösung hängt ebenso von der Messobjektgröße ab, nur kleine Objekte können mit der max. Auflösung gemessen werden. An jedem Meßtag wird zunächst kalibriert.

Messung der Rattenknochen *in vitro* und *in vivo*:

Für die *in vitro*-Messung wurde die Tibia in ein Röhrchen mit 70%igem Ethanol verbracht und in der dazugehörigen Halterung in der Gantry des QCT fixiert. Zur *in vivo* Messung wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert und der zu messende Unterschenkel in eine Haltevorrichtung gespannt, um ein Verrutschen zu vermeiden. Die Tibia wurde im QCT

mit der medialen Knochenfläche nach oben positioniert und der proximale Teil gemessen. Im ermittelten Übersichtsbild wurde eine 0-Linie proximal an den Tibia-Kopf gelegt und in einem Abstand von 4,5 mm, 5 mm und 5,5 mm drei Schichten gemessen. Da die gemessene Schichtdicke jeweils 1 mm betrug, überlappen sich die Schichten um 0,5 mm. Für die hier beschriebenen Experimente wurde nur der Parameter Trabekuläre Dichte [mg/ccm] bestimmt und ausgewertet. Die Meßdaten aller drei Schichten wurden in der Auswertung gemittelt.

4.1.10. Versuchsbeschreibungen

Versuch I

Ziel dieses Versuchs war es, den Einfluß einer unterschiedlich dosierten Östradiol-Substitution auf die Knochendichte und den Östradiol-Serumspiegel von ovariectomierten adulten Ratten zu untersuchen.

Versuchstiere: 52 zykluskontrollierte, weibliche Ratten, mindestens 12 Wochen alt

Versuchsdauer: 4 Wochen

Versuchsaufbau:

Gruppe 1	scheinoperierte Kontrolle (SHAM)	10 Tiere
Gruppe 2	OVX + 0,5 µg E ₂ / Tier/ Tag	8 Tiere
Gruppe 3	OVX + 0,3 µg E ₂ / Tier/ Tag	8 Tiere
Gruppe 4	OVX + 0,1 µg E ₂ / Tier/ Tag	8 Tiere
Gruppe 5	OVX + 0,05 µg E ₂ / Tier/ Tag	8 Tiere
Gruppe 6	ovarektomierte Kontrolle (OVX)	10 Tiere

Während des Versuchs verstarb ein Tier aus der ovariectomierten Kontrollgruppe zu Versuchsbeginn in der Narkose und jeweils ein Tier aus den Gruppen 2 und 3 bei der Blutabnahme.

Versuchsdurchführung:

Die Ratten wurden zunächst zufällig den einzelnen Versuchsgruppen zugeordnet. Zu Beginn des Versuchs wurden sie gewogen und die Spongiosadichten der Tibien am Quantitativen Computertomographen ermittelt. Zu Versuchsbeginn wurden aus jeder Gruppe die Hälfte aller eingesetzten Tiere ovariectomiert bzw. scheinoperiert, die Pumpen implantiert und Blutproben entnommen. Am nächsten Tag wurde mit der 2. Hälfte jeder Gruppe wie am Tag zuvor verfahren. Weitere Blutproben wurden zweimal wöchentlich entnommen. Nach genau 4 Wochen wurde zunächst die erste Hälfte aller Tiere in jeder Gruppe getötet, die Tier- und Uterusgewichte bestimmt und beide Tibien entnommen (linke Tibia für Spongiosadichtebestimmung am QCT, rechte Tibia für die Histologie). Im Serum wurden Östradiol und Osteocalcin bestimmt. Am folgenden Tag wurde mit den verbliebenen Tieren wie am Tag zuvor verfahren.

Versuch II

Ziel: Darstellung der Dosis-Wirkungsbeziehungen der Gestagene Levonorgestrel, Medroxyprogesteronacetat und Promegeston in Bezug auf Zyklus und Ovulation bei der adulten intakten Ratte.

Es sollte die Minimaldosis jedes Gestagens ermittelt werden, die täglich s.c. verabreicht, ausreichend ist, um eine 100%ige Ovulationshemmung über mindestens vier Wochen zu erhalten. Der Versuch II setzte sich aus drei Teilversuchen zusammen.

Versuchstiere: 3x 24 zykluskontrollierte, weibliche Ratten, mindestens 12 Wochen alt

Versuchsdauer: für jeden Teilversuch vier Wochen

Versuchsaufbau:

1. Teilversuch:

Gruppe 1:	Vehikel	
Gruppe 2:	Levonorgestrel	100 µg/ Tier/ Tag
Gruppe 3:	Levonorgestrel	30 µg/ Tier/ Tag
Gruppe 4:	Levonorgestrel	10 µg/ Tier/ Tag

2. Teilversuch:

Gruppe 1:	Vehikel	
Gruppe 2:	Medroxyprogesteronacetat	300 µg/ Tier/ Tag
Gruppe 3:	Medroxyprogesteronacetat	100 µg/ Tier/ Tag
Gruppe 4:	Medroxyprogesteronacetat	30 µg/ Tier/ Tag

3. Teilversuch:

Gruppe 1:	Vehikel	
Gruppe 2:	Promegeston	100 µg/ Tier/ Tag
Gruppe 3:	Promegeston	30 µg/ Tier/ Tag
Gruppe 4:	Promegeston	10 µg/ Tier/ Tag

Pro Gruppe wurden jeweils 6 Tiere eingesetzt.

Ein Tier (Teilversuch 1, Gruppe 3) verstarb während der Blutabnahme.

Zu Versuchsbeginn (Tag 0) wurden die sich im Proöstrus befindenden Ratten zunächst zufällig den einzelnen Versuchsgruppen zugeordnet und anschließend gewogen.

Desweiteren wurde allen Versuchstieren retroorbital Blut entnommen. Die mit den jeweiligen Gestagenlösungen beladenen osmotischen Pumpen wurden am 2. Versuchstag implantiert. Weitere retroorbitale Blutentnahmen fanden an den Tagen 8, 16 und für den ersten Teilversuch am Tag 30 (Sektionstag), die für die Teilversuche zwei und drei am Tag 28 statt. Diese Änderung im Versuchsplan war nötig, da sich am Tag 28 alle Kontrolltiere im Proöstrus befanden. Nur in diesem Zyklusstadium war die Gegenüberstellung des präovulatorischen Serumöstradiol-Maximums der Kontrolltiere zu den konstant niedrigen Werten der gestagenbehandelten Tiere sinnvoll. Es wurde im Serum die Östradiolkonzentration bestimmt. Am Tag 29 wurden alle Tiere einseitig ovariectomiert und die präparierten Tuben mikroskopisch auf Eizellen untersucht. Am Tag 30 wurden alle Ratten in einer CO₂- Box getötet, jeweils das verbliebene Ovar und der Uterus entnommen und für die Histologie in gepuffertem 4% igem Formalin fixiert. Die zweite Tube wurde präpariert und auf Eizellen untersucht. Desweiteren wurden beide Tibien von Muskeln und Bindegewebe befreit und die linke Tibia für die Histologie in 40%igem Ethanol (nach 48h Wechsel in 70%iges Ethanol) und die rechte Tibia für die QCT-Bestimmung in 70%igem Ethanol aufbewahrt. Über den gesamten Versuchszeitraum wurden die Tiere nach der im Kapitel 2.4.1. beschriebenen Methode zykluskontrolliert.

Versuch III

Ziel: Darstellung der Wirkung der Gestagene Levonorgestrel, Medroxyprogesteronacetat und Promegeston in ovulationhemmender Dosis auf die Knochendichte von adulten intakten Ratten. Es wurden die Dosierungen eingesetzt, die aufgrund der Ergebnisse des Versuchs II als ausreichend ovulationshemmend erachtet wurden.

Versuchstiere: 47 zykluskontrollierte, weibliche Ratten, mindestens 12 Wochen alt

Versuchsdauer: 7 Wochen

Versuchsaufbau:

Gruppe 1:	Vehikel-Kontrollen		16 Tiere
Gruppe 2:	Levonorgestrel	50 µg/ Tier/ Tag	8 Tiere
Gruppe 3:	Medroxyprogesteronacetat	500 µg/ Tier/ Tag	8 Tiere
Gruppe 4:	Promegeston	50 µg/ Tier/ Tag	8 Tiere
Gruppe 5:	OVX-Kontrollen		7 (8) Tiere

Ein Tier (OVX Kontrollen) verstarb zum Versuchsbeginn in der Narkose und wurde nicht nachgesetzt. Zwei Tier starben im Versuchsverlauf bei der Blutabnahme (je ein Tier in der Levonorgestrel-Gruppe und in der Promegeston-Gruppe).

Versuchsdurchführung:

Zu Versuchsbeginn (Tag 0) wurden die sich im Proöstrus befindenden Ratten zunächst zufällig den einzelnen Versuchsgruppen zugeordnet und anschließend gewogen. Jeder Ratte wurde retroorbital Blut entnommen. Die mit der jeweiligen Gestagenlösung beladenen osmotischen Pumpen wurden am Tag 1 implantiert, sieben Tiere wurden ovariectomiert. Weitere retroorbitale Blutentnahmen fanden an den Tagen 7, 15, 27, 35 und 47 statt. Es wurde im Serum Östradiol bestimmt. Nach vierundzwanzig Tagen wurden die alten Pumpen gegen neue Pumpen nach der in Kapitel 4.1.2.2. beschriebenen Methode ausgetauscht. Am Tag 48 wurden alle Tiere einseitig ovariectomiert und die präparierten Tuben mikroskopisch auf Eizellen sondiert. Am Versuchsende (Tag 49) wurden alle Ratten getötet, jeweils das verbliebene Ovar und der Uterus entnommen, das Uterusfeuchtgewicht ermittelt und für die Histologie in gepuffertem 4% igem Formalin fixiert. Die verbliebenen Tuben wurden präpariert und auf Eizellen untersucht. Desweiteren wurden beide Tibien von Muskeln und Bindegewebe befreit und die linke Tibia für die Histologie in 40%igem Ethanol (nach 48h Wechsel in 70%iges Ethanol) und die rechte Tibia für die QCT-Bestimmung in 70%igem Ethanol aufbewahrt.

Über den gesamten Versuchszeitraum wurden die Tiere nach der im Kapitel 4.1.4.1. beschriebenen Methode zyklus kontrolliert.

4.1.11. Statistik

Die Ergebnisse jedes Parameters wurden den einzelnen Versuchsgruppen zugeordnet und anschließend Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD) für jede Versuchsgruppe berechnet. Mittels einfaktorieller ANOVA wurde geprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen. Waren Unterschiede vorhanden, wurde zur Ermittlung der linearen Kontraste bei den normalverteilten Daten ein Dunnet-Test durchgeführt. Ein $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Im Versuch I wurden die behandelten Gruppen und die OVX-Kontrollgruppe gegen die SHAM-Kontrollgruppe statistisch getestet. Folgende Parameter wurden überprüft:

- *relative Körpergewichtsänderung*
- *relatives Uterusgewicht*
- *durchschnittliche Östradiolserumkonzentration über den Behandlungszeitraum (Tag 0 ausgenommen)*
- *durchschnittliche Osteocalcinsерumkonzentration über den Behandlungszeitraum (Tag 0 ausgenommen)*
- *relative Spongiosadichteänderung*
- *histomorphometrische Parameter*

Weiterhin wurden zur Ermittlung eines linearen Zusammenhanges zwischen zwei Parametern Regressionsanalysen für die Parameter Spongiosadichte und Östradiolserumkonzentration sowie für die Spongiosadichte und Osteocalcinsерumkonzentration durchgeführt.

Im Versuch II wurden die Behandlungsgruppen gegen die Vehikel- Kontrollgruppe getestet. Im Versuch III wurden die Behandlungsgruppen und die OVX- Kontrollgruppe mit der Vehikel- Kontrollgruppe sowie die Behandlungsgruppen mit der OVX- Kontrollgruppe verglichen. Folgende Parameter wurden in diesen Versuchen statistisch getestet:

- *relative Körpergewichtsänderung*
- *relatives Uterusgewicht*
- *durchschnittliche Östradiolserumkonzentration über den Behandlungszeitraum (Tag 0 ausgenommen)*
- *absolute Spongiosadichtewerte*
- *histomorphometrische Parameter*

Die Ergebnisse der Serumparameter Östradiol und Osteocalcin wurden vor der statistischen Analyse transformiert (natürlicher Logarithmus).

Das relative Uterusgewicht wurde folgendermaßen berechnet:

Rel. Uterusgewicht = Uterusfeuchtgewicht*100/ Körpergewicht_{Versuchsende}

Die relativen Änderungen der Körpergewichte und der Spongiosadichte wurden aus den Anfangs- und den Endwerten wie folgt ermittelt:

$$X_{\Delta} = [(X_{\text{Ende}} - X_{\text{Anfang}}) / X_{\text{Anfang}}] * 100$$