

5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, die Wirkung von Gestagenen unterschiedlicher Partialwirkung auf den Knochen am Tiermodell Ratte zu untersuchen. Der erste Schritt beinhaltete die Charakterisierung der Rolle des 17- β -Östradiols im Knochenstoffwechsel. Mittels Ovariectomie und anschließender Östradiol-Substitution verschiedener Dosierungen wurde der Zusammenhang zwischen Östradiol-Serumkonzentration und der Änderung der erfassten Knochenparameter beschrieben.

Im zweiten Versuch wurde die bei adulten intakten weiblichen Ratten ovulationshemmende Dosis der zu untersuchenden Gestagene ausgetestet, um in diesem Dosisbereich in einem dritten Experiment mögliche, sich längerfristig einstellende Effekte auf den Knochen zu untersuchen.

5.1. Einfluß von Ovariectomie und Östradiol-Substitution auf den Knochen der Ratte

Die Beeinflussung verschiedener Organsysteme und hormoneller Regelkreise durch einen Mangel an Ovarhormonen, läßt sich experimentell durch Ovariectomie erzielen. Eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang spielt 17- β -Östradiol. Effekte der Ovariectomie bei der adulten Ratte wie z.B. Veränderungen des Körper- und Uterusgewichtes und der Knochendichte lassen sich durch exogene 17- β -Östradiolgabe, unmittelbar nach dem Eingriff begonnen, vermeiden.

Bekannt war, daß eine Östradiol-Substitutionsdosis von mindestens 0,3 $\mu\text{g}/\text{Ratte}/\text{Tag}$ notwendig ist, um einen Verlust an Knochendichte vollständig zu verhindern (Bauss et al. 1996). Die im ersten Versuch eingesetzten Substitutionsdosierungen (0,05-0,5 $\mu\text{g}/\text{Tier}/\text{d}$) gruppieren sich um diesen bereits bekannten Wert. Damit sollte einerseits eine sichere vollständige Knochenprotektion und andererseits auch Abstufungen unvollständiger Knochenprotektion in den niedriger substituierten Gruppen erreicht werden.

Bisher wurden in der Literatur zwar Substitutionsversuche mit 17- β -Östradiol beschrieben, dabei wurde oft nur eine Dosierung getestet (Bauss et al. 1996) oder die verabreichte Östradiol-Dosis lag oftmals weit über (Wronski et al. 1988, Kalu et al. 1991, Coxam et al. 1996, Sims et al. 1996) oder weit unter der notwendigen Erhaltungsdosis (Kalu et al. 1991).

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals einen Substitutionsversuch mit verschiedenen Östradiol-Dosierungen, die den Grenzbereich der Knochendichteerhaltung bzw. des

-verlustes verdeutlichen. Desweiteren, und bisher noch nicht in diesem Umfang untersucht, wird ein Zusammenhang von Östradiol-Serumspiegel zum Knochendichteverlust in den jeweiligen Dosierungsgruppen hergestellt. Dieser Zusammenhang stellt eine wichtige Grundlage zur Interpretation der zu dieser Arbeit weiterhin durchgeführten Versuche dar.

In Versuch I dieser Arbeit führte die Ovariectomie von Ratten ohne weitere Behandlung zu einer signifikanten Körpergewichtszunahme und Uterusfeuchtgewichtabnahme im Vergleich zu den SHAM-Kontrolltieren. Unter steigender Östradiol-Gabe verringerten sich die Körpergewichtszunahmen und in höchster Östradiol-Dosierung (0,5 µg/ Tier/ Tag) lagen die Körpergewichte leicht unter denen der SHAM-Kontrollen.

Ovariectomierte Ratten zeichnen sich durch eine vermehrte Futteraufnahme und einen erniedrigten Energieverbrauch aus, die zur Verfettung der Tiere führen. Dies steht offenbar im Zusammenhang mit dem massiven Abfall der Östradiol-Serumkonzentration (Clark and Tartellin 1982, Danielsen et al. 1993, Miyakoshi et al. 1999). Eine Verringerung der Körpergewichtszunahme unter Östradiol-Gabe beobachteten auch Wronski et al. (1988) und Danielsen et al. (1993).

Ebenso wie bei den Körpergewichten konnte im Versuch I der dosisabhängige Einfluß der Östradiol-Substitution beim Parameter Uterusfeuchtgewicht gezeigt werden. Es wurde kein Unterschied zwischen den Uterusfeuchtgewichten der SHAM-Kontrolltiere und der Tiere mit einer Substitutionsdosis von 0,3 und 0,5 µg/ Tier/ Tag festgestellt.

Die Ergebnisse des Versuches I unterstützen die Arbeiten von Kalu et al. (1991), Westerlind et al. (1993) und Bauss et al. (1996). Diese stellten ebenfalls fest, daß sich der Parameter Uterusfeuchtgewicht bei ovariectomierten Ratten unter Östrogensubstitution in der Größenordnung der SHAM-Kontrolltiere wiederfand.

In diesem ersten Experiment zeigten die ovariectomierten, unbehandelten Ratten mit der rapiden Abnahme der Östradiol-Serumkonzentration eine deutliche und anhaltende Erhöhung der Osteocalcinsерumkonzentration (signifikant negative Korrelation der beiden Parameter; $R = 0,6$; $N = 51$), als Zeichen eines gestörten Knochenstoffwechsels. Osteocalcin gilt als biochemischer Parameter einer gesteigerten Formationsaktivität des Knochens (Price et al. 1980, Brown et al. 1994). Dempster et al. (1995) fanden einen durch Ovariectomie beschleunigten Knochenstoffwechsel mit einem sofortigen Anstieg der Resorptionsparameter (bis 5 Tage p.op.) und einen verzögerten Anstieg der Formation (5-10 Tage p.op.).

Durch ansteigende Östradiol-Substitutionsdosierungen (Von 0,05 µg-0,5 µg/ Tier/ Tag) konnte die Serumosteocalcinkonzentration bis auf die Werte der SHAM-Kontrollen (ca. 27 ng/ml) gesenkt werden. Dieses Ergebnis zeigt in Anlehnung an die Befunde von Price et al. (1980) die Abhängigkeit der Formation von der Östradiol-Substitutionsdosis. Die

Arbeiten von Sims et al. (1996) und Yeh et al. (1997) stehen im Einklang mit diesem Rückschluss.

Insgesamt kann festgestellt werden, daß Östradiol-Substitution bei ovariectomierten Ratten zu einer Unterdrückung des gesteigerten Knochenstoffwechsels, sowohl der Formation, als auch der Resorption führt, und damit einen vermehrten Knochenabbau verhindert.

Der in dieser Arbeit durch Ovariectomie hervorgerufenen Östrogenmangelsituation folgte ein deutlicher Knochensubstanzverlust. Innerhalb von vier Wochen verringerte sich die Spongiosadichte der unbehandelten Tiere signifikant um 30% im Vergleich zu den Ausgangswerten (siehe Kapitel Ergebnisse Abbildung 8). Dieser allgemeine Knochenbefund läßt sich anhand der histomorphometrischen Parameter näher beschreiben. Dabei zeigt sich, daß sich nicht alle untersuchten Größen gleich stark veränderten. Deutlich war der quantitative Knochenverlust in der sekundären Spongiosa anhand der Parameter „Knochenfläche“ und „Knochenumfang“ zu erkennen. Diese Kenngrößen der sekundären Spongiosa waren nach vier Wochen Behandlungszeit etwa halb so groß (11,1 % und 3,4 mm/mm²) verglichen zu den SHAM-Kontrolltieren (22,9 % und 6,3 mm/mm²)

Den Verlust an Konnektivität beschreiben unter anderem die Strut-Parameter (Garrahan et al. 1986, Shen et al. 1993, Abe et al. 1999). Bei den ovariectomierten Kontrolltieren nahm die „Zahl der Knoten“ und das „Verhältnis Knoten-Freie Enden“ ab und die „trabekuläre Separation“ signifikant zu. Aus der kaum erniedrigten „Trabekeldicke“, trotz deutlicher Abnahme der „Trabekelfläche“, läßt sich erkennen, daß der Knochenabbau nicht gleichmäßig flächig an den Trabekelplatten geschieht, sondern durch fokale Perforation von besonders tiefen Resorptionslakunen, deren Ausweitung den Umbau von Trabekelplatten zu Stäben und die vollständigen Beseitigung dieser zur Folge hat (Parfitt et al. 1983, Dempster et al. 1995). Aus großflächigen Trabekeln entstanden viele kleine Trabekelstücken. Diese Erkenntnis wird in diesem Versuch auch belegt durch die Zunahme der „Strecke Freie Enden-Freie Enden“ und die Abnahme der „Strecke Knoten-Knoten“ und der scheinbar unveränderten Trabekelanzahl. Daß aber die Resorption ganzer Trabekel stattgefunden haben muss, zeigt die deutliche Abnahme der „Gesamt-Strut-Länge“ und die Abnahme der „Anzahl der Freien Enden“ (siehe Kapitel Ergebnisse; S. 42 Tab. 3).

Anhand dieser Knochenparameter sowie der Serumparameter Osteocalcin und 17- β -Östradiol wird deutlich, daß die Ovariectomie zu einem erhöhten Knochenstoffwechsel mit einem Überwiegen der Knochenresorption über die -formation führte, der nicht nur in einem Knochendichteverlust resultierte, sondern auch die Vernetzung des trabekulären Gewebes beeinflusste. Durch die damit verbundenen Zerstörung der Mikroarchitektur der sekundären Spongiosa kommt es zu einem Stabilitätsverlust des Knochens. Dies haben die Ergebnisse der früheren Arbeit von Yeh et al. (1997) bestätigt.

Die Auswirkung der Ovariectomie auf den Rattenknochen ist in der Literatur gut beschrieben. Diese histomorphometrischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich mit den Ergebnissen von Dempster et al. (1995). Auch sie zeigten anhand der Konnektivitätsparameter den sich bei ovariectomierten Ratten einstellenden Knochenverlust. Deutlich reduziert waren hier im Vergleich zu Kontrolltieren die „Strut-Länge Knoten-Knoten“ und die „Anzahl der Knoten“, dagegen lagen die Parameter „Strut-Länge: Freie Enden-Freie Enden“ und die „trabekuläre Separation“ deutlich höher.

Die Perforation der Platten mit einem geringen Verlust an Trabekelbreite ist für eine durch Östrogenmangel induzierte Osteoporose typisch und steht im Gegensatz zum altersbezogenen Knochenverlust, bei dem vornehmlich eine Verminderung der Trabekelbreite bei gleichbleibender Trabekelanzahl stattfindet (Weinstein and Hutson 1987, Compston et al. 1989).

In der vorliegenden Arbeit wurden alle histomorphometrischen und Konnektivitätsparameter der Tibienmessung durch Östradiol-Substitution dosisabhängig beeinflusst. Allerdings waren diese Parameter nicht signifikant verschieden vom Wertebereich der SHAM-Kontrolltiere. Ebenfalls war die dosisabhängige Knochenprotektion durch Östradiol-Substitution anhand der QCT-Knochendichtewerte erkennbar.

Wronski et al. (1991), Sims et al. (1996) und Ke et al. (1997) wiesen nach, daß eine Östradiol-Substitution den durch Ovariectomie beschleunigten Knochenumsatz unterdrückt und einen Knochenverlust vollständig vermeidet. Die in diesen Studien eingesetzten Östradiol-Dosierungen ($>10\text{mg/kg KG/d}$) lagen weit über den in diesem Versuch verwendeten. Sie zeigten, daß Östradiol-Verabreichung direkt im Anschluß an den Beginn einer endogenen Östradiol-Mangelsituation den Knochen vollständig schützt. Bei ovariectomierten Tieren, bei denen eine Osteopenie bereits bestand und die anschließend substituiert wurden, konnte keine anabole Knochenwirkung festgestellt werden (Abe et al. 1993). Allerdings wurde der weitere Knochenschwund gegenüber unbehandelten OVX-Tieren gestoppt. Lane et al. (1999) fanden im Gegensatz dazu, daß der kurz nach

Ovarektomie bereits eingetretene trabekuläre Knochenverlust durch Östradiol-Applikation wieder ersetzt werden kann, aber die trabekuläre Konnektivität nicht wieder hergestellt werden konnte.

Untersuchungen (Hayashi et al. 1989, Wronski et al. 1991) zeigten, daß die Hemmung der Formation nicht nur durch Östradiol, sondern auch durch andere Resorptionshemmer wie Calcitonin und Bisphosphate erfolgen kann. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß die Hemmung der Formation ein Kopplungseffekt ist, der der Hemmung der Resorption folgt. Allerdings wurde auch von einer Stimulierung der Formation bei Östradiol-Substitution berichtet. Die in Arbeiten von Takano-Yamamoto und Rodan (1990), Tobias et al. (1991) und Chow et al. (1992) beschriebenen formationsstimulierenden Effekte von Östradiol konnten in späteren Untersuchungen (Abe et al. 1993; Westerlind et al. 1993) nicht wieder bestätigt werden. Abe et al. (1993) stellten fest, daß auch bei einer massiven Überdosierung an Östradiol keine Zunahme der Knochendichte über Werte der SHAM-Kontrolltiere hinaus erreicht werden konnte. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Arbeiten von Turner et al. (1994), Sims et al. (1996), Ke et al. (1997) und bestätigt, daß eine Östradiol-Substitution über Hemmung der Knochenresorption auch die Knochenformation hemmt. Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde der Knochendichtemessung zeigen zusammen mit den Ergebnissen der Literatur, daß Östradiol-Substitution ab einer Dosierung von 0,3 µg/ Tier/ Tag bei ovariectomierten Ratten, unmittelbar nach dem Eingriff begonnen, nicht nur den Knochendichteschwund, sondern auch den Konnektivitätsverlust sicher vermeidet.

Die Wirkungsweise von Östrogenen im Knochenstoffwechsel ist noch nicht vollständig geklärt. Vermutet wird eine suppressive Wirkung auf die am Knochenstoffwechsel teilnehmenden Cytokine (Mc Donnell & Norris 1997, Suda & Miyaura 1997, Manolagas et al. 2000). Bewiesen ist, daß der Verlust von Geschlechtshormonen (speziell Östrogene und Androgene) zu einer verstärkten Bildung von für die Knochenzellgenese verantwortlichen Cytokinen führt und es somit zu einer erhöhten Formation von Osteoklasten und Osteoblasten (Manolagas et al. 2000) kommt.

Die Literaturangaben über die Auswirkungen des Ovarhormonmangels, speziell von Östradiol bei der Ratte, sind mit Studien aus der Humanmedizin vergleichbar. Sowohl bei ovariectomierten, als auch postmenopausalen Frauen konnten Parfitt et al. (1982), Stepan et al. (1987), Suda & Miyaura (1997) neben einem beschleunigten Knochenstoffwechsel einen rapiden Knochenverlust zeigen. Yasumura et al. (1987) stellten fest, daß bei frühpostmenopausalen Frauen der Osteocalcinspiegel stark ansteigt und erst nach fünfzehn Jahren wieder Normalwerte erreicht. Bei osteoporotischen Frauen ist der Knochenstoffwechsel im Vergleich zu normalen postmenopausalen Frauen deutlich erhöht.

Der Einfluß von 17- β -Östradiol auf Struktur und Masse des Knochens ist, wie bereits beschrieben, bekannt. Unbekannt bzw. unvollständig untersucht war bisher die Beziehung zwischen Östradiol-Serumspiegel und der Knochendichte und -struktur. In dieser Arbeit zeigt der vorliegende Versuch erstmals, welche Serumkonzentration von 17- β -Östradiol minimal notwendig ist, um den Knochen der adulten ovariectomierten Ratte in seiner Masse und Struktur zu erhalten.

Für die Substitutionsdosen 0,5 μg und 0,3 μg pro Tier und Tag wurde eine vollständige Knochenprotektion erzielt. Dabei wurden über den Versuchszeitraum durchschnittliche Östradiol Serumkonzentrationen von 60 pmol/l in der 0,3 μg / Tier/ Tag-Gruppe und von 140 pmol/l in der 0,5 μg / Tier/ Tag-Gruppe bestimmt. Bei der intakten zyklischen Ratte ist die 17- β -Östradiol-Serumkonzentration abhängig vom vorliegenden Zyklustag und schwankt im Zyklus, wie bei den SHAM-Kontrolltieren im vorliegenden Versuch bestimmt, zwischen 40 und 300 pmol/l. Diese Spanne deckt sich auch mit aus der Literatur bekannten Daten (Butcher et al. 1974, Freemann et al. 1988). Daher kann für die Östradiol-Serumkonzentrationen o.g. Substitutionsdosen festgestellt werden, daß sie in diesem als physiologisch geltenden Bereich liegen. Dagegen wurde in diesem vierwöchigen Versuch in den Dosierungsgruppen von 0,1 μg und 0,05 μg pro Tier und Tag keine vollständige Knochenprotektion mehr festgestellt. Die Östradiol-Serumkonzentrationen dieser Gruppen liegen an der unteren Grenze bzw. unterhalb des oben als physiologisch angegebenen Bereichs.

Auch wenn nur ein Teil der Knochenbefundes statistisch signifikant war (vgl. Ergebnisteil, S. 41 Abbildung 10), wird deutlich, daß im Bereich von ca. 50 pmol/l 17- β -Östradiol im Serum eine kritisch Grenze in Bezug zur Knochendichte erreicht wird. Wenn die Östradiol-Serumkonzentration über einen längeren Zeitraum unter diesen Grenzbereichs abfällt, sind negative Effekte auf Struktur und Dichte des Knochens zu erwarten. Umgekehrt ist ein Östradiol-Serumspiegel von 60 pmol/l und mehr knochenprotektiv bei der adulten ovariectomierten Ratte.

Aus diesen Befunden ergibt sich die Frage, ob zur vollständigen Knochenerhaltung eine bestimmte konstante Östradiol-Serumkonzentration längerfristig nicht unterschritten werden darf, oder ob es, an die Östradiol-Serumschwankungen im Zyklus der intakten Ratte angepaßt, ausreicht, nur jeden vierten Tag Östradiol zu substituieren.

In unveröffentlichten Versuchen der Schering AG wurde die Möglichkeit, die Knochendichte nach Ovariectomie durch Östradiol-Gaben in größeren Zeitabständen (2, 3 und 4 Tage Abstand) zu erhalten, untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß mit längeren Substitutionsabständen die Dosierung gesteigert werden muss. So wurde eine vollständige Protektion erst mit 1 μg / Tier, jeden vierten Tag verabreicht, erreicht.

Lane et al. (1999) zeigten, daß die Applikation von 10 µg/kg dreimal wöchentlich zu Erhalt der Knochendichte ovariectomierter Ratten auf SHAM-Kontrolltier-Niveau führte.

Jedoch wurden die Östradiol-Serumspiegel über den Versuchszeitraum nicht verfolgt und längere Substitutionspausen nicht überprüft. Sims et al. (1996) untersuchte Einfluß einer Östradiol-Applikation von 20 µg/kg Körpergewicht auf den Östradiol-Serumspiegel ovariectomierter Tiere und fand vierundzwanzig Stunden nach Applikation keinen höheren Östradiol Serumspiegel als bei den Vehikel-behandelten OVX-Ratten. Es ist deshalb davon auszugehen, daß bei einer Östradiol-Applikation jeden vierten Tag nur jeweils am Applikationstag eine knochenprotektive Östradiol-Serumkonzentration vorliegt.

Die Vermutung, daß nicht unbedingt eine kontinuierliche Östradiol-Serumkonzentrationen über 50 pmol/l vorliegen muss, um eine vollständige Knochenprotektion zu erreichen, sollte in einem zukünftigen Experiment abgeklärt werden.

Der günstige Einfluß der Östrogensersatztherapien bei postmenopausalen und ovariectomierten Frauen u.a. zur Vermeidung von Knochendichteverlusten ist unbestritten. Eine wichtige Frage war die nach der niedrigsten Dosierung bei voller Knochenprotektion, um die bekannten Nebenwirkungen von Östradiol möglichst zu minimieren. Christiansen und Lindsay (1990) fanden, daß die optimal knochenprotektive Östradiol-Substitutionsdosis zwischen 1-2 mg Östradiolvalerat pro Tag, oral verabreicht, liegt. Östradiol-Serumkonzentrationen wurden auch in diesem Versuch nicht bestimmt. Reginster et al. (1992) zeigten, daß ein Östradiol-Serumspiegel von 60-90pg/ml knochenprotektiv bei postmenopausalen Frauen wirkte. Dieser Serumspiegel war mit einer Dosis von 1,5-2,0 mg Östradiolvalerat täglich oral einzustellen. Frauen erreichen diesen Serumspiegel in der frühen folliculären Phase des Zyklus. Holland et al. (1993) konnten mit einer Kombination von 2 mg Östradiolvalerat und 75 µg Levonorgestrel, postmenopausalen Frauen oral verabreicht, eine Knochenprotektion ebenfalls bei einem Östradiol-Serumspiegel von etwa 90 pg/ml feststellen.

Es läßt sich schlussfolgern, daß bei der weiblichen Ratte und bei der Frau bereits minimale Östradiol-Serumkonzentrationen, d.h. die innerhalb der Spannbreite der Östradiol-Serumkonzentration des normalen Zyklusgeschehens liegen, ausreichend sind, um vor einem Knochendichteverlust zu schützen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine Östrogenmangelsituation, simuliert durch Ovariectomie, bei Ratten neben einer Körpergewichtszunahme und Uterusfeuchtgewichtsabnahme zu Veränderungen von knochenspezifischen Serumparametern, zur Verringerung der Spongiosadichte und zum Konnektivitätsverlust in der Spongiosastruktur führt. Diese Effekte können durch Erhaltung einer Östradiol-

Serumkonzentration von mindestens 60 pmol/l mittels Substitution von 0,3 µg 17-β-Östradiol /Ratte und Tag kompensiert werden.

5.2. Findung der ovulationshemmenden Dosis der Gestagene Medroxyprogesteronacetat, Levonorgestrel und Promegeston

Ziel des zweiten Versuchs war, die für die Ratte ovulationshemmende Dosis der Gestagene Medroxyprogesteronacetat, Levonorgestrel und Promegeston zu finden. Danach sollte in einem weiteren, längeren Versuch der Einfluß der durch Ovulationshemmung verursachten Absenkung der Östradiolserumkonzentration auf die Knochendichte abgeklärt werden. Da eine Anwendung ovulationshemmender Kontrazeptiva immer in der geringstnötigen Dosis erfolgen sollte, musste auch für die zu testenden Gestagene am Tiermodell Ratte ein möglichst niedriger Dosisbereich gefunden werden, der eine Ovulationshemmung dauerhaft garantiert. Für jedes Gestagen wurden deshalb drei Dosierungsstufen über vier Wochen geprüft. Die in den Versuchen zu dieser Arbeit angewendeten Gestagene werden kommerziell zur Empfängnisverhütung und für andere Indikationen z. B. Dermatika eingesetzt.

Mit allen drei Gestagenen wurde in wenigstens einer Dosierungsstufe bei allen Ratten eine Ovulationshemmung erzielt. Die Kontrolle der Ovulationshemmung erfolgte durch täglichen vaginalen Abstrich und Tubenquetschung am Versuchende (Siehe Material & Methoden S. 18). Ein Abfall der Östradiolserumkonzentration ist kein alleiniges Indiz für eine Ovulationshemmung. So wurde bei den nicht ovulationsgehemmten Tieren der Levonorgestrelgruppe mit einer Dosierung von 30 µg pro Tier und Tag eine durchschnittlich geringere Östradiolserumkonzentration ermittelt, als bei den ovulationsgehemmten Tieren der Medroxyprogesterongruppe mit einer Dosierung von 300 µg pro Tier und Tag. Die Östradiolserumkonzentration sollte demzufolge nur im Zusammenhang mit oben genannten Methoden zur Beurteilung einer Ovulationshemmung mit herangezogen werden.

Deutlich war ein Einfluß der Ovulationshemmung durch die drei Gestagene auf die Östradiolserumkonzentration festzustellen. So fiel sie in der Levonorgestrelgruppe unter 50 pmol/l und lag in der Medroxyprogesteronacetatgruppe nicht höher als durchschnittlich 90 pmol/l. Die Werte der Promegestongruppen gliedern sich mit durchschnittlich 60 pmol/l zwischen den beiden oben genannten Werten ein. Alle Östradiolserumkonzentrationen liegen innerhalb der Spannbreite zyklischer Tiere, wobei der Wert von 50 pmol/l in den untersten Bereich eingeordnet werden muß. Diese Ergebnisse zeigen erstmals den

Zusammenhang von Östradiolserumkonzentration und ovulationshemmender Wirkung von Gestagenen bei Ratten.

Im Vergleich dazu wurde für Frauen, die orale Kontrazeptiva anwenden, festgestellt, daß die Östradiolserumkonzentrationen deutlich unterhalb des Normbereichs liegen, die Frauen innerhalb eines physiologischen Menstruationszyklusses zeigen (Ling et al. 1985, Jung-Hoffmann et al. 1988). Widersprüchlich sind die Ergebnisse bei der Anwendung des Depotgestagens Medroxyprogesteronacetat. Cundy et al. (1991) fanden bei DMPA-Anwenderinnen Werte, die unterhalb des Normbereichs zyklischer Frauen lagen, während Mishell et al. (1972) und Ortiz et al. (1976) über Östradiol-Serumspiegel im unteren Bereich der zyklischen Schwankungen berichteten.

Ein signifikanter Einfluß der drei Gestagene auf die Knochendichte war nach vierwöchiger Versuchsdauer in keiner Gruppe mit Ovulationshemmung festzustellen. Allerdings ließen sich Verringerungen der Knochendichte in den Promegeston-Gruppen und in der Medroxyprogesteronacetat-Gruppe vermuten.

Der Versuch II diente zur Findung der ovulationshemmenden Dosis der in der vorliegenden Arbeit getesteten Gestagene. Die minimale Dosis für eine vollständige Ovulationshemmung bei der reproduktionsaktiven Ratte lag für Levonorgestrel bei 100, für Medroxyprogesteronacetat bei 300 und für Promegeston bei 30 µg pro Tier und Tag in diesem Versuch.

5.3. Wirkung siebenwöchiger Applikation der Gestagene Medroxyprogesteronacetat, Promegeston und Levonorgestrel in ovulationshemmender Dosierung auf die Knochendichte adulter intakter weiblicher Ratten

Ziel des dritten Experimentes der vorliegenden Arbeit war, den Einfluß der Gestagene Medroxyprogesteronacetat, Promegeston und Levonorgestrel in ovulationshemmender Dosis auf die Knochendichte zu untersuchen. Die Wahl der zur Anwendung gebrachten Dosierungen erfolgte unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Versuch II sowie früherer Schering-interner Versuche. Für Medroxyprogesteronacetat und für Promegeston wurden mit 500 bzw 50µg/Tier/Tag geringfügig höhere Dosierungen als im Versuch II ermittelt gewählt. Für Levonorgestrel lag die in diesem Versuch eingesetzte Dosis von 50µg/Tier/Tag unter der im Versuch II ermittelten ovulationshemmenden Dosis, jedoch höher als die nächst niedrigere, getestete Dosis von 30µg/Tier/Tag.

Die Applikation von allen drei Gestagenen führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem deutlichen Zuwachs an Körpermasse. Eine Erhöhung des Körpergewichtes intakter weiblicher Ratten unter GestagenEinfluß wurden von Hervey & Hervey (1967) und Shirling et al. (1981) beobachtet. Dieser Effekt von Gestagenen wurde von den Autoren auf eine verstärkte Insulinausschüttung mit entsprechender Wirkung auf den

Fettstoffwechsel zurückgeführt. Desweiteren kann ein anaboler Effekt der androgenen Partialwirkung der Gestagene Levonorgestrel und Medroxyprogesteronacetat für einen signifikanten Anstieg der Körpergewichte verantwortlich gemacht werden. Die Tiere der Promegeston-Gruppe (keine androgene Partialwirkung) waren insgesamt auch schwerer, doch wurde der Unterschied zur intakten Kontrollgruppe nicht signifikant.

Das in allen drei Gruppen gegenüber der intakten Kontrollgruppe festgestellte, signifikant niedrigere Uterusgewicht ist ein antiöstrogener Effekt der Gestagene, der sich vor allem in einer Hemmung des Uteruswachstums und der Proliferation des Endometriums bemerkbar macht (Taubert & Kuhl 1995).

Trotz niedriger Östradiol-Serumspiegel waren leider nicht alle Tiere der Levonorgestrel-Gruppe vollständig ovulationsgehemmt. Dies zeigt erneut, daß der Östradiol-Serumspiegel allein nicht ausreicht, um eine Ovulationshemmung zu beurteilen.

In allen drei Behandlungsgruppen befanden sich die Östradiol-Serumspiegel über den Versuchszeitraum relativ konstant um 80 pmol/l, einem Wert, der bei der reproduktionsaktiven Ratte in den Zyklusstadien Metöstrus und Diöstrus erreicht wird (siehe dazu auch S. 37 Abbildung 7 Östradiolserumkonzentrationen der SHAM-Kontrolltiere). Die Knochendichte wurde durch die Gestagenverabreichung in keiner Behandlungsgruppe beeinflusst. Der Knochendichteverlust der ovariectomierten Kontrollgruppe war mit einer signifikant geringeren Östradiolserumkonzentration (30 pmol/l) korreliert und reproduzierte damit die Ergebnisse des Versuchs I.

Bezugnehmend auf die Rückschlüsse des Versuchs I kann auch im dritten Experiment bestätigt werden, daß eine Wirkung auf die Knochendichte nur dann beobachtet wird, wenn der Östradiol-Serumspiegel längerfristig unter den Wert von 50 pmol/l sinkt.

Die Wirkungsweise ovulationshemmender Kontrazeptiva beruht u. a. auf der Hemmung der Gonadotropin-Releasing-Hormone und der Gonadotropinsekretion, sowohl durch die östrogene, als auch die gestagene Komponente. Aufgrund der Störung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse durch exogene Östrogen- und/oder Gestagenverabreichung kommt es zu einer dauerhaften Absenkung der endogenen Östradiolserumkonzentration (Gaspard et al. 1983). Ob eine derartige Suppression durch Gestagenapplikation auch bei der intakten weiblichen Ratte möglich ist, war bisher noch nicht bekannt. Die in diesem Experiment eingesetzten Dosierungen reichten nicht aus, um die Östradiolserumkonzentrationen auf Werte zu senken, wie sie durch längerfristige Behandlung mit GnRH-Agonisten oder Kastration erreicht werden. Ob dies überhaupt mit Gestagenen möglich ist, bleibt zu klären. Mit Verabreichung von GnRH-Agonisten ließ sich ein massiver Abfall an Ovarhormonen im Serum weiblicher Ratten erreichen (Katsuki et al. 1998). Waibel-Treber et al. (1989), Dawood et al. (1994) und Cann et al. (1998)

berichteten über den klinischen Einsatz von GnRH-Agonisten zur Endometriosebehandlung in Zusammenhang mit einem progressiven Knochenverlust als Nebenwirkung dieser Behandlung.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß mit den eingesetzten Dosierungen der drei Gestagene keine massive Absenkung der Östradiol-Serumkonzentration auf das Niveau ovariectomierter Ratten erreicht wurde. Demzufolge war auch kein Effekt auf die Knochendichte zu erkennen, was aufgrund der Ergebnisse des Versuchs auch nicht zu erwarten war.

Neben der in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Verabreichung von Gestagenen an intakte weibliche Ratten, gibt es eine Vielzahl an humanmedizinischen Studien, die zu kontroversen Ergebnissen in Bezug auf den Einfluß oraler Kontrazeptiva auf die Knochendichte kamen. Einige Studien zeigten bei jungen Anwenderinnen oraler Kontrazeptiva einen positiven Knochendichteeffekt (Audran et al. 1986, Lindsay et al. 1986, Recker et al. 1992, Hergenröder et al. 1997). Enzelsberger et al. (1989) und Michaëlsson et al. (1999) berichteten von einem positiven Einfluß langzeitiger Einnahme oraler Kontrazeptiva in den reproduktionsaktiven Jahren als Prophylaxe gegen Osteoporose im Klimakterium. Lloyd et al. (1988) und Mac Dougall et al. (1999) konnten keinen Einfluß langjähriger Pilleneinnahme auf die Knochendichte prämenopausaler Frauen feststellen. In diesen Studien liegt der Östrogenanteil der oralen Kontrazeptiva meistens über 30 µg Ethinylöstradiol pro Pilleneinheit. Garnerio et al. (1995) zeigte in diesem Zusammenhang, daß prämenopausale Nutzerinnen von oralen Kontrazeptiva mit 30 µg Ethinylöstradiol einen erniedrigten Knochenstoffwechsel aufwiesen.

In Studien von Volpe et al. (1993) und Mais et al. (1993) wurde die Wirkung oraler Kontrazeptiva mit 20 µg Ethinylöstradiol auf die Knochendichte junger Frauen untersucht und kein Effekt gefunden. Polatti et al. (1995) zeigten jedoch, daß bei dieser Dosierung eine direkte Beeinflussung der Knochenmasse sehr junger Frauen zwar nicht festgestellt werden konnte, aber im Gegensatz zur Kontrollgruppe, die ihre Knochendichte signifikant über Beobachtungszeitraum erhöhte, blieb die der oralen Kontrazeptiva Anwenderinnen unverändert. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie von Paoletti et al. (2000) zeigte, daß auch niedrigst dosierte orale Kontrazeptiva mit 20 µg Ethinylöstradiol plus der Gestagenkomponente Gestoden die Knochenresorption in jungen Frauen reduzieren.

Die Frage nach der Mindestmenge Ethinylöstradiol pro Pilleneinheit, um die Knochendichte zu erhalten, könnten Untersuchungen von Horsmen et al. (1983) und Speroff et al. (1996) beantworten. Allerdings kommen beide zu einem nicht ganz übereinstimmenden Ergebnis. Horsmen et al. (1983) untersuchten an menopausalen Frauen den Einfluß verschiedener Dosierungen Ethinylöstradiol ohne gestagene Komponenten und

konnten bei Dosierungen unter 15 µg einen Knochenmassenverlust feststellen. Im Gegensatz dazu wurde bei Dosierungen über 25 µg, eine Knochendichtezunahme beobachtet. Speroff et al. (1996) behandelten postmenopausale Frauen mit 5-10 µg Ethinylöstradiol und stellten bereits mit einer Dosierung von 10 µg Ethinylöstradiol eine knochenprotektive Wirkung fest.

Diese Untersuchungen zeigen, daß offenbar geringere Mengen der östrogenen Komponente Ethinylöstradiol die Knochendichte bei postmenopausalen Frauen positiv beeinflussen und läßt den Rückschluss zu, daß selbst niedrigst dosierte orale Kontrazeptiva (Ethinylöstradiol = 20 µg) knochenprotektiv auch bei jungen Anwenderinnen wirken. Diese Schlussfolgerung steht auch im Einklang mit Paoletti et al. (2000) und anderen der o.g. Studien. Jedoch sollte ein Einsatz oraler Kontrazeptiva mit einer Dosis der östrogenen Komponente von 15 µg und weniger langfristig nicht empfohlen werden, ohne die Knochendichte in regelmäßigen Abständen zu kontrollieren.

Nicht vollständig geklärt ist die Bedeutung des Einflusses der gestagenen Komponente oraler Kontrazeptiva auf die Knochendichte. Bisher wurde der Einfluß von Gestagenen als Ersatztherapie bei Osteoporose von wirkungslos (Gallagher et al. 1991) bis positiv (Lindsay et al. 1978, Gallagher et al. 1990, De Cherney et al. 1993) beschrieben, wobei mit steigender androgener Partialwirkung der Gestagene der positive Einfluß offenbar überwiegt. Gallagher & Kable (1991) zeigten, daß mit dem alleinigen Einsatz von MPA bei postmenopausalen Frauen ein Knochendichteverlust zwar nicht so erfolgreich verhindert werden konnte, wie mit einem Östrogenpräparat, aber ein signifikant-knochenprotektiver Effekt im Vergleich zur Placebogruppe auftrat. Einen ähnlichen, aber nicht signifikanten Effekt konnten Isserow et al. (1995) mit der Verabreichung von MPA an ovariectomierte Ratten erreichen. Trémollières et al. (1992) ermittelte einen direkten Einfluß von Progesteron und Promegeston auf die Knochenformation. In einer weiteren Studie stellten Trémollières et al. (1993) fest, daß auch der alleinige Einsatz eines nichtandrogenen Gestagens (Promegeston) teilweise frühen postmenopausalen Knochenverlust verhindert. Turner et al. (1994) vermuten, daß Progesteron den inhibierenden Effekt des Östradiols auf die Knochenformation antagonisiert.

Die Wirkung der verschiedenen synthetischen Gestagene auf die Knochendichte läßt sich unter anderem mit der unterschiedlichen Bindungsaffinität zu verschiedenen Steroidrezeptoren, speziell zum Androgenrezeptor erklären. Knauth & Habenicht (1998) demonstrierten, daß die androgene Partialwirkung des Gestagens Levonorgestrel und nicht seine gestagene Aktivität den protektiven Effekt auf die Knochendichte ovariectomierter Ratten ausübt. Stark androgene Gestagene zeigen somit einen anabolen Effekt auf den Knochen. Lea et al. (1999) konnten mit Antiöstrogen einen Knochenverlust bei weiblichen

Ratten hervorrufen. Eine Steigerung dieses Knochenverlustes bis auf Werte ovariectomierter Ratten konnte erst mit einem zusätzlichen Antiandrogen (Casodex) erreicht werden. Dieses Ergebnis verdeutlicht die knochenprotektive Rolle der Androgene und damit auch der stark androgenen Gestagene im Knochenstoffwechsel. Weiterhin lassen die Ergebnisse dieses Experiments vermuten, daß die Wirkung der Androgene direkt auf den Knochenstoffwechsel erfolgt und nicht über eine Umwandlung in Östradiol.

Ebenfalls kann die schwach östrogene Wirkung einiger Nortestosteron-Derivate für einen positiven Einfluß auf den Knochenstoffwechsel verantwortlich gemacht werden. So wird durch Aromatisierung ein geringer Teil von Norethisteronacetat zu Ethinylöstradiol (Reed et al. 1973) und von Levonorgestrel zu anderen ethinylierten Östrogenen (Sisenwine et al. 1974) metabolisiert. Lange bekannt ist, daß der alleinige Einsatz von Norethisteronacetat einen positiven Knocheneffekt bei postmenopausalen Frauen zeigt. Williams et al. (1990) konnten mit nur 5 µg Ethinylöstradiol + 0,5 mg Norethisteronacetat bei postmenopausalen Frauen über 12 Monate eine Zunahme der Knochendichte von 7 % erreichen. Offensichtlich läßt sich mit dem Einsatz entsprechender Gestagene die knochenprotektive Wirkung von Ethinylöstradiol verstärken.

Es ergibt sich die Frage nach dem Einfluß reiner gestagener Kontrazeption bei langfristiger Anwendung auf die Knochendichte, da es zur Entwicklung eines ausgeprägten Hypoöstrogenismus kommt.

Eine besonders gebräuchliche Form von Gestagenkontrazeption ist die in Depotform. Hier finden teilweise auch die in diesem Versuch eingesetzten Gestagene Anwendung, einmal als Depotmedroxyprogesteronacetat (ölige intramuskuläre Injektion, Provera®) und Levonorgestrel (Norplant^R) als subcutan zu implantierende Kapsel. Während mit der Anwendung von DMPA eine vollständige Ovulationshemmung erreicht wird, ist bei Norplant^R -Anwenderinnen nur teilweise eine Hemmung der Ovulation zu beobachten (Brache et al. 1990). Norplant® bewirkt neben einer Ovulationshemmung in der Anfangsphase der Nutzung zwar eine Störung der Follikelreifung sowie einen gestörten Endometriumaufbau, später jedoch keine vollständige Hemmung der Ovulation mehr (Spona et al. 1979, Taubert und Kuhl 1995). Aufgrund der nur unvollständigen Hemmung der Ovulation ist davon auszugehen, daß eine dauerhafte Absenkung des Östradiol-Serumspiegels mit Eintritt einer Östradiol-Mangelsituation bei der Anwendung des Norplantsystems nicht stattfindet und damit die Knochendichte nicht beeinflußt wird. Diese Theorie wird untermauert von Di et al. (1999), welche zeigten, daß die Knochenmasse junger Frauen von Levonorgestrel-haltigen Implantaten nicht beeinflußt wird.

Widersprüchliche Meldungen in Bezug auf die Beeinflussung der Knochendichte gibt es bei der Kontrazeption mit Depotmedroxyprogesteronacetat (DMPA). Gbolade et al. (1998) und Taneepanichskul et al. (1997) fanden trotz durchschnittlich niedriger Östradiol-Serumkonzentrationen über Jahre der Anwendung keinen signifikanten Einfluß auf die Knochendichte bei DMPA-Anwenderinnen. Auffällig sind bei dieser Studie die großen Schwankungen der Östradiol-Serumkonzentrationen der DMPA-Gruppe. Im Vergleich zu Frauen, die keine hormonelle Kontrazeption anwendeten, lagen die Östradiol Serumkonzentrationen von DMPA-Anwenderinnen deutlich tiefer, befanden sich aber gemessen an der Spannweite der Östradiol Serumkonzentrationen im normalen Zyklus der Frau noch im unteren Bereich.

Im Gegensatz dazu berichteten Cundy et al. (1991) über eine negative Wirkung auf die Knochendichte. Sie fanden bei DMPA-Anwenderinnen Östradiol-Serumkonzentrationen, die unterhalb der o. g. Spannweite der zyklischen Frau lagen, jedoch höher als die postmenopausaler Frauen. Proportional dazu verhielten sich die Knochendichten. Die der DMPA-Anwenderinnen fielen signifikant im Gegensatz zu den Kontrollpersonen, doch im gleichen Zeitraum nicht so stark, wie die unbehandelten postmenopausaler Frauen. Diese Studie sollte kritisch betrachtet werden, da sich in der DMPA-Gruppe durchschnittlich mehr Raucherinnen befanden, als in den andern beiden Gruppen. Rauchen zählt zu den Prädispositionen einer Osteoporoseerkrankung. Des Weiteren waren keine Ausgangsknochenwerte bekannt. In einer zweiten Studie konnte Cundy et al. (1994) zeigen, daß die Knochenverluste bei intakten premenopausalen Frauen nach Absetzen langjähriger DMPA-Applikation reversibel sind. Or-Walker et al. (1998) untersuchten den Einfluß früherer DMPA-Anwendung bei postmenopausalen Frauen auf die Knochendichte und fanden keinen Unterschied zu Nichtanwenderinnen.

Weiterhin beschrieben Tang et al. (1999) einen negativen Einfluß des DMPA-Gebrauchs über 5 Jahre auf die Knochendichte chinesischer Frauen. Paiva et al. (1998) zeigten, daß bei DMPA-Anwendung eine niedrigere Knochendichte mit der Dauer einer sich einstellenden Amenorrhoe korreliert ist.

Die vorliegende Arbeit liefert einen Betrag zur Klärung der beschriebenen Problematik. Die deutlichen Hinweise, daß im Tiermodell der Ratte keine Knochendichtebeeinflussung durch Gestagene erzielt werden kann, sollte auch Rückschlüsse auf die humanmedizinische Problematik zulassen. Die kürzlich veröffentlichte Arbeit von Kuohung et al. (2000) gibt einen Überblick über bisher durchgeführte Studien, die Beziehung von niedrig dosierten oralen Kontrazeptiva zur Knochendichte untersuchten. Deutlich zeigt sich ein überwiegend günstiger Einfluß oraler Kontrazeptiva auf die Entwicklung der Knochendichte. Ein Rückschluß für Depotmedroxyprogesteronacetat läßt sich aus der vorliegenden Arbeit nur

bedingt ziehen. In der vorliegenden Arbeit konnte mit MPA in ovulationshemmender Dosis experimentell kein Hypoöstrogenismus bei der weiblichen Ratte erzielt werden. Die durchschnittlich niedrigeren Östradiol-Serumkonzentrationen bei DMPA-Anwenderinnen im Vergleich zu Frauen, die keine Kontrazeptiva benutzen, zeigten in den o.g. Studien individuell große Schwankungen, und Effekte auf den Knochen waren oft erst nach langjähriger Anwendung zu beobachten.

Ein zukünftiger Versuch muss klären, ob mit deutlich höherer Dosierung der Gestagene eine stärkere Suppression des Östradiol-Serumspiegels (<50 pmol/l) bei der weiblichen intakten Ratte möglich ist. Der Einfluß der Gestagenanwendung auf die Knochendichte sollte dann mindestens über einen Zeitraum von sechs Monaten geprüft werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß keines der in der vorliegenden Arbeit getesteten Gestagene, in ovulationhemmender Dosis über sieben Wochen an Ratten verabreicht, zu einer Beeinflussung der Knochendichte führte. Dieses Ergebnis stand in enger Beziehung zur Östradiolserumkonzentration über den Versuchsverlauf. Hier zeigte sich, daß in allen Behandlungsgruppen zwar die präovulatorischen Östradiolspitzen verhindert werden konnten, aber keine dauerhafte Absenkung der Östradiolserumkonzentrationen bis unter den in Versuch I festgelegten, für die Knochendichte kritischen Wert von 50 pmol/l erreicht wurde.

Niedrigdosierte ovulationshemmende Gestagene verursachen bei der adulten Ratte keinen Hypoöstrogenismus, deswegen ist ein Östrogenmangel-bedingter Effekt auf die Knochendichte in diesem Experiment nicht aufgetreten. Ein Einfluß androgener Partialeigenschaften auf die Knochendichte konnte nicht festgestellt werden.