

Aus dem
Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. W. A. Rambeck

**Untersuchungen zum Knochenstoffwechsel am immunkastrierten Minipig -
Erprobung eines nichtinvasiven Osteoporosemodells**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Anne Fröhlke
aus Köln

München
2009

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Rambeck
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Ammer

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

Für Britta, Julia und Philip

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Aufgabenstellung	1
2. Literatur	3
2.1 Hormonhaushalt und sein Einfluss auf den Knochen	3
2.1.1. Aufbau von Hormonen	3
2.1.2 Steuerung und Regelkreisläufe	4
2.1.3 Einzelne Hormone und ihre Wirkung auf den Knochen	4
2.1.3.1 Parathormon	4
2.1.3.2 Calcitonin	5
2.1.3.3 Calcitriol	5
2.1.3.4 Somatotropin	6
2.1.3.5 Trijodthyronin (T3)	7
2.1.4 Sexualhormone	8
2.1.4.1 Östrogene	9
2.1.4.2 Androgene	12
2.1.5 Beeinflussung der Sexualhormonproduktion in der Veterinärmedizin	13
2.1.5.1 Ovariectomie im Tiermodell	14
2.1.5.2 Orchiektomie	18
2.1.5.2.1 Tiermodell	18
2.1.5.2.2 Nutztierproduktion	19
2.1.5.3 Immunologische Unterdrückung der Sexualhormonproduktion („Immunkastration“)	19
2.2 Imbalancen des Hormonhaushaltes	21
2.2.1 Hypothyreose	21
2.2.2 Hyperthyreose	22
2.2.3 Postmenopausale Osteoporose	23
2.2.4 Osteoporose beim Mann	24
2.2.5 Hypogonadismus	26
2.3 Hormoneinsatz	28
2.3.1 Nutzen - Risiko	28
2.3.2 Osteoporose	29
2.3.3 Mammarkarzinome	30
2.3.4 Kolorektale Karzinome	30
2.3.5 Endometriumkarzinome	31
2.3.6 Kardiovaskuläre Erkrankungen	31

2.3.7 Thromboserisiken	32
2.3.8 Hirninsulte	32
2.3.9 Gallenwegserkrankungen	33
2.3.10 Testosteronsubstitution bei Hypogonadismus	33
2.4 Knochenstoffwechsel	34
2.4.1 Knochenformation	34
2.4.1.1 Osteocalcin	34
2.4.1.2 Knochenspezifische Alkalische Phosphatase	35
2.4.2 Knochenresorption	36
2.4.2.1 Crosslaps	36
2.4.2.2 Pyridinolin und Desoxypyridinolin (Kollagen-Crosslinks)	37
3. Material und Methoden	39
3.1 Ziel des Versuches	39
3.2 Versuchsdurchführung	39
3.3 Haltung und Fütterung	40
3.4 Applikation des Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Analogons („Immunkastration“)	41
3.5 Serumgewinnung	42
3.6 Bestimmung der Östradiol – Konzentration	42
3.7 Bestimmung des Osteocalcins	43
3.8 Bestimmung der Crosslaps	44
3.9 Statistische Auswertung	45
4. Ergebnisse	46
4.1 Allgemeinbefinden und Gewichtsentwicklung	46
4.2 17- β -Östradiol	47
4.3 Osteocalcin	51
4.4 Crosslaps	55
5. Diskussion	59
5.1 Ausgewähltes Modell	59
5.2 Gewichtsentwicklung der Minipigs	61
5.3 Hormonhaushalt	62
5.4 Knochenstoffwechsel	66
5.4.1 Knochenmarkerbestimmung	66
5.4.2 Verlauf der Knochenmarker	67
6. Zusammenfassung	71

7. Summary	73
8. Literaturverzeichnis	75
9. Tabellenverzeichnis	97
10. Danksagung	99

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
ADAM	Androgen Defizit Syndrom des alternden Mannes
AR	Androgenrezeptor
BMC	Bone mineral content
BMD	Bone mineral density
BMI	Body mass index
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
Ca	Calcium
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DVO	Dachverband Deutschsprachiger Wissenschaftlicher Gesellschaften für Osteologie
E ₂	Östradiol
ER	Östrogenrezeptor
ERT	Estrogenmonotherapie
ESPRIT	Estrogen for Prevention of Re-Infarct Trial
FDA	Food and Drug Administration
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
ft4	Freies Thyronin
GH-ICH	Growthhormone-Inhibiting-Hormone
GH-RH	Growthhormone-Releasing-Hormone
GLA	γ-Carboxyglutaminsäurerest
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
H2 Blocker	Antagonist am Histamin-Rezeptor 2
HDL	High Density Lipoprotein
HERS	Heart and Estrogen / Progestin Study
hGH	Human Growth Hormon
HHL	Hypophysenhinterlappen

HRT	Estrogen – Gestagen – Präparat
HVL	Hypophysenvorderlappen
IGF – 1	Insulin-like-Growth Factor 1
IL – 1	Interleukin 1
i. m.	intra muskulär
kD	Kilo-Dalton
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
M.	Musculus
MMAS	Massachussetts Male Aging Study
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MSC	mesenchymale Stammzellen
MPA	Medroxyprogesteronacetat
NIH	National Institutes of Health
NHS	National Health Service
OVX	ovariectomiert
P	Phosphor
PKC	Proteinkinase C
PTH	Parathyreoidhormon
RANKL	Rezeptor Aktivator des NF- κ B- Liganden
SD	Standardabweichung
SHBG	Sexual hormone binding globuline
Src	Sh-Domänen-Rezeptor-Kinase
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
TGF	Transforming Growth Factor
TSH	Thyreidea-stimulierendes Hormon
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
WHI	Woman´s Health Initiative
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Gegenwärtig gilt der Einsatz von Tiermodellen - im Besonderen auch von höheren Wirbeltieren - in der biomedizinischen Forschung immer noch als unentbehrlich, wenngleich nicht nur aus ethischen und tierschutzrechtlichen Gründen kontinuierlich an der Entwicklung von Ersatzmethoden, wie z.B. dem Einsatz von Zellkulturen, gearbeitet wird, um den Umfang der Tierversuche auf einem möglichst niedrigen Niveau zu halten.

In der Humanmedizin ist vor der Einführung neuer Therapeutika die Erprobung an Modelltieren verbindlich vorgeschrieben. Die FDA (Food and Drug Administration) fordert beispielsweise, dass Mittel zur Prävention oder Therapie der Osteoporose sowohl an einem „small“ als auch an einem „large animal model“ geprüft werden. Bislang basiert das Osteoporosemodell auf dem operativen Eingriff der Ovariectomie, die zu einer Unterbindung der Sexualhormonproduktion führt. Dadurch kommt es zu Veränderungen im Knochenstoffwechsel, die eine Reduktion der Knochenmasse nach sich ziehen. Zum einen stellt jedoch eine Ovariectomie durch den invasiven Eingriff eine enorme Belastung (Narkose, Operation, Nachbehandlung und Stress) des Tieres dar. Zum anderen stellt die Ovariectomie im Rahmen der Versuchsdurchführung eine Methode dar, die für eine Arbeitsgruppe gerade bei Untersuchungen am sogenannten „large animal model“ sowohl mit erheblichem finanziellen als auch hohem personellen Aufwand verbunden ist. Insofern ist es nicht nur aus ethischen Gründen wünschenswert, dass bei solchen Untersuchungen, die immer noch zwingend an Tiermodellen durchgeführt werden müssen, invasive Eingriffe auf ein Minimum reduziert werden.

Ziel dieser Studie ist es daher, erstmalig zu prüfen, ob es bei Minipigs („large animal model“) möglich ist, durch eine nichtinvasive Behandlung die Sexualhormonproduktion in dem Maß zu unterdrücken, dass es zu Veränderungen im Knochenstoffwechsel kommt, die den Veränderungen bei der Erkrankung Osteoporose bzw. den Effekten bei Osteoporosemodellen auf Basis einer Ovariectomie entsprechen. Dies würde bedeuten, dass in der Osteoporoseforschung erstmals ein nichtinvasives und einfach durchzuführendes „large animal model“ zur Verfügung steht. Um diesen Ansatz zu überprüfen, soll in der vorliegenden Studie die Möglichkeit, den Knochenstoffwechsel durch Immunisierung gegen GnRH zu beeinflussen, an zehn Dresdner Minipigs untersucht werden, wobei vier Schweine die intakte Kontrollgruppe und sechs Tiere die Versuchsgruppe bilden sollen.

Dabei soll die Versuchsgruppe in regelmäßigen Abständen mit einem Impfstoff gegen GnRH behandelt werden, was durch Neutralisierung von GnRH die FSH-Ausschüttung und dadurch die Follikelreifung unterbinden soll. Man kann diesen Versuchsansatz im Analogieschluss zu einer Ovariectomie / Orchiectomie (Kastration) als „Immunkastration“ bezeichnen.

Um die möglichen Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel und die Sexualhormonproduktion zu überprüfen, sollen in regelmäßigen Abständen über den gesamten Versuchsablauf die Knochenstoffwechsellmarker Osteocalcin und Crosslaps, sowie das Sexualhormon Östradiol im Serum bestimmt werden.

2. Literatur

2.1 Hormonhaushalt und sein Einfluss auf den Knochen

2.1.1. Aufbau von Hormonen

Hormone sind körpereigene chemische Substanzen, deren Hauptaufgabe die Informationsübermittlung ist. Sie dienen der Regelung von Organfunktionen und Stoffwechselfvorgängen, z.B. der Ernährung, dem Wachstum, den Fortpflanzungsmechanismen, sowie der psychischen und physischen Entwicklung und Reifung, aber auch der Homöostase.

Man unterscheidet zwischen endokrinen und parakrinen Hormonen. Als endokrine Hormone werden solche bezeichnet, die in endokrinen Drüsen (Hypophyse, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Nebenniere, Ovar, Hoden, Pankreasinseln) oder in diffus lokalisierten endokrinen Zellen (in den C-Zellen der Schilddrüse, im Herzvorhof, in der Leber, in der Niere, im Gastrointestinaltrakt) produziert werden und deren Verteilung im Körper über den Kreislauf erfolgt. Parakrine Hormone sind Hormone, die von diffus verteilten Zellen sezerniert werden und nicht über den Kreislauf verteilt werden, sondern auf benachbarte Zellen wirken. Ihr Ziel- oder Erfolgsorgan stellt entweder eine untergeordnete Drüse oder ein nicht-endokrines Gewebe dar.

In den meisten Fällen erfolgt die Hormonabgabe durch einen nervalen Reiz im ZNS. Als nerval-hormonelle Schaltstelle dient in erster Linie der Hypothalamus, welcher das neuronale Signal in eine Hormonausschüttung umsetzt. Die Abgabe erfolgt entweder aus dem Hypothalamus selbst und dem damit verbundenen Hypophysenhinterlappen (HHL) oder aus dem Hypophysenvorderlappen (HVL).

Übergeordnete Hormone steuern die Hormonfreisetzung aus dem HVL, indem sie diese entweder hemmen oder fördern. Bei einem Großteil der HVL-Hormone handelt es sich um glandotrope Hormone. Dies sind Hormone, die die Hormonproduktion nachgelagerter endokriner Drüsen stimulieren.

Es gibt aber auch endokrine Hormone, welche von der Hypothalamus-Hypophysen-Achse unabhängig sind. Zu diesen zählen Calcitonin, Calcitriol, Pankreashormone und Parathormon sowie Aldosteron, Angiotensin, Erythropoetin und Magen-Darm-Hormone.

2.1.2 Steuerung und Regelkreisläufe

Da die gesamte Regulation eines Hormons einem Regelkreislauf unterliegt, sind weder der Zeitpunkt noch die Sekretionsmenge des Hormons willkürlich gesteuert.

Ein solcher Regelkreis besteht aus drei Instanzen: Einem Meldeelement, einem Sollwertgeber und einem Stellglied. Bei den Regelkreisläufen unterscheidet man zwischen einer negativen und einer positiven Rückkopplung.

Eine negative Rückkopplung liegt dann vor, wenn z.B. die Blutkonzentration eines Hormons steigt, bis sie den Grenzwert überschreitet, wodurch über eine Rückkopplungsschleife (feedback loop) die weitere Sekretion des betroffenen Hormons inhibiert wird.

Ein typisches Beispiel für einen solchen Regelkreis ist die Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse. Die Freisetzung hypophysärer Gonadotropine fördert die Synthese von Sexualhormonen, deren erhöhte Konzentration zu einer Reduktion der hypothalamischen Releasing-Hormone führt.

Von einer positiven Rückkopplung spricht man, wenn der Signalempfänger (das Meldeelement) das ursprüngliche Signal verstärkt. Die Bluthormonkonzentration wird erhöht, wodurch die eigene Synthese oder die eines anderen Hormons angeregt wird. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Ausschüttung von Östrogenen, die zur Sekretion von LH führt.

2.1.3 Einzelne Hormone und ihre Wirkung auf den Knochen

2.1.3.1 Parathormon

Parathormon hat auf den Knochenstoffwechsel eine doppelte Wirkung. Abhängig von der Dosis und Therapiedauer kann es entweder eine katabole oder eine anabole Wirkung entfalten.

Niedrige, intermittierende Gaben führen zu einem anabolen Effekt (Hock & Gera, 1992). Durch Interaktion zwischen Parathormon und Rezeptoren auf den Osteoblasten kommt es zur Sezernierung von Cytokinen, die zu einer Aktivierung und Proliferation der Osteoblasten führen (Trachsler, 2003).

Kontinuierliche Gaben bewirken in hohen Dosen eine katabole Wirkung des Parathormons (Hock & Gera, 1992).

Durch Stimulierung des Osteoprotegrin-Liganden kommt es zur Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten, die für die Knochenresorption verantwortlich sind (Hofbauer & Khosla 1999).

Seit 2002 wird Parathormon in der Osteoporosetherapie eingesetzt, da nachweislich bei Frauen mit postmenopausaler Osteoporose und bestehenden Wirbelkörperverformungen die Rate der Neufrakturen durch intermittierende Gaben des rekombinanten humanen Parathormonfragments gesenkt werden konnte (Neer et al., 2001).

2.1.3.2 Calcitonin

Calcitonin, ein aus 32- Aminosäuren bestehendes Peptid, wird in den parafollikulären- oder C-Zellen der Schilddrüse synthetisiert, die Ca^{2+} -Sensoren besitzen.

Der Ca-Spiegel dient im Blut als Regulator: Bei einer Hypercalcämie wird die Plasmakonzentration von Calcitonin erhöht, während bei einem niedrigen Calciumspiegel die Calcitonin-Sekretion inhibiert wird.

Calcitonin, das im Blut proteingebunden transportiert wird (Trachsler, 2003), gilt als ein wirksamer Inhibitor der Osteoklastenaktivität und damit der Knochenresorption. Dies konnte durch eine Therapie mit Calcitonin anhand eines leicht erniedrigten Serumspiegel des Calciums und einer Reduktion der Knochenresorptionsparameter wie den Collagen-Crosslinks bewiesen werden (Abbiati et al., 1994).

2.1.3.3 Calcitriol

An der Bildung des aktiven Vitamin D-Steroidhormons, 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 , sind mehrere Organe beteiligt.

Vitamin D_3 , das entweder mit der Nahrung aufgenommen oder in der Haut synthetisiert wird, erfährt im Blut eine Kopplung an das Vitamin D-Bindungsprotein und wird zur Leber transportiert, wo es zu $25(\text{OH})\text{D}_3$ (Calcidiol) hydroxyliert und in

der Niere über die 1α -Hydroxylase zum eigentlich wirksamen Hormon $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Calcitriol) umgewandelt wird (Lips, 2006).

Diese Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird über den sinkenden Calcium- und Phosphatspiegel, sowie durch Wachstums- und Sexualhormone reguliert. Um zu verhindern, dass der Calciumgehalt im Serum auf unphysiologisch hohe Konzentrationen ansteigt, wird sowohl die Bildung von Parathormon als auch die 1α -Hydroxylase in der Niere durch Calcitriol inhibiert (Zierold et al., 2003). Über einen negativen Feedback-Mechanismus wird seine eigene Synthese reguliert (Trachsler, 2003).

Die Interaktion zwischen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und Osteoblasten führt zu deren Differenzierung, sowie zur Bildung von Alkalischer Phosphatase und Kollagen (Trachsler, 2003). Daraus resultiert neues Knochengewebe und es kommt zum Calciumeinbau in die Knochen (Hofbauer, 1999).

2.1.3.4 Somatotropin

Das Wachstumshormon (GH) gilt zusammen mit dem Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) als Hauptregulator des Längenwachstums bis zum Eintritt in die Pubertät (Siebler et al., 2001).

Für das Längenwachstum des Knochens bis zu seiner endgültigen Größe ist in erster Linie das Wachstumshormon zuständig. Das Längenwachstum resultiert aus der Proliferation der Chondrozyten und der späteren enchondralen Ossifikation der epiphysalen Wachstumsfuge (Nilsson et al., 1994).

GH hat keine größeren systemischen Effekte. Durch lokale, von den Osteoblasten ausgehende Produktion, ist es in der Lage, das Knochenwachstum direkt zu beeinflussen (Baker et al., 1992).

Um den Effekt des Wachstumshormons auf den gesunden menschlichen Knochen zu untersuchen, wurde eine Testgruppe von gesunden Menschen mit einer normalen hGH-Sekretion einer hGH-Behandlung unterzogen. Die Veränderungen des Knochenstoffwechsels wurden anhand von Knochenresorptions- und –

formationsmarkern gemessen. Es konnte im Verlauf des Versuches sowohl eine anabole wie auch eine katabole Wirkung des Somatostatins nachgewiesen werden. Im Vergleich überwog jedoch der anabole gegenüber dem katabolen Effekt (Ohlsson et al., 1998).

2.1.3.5 Trijodthyronin (T3)

Dieses Hormon, das in den Epithelzellen der Schilddrüsenfollikel gebildet wird, ist an der Regulierung des Stoffwechsels beteiligt.

Die T3-Synthese wird über TRH (thyreotropin releasing hormone) aus dem Hypothalamus gesteuert. Gleichzeitig nimmt TRH Einfluss auf die Hypophyse, die nach Interaktion von TRH und Rezeptoren auf Zellen des Hypophysenvorderlappens das TSH (thyreoid stimulating hormone) abgibt. Dieses wiederum veranlasst die Schilddrüse zur T3- Synthese.

In der Hypophyse wird sowohl die Bildung als auch die Freisetzung des Wachstumshormons durch Trijodthyronin angeregt (Trachsler, 2003). Zusammen mit hGH und IGF-1 ist T3 für die physiologische Osteogenese notwendig (Evdokimov & Karas, 2001).

T3 hat einen signifikanten Einfluss auf die Knochendichte. Eine Thyreoidektomie führt zu einer erheblichen Reduzierung der Knochendichte (Mirzaei et al., 1999).

Innerhalb der epiphysalen Wachstumsfuge ist T3 ein wichtiger Regulator der enchondralen Ossifikation. Es wurde beobachtet, dass Chondrozyten die T3-Rezeptoren TR α 1, TR α 2 und TR β 1 exprimieren (Robson et al., 2000). Sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten exprimieren Rezeptoren für Schilddrüsenhormone, was sie zu direkten Zielzellen von T3 macht. Es wurde ferner nachgewiesen, dass T3 sowohl die Proliferation der Osteoblasten als auch die Alkalische Phosphataseaktivität erhöht (Pepene et al., 2003). Bei Osteoblasten mit einem Mangel an Thyreoidhormonen wurde durch Gaben von T3 die Abgabe der Gesamt- wie auch der membrangebundenen Alkalischen Phosphataseaktivität signifikant erhöht, während die lösliche Fraktion der Alkalischen Phosphataseaktivität unbeeinträchtigt blieb. Dies lässt darauf schließen, dass T3 durch die Regulation der membrangebundenen Alkalischen Phosphataseaktivität eine wichtige Rolle bei der Skelettentwicklung und bei der Calcifikation spielt (Banovac & Koren, 2000).

Darüber hinaus übt T3 innerhalb der enchondralen Wachstumsfuge einen Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung der Chondrozyten aus (Robson et al., 2000).

Häufig erfolgen die Effekte des Schilddrüsenhormons auf die Knochenzellen nicht als isolierter Vorgang, sondern im Zusammenspiel mit anderen Hormonen und lokalen Wachstumsfaktoren, wie z.B. hGH. In hohen Konzentrationen führt T3 zu einer Stimulation der GH-Rezeptor-mRNA (Pepene et al., 2003) und zu einer Anregung der Wachstumshormon-Synthese (Samuels et al., 1979). Bezüglich der Zellproliferation der Osteoblasten-Zelllinie liegt ein synergistischer Effekt von hGH und T3 vor (Pepene et al., 2003).

T3 übernimmt beim Knochenstoffwechsel eine weitere Funktion, indem es die Expression von Osteocalcin-Genen innerhalb der Osteoblasten-Zelllinie reguliert. Unter dem Einfluss von Trijodthyronin wird nicht nur der Gehalt der Osteocalcin-mRNA gesteigert, sondern auch deren biologische Halbwertszeit (Gouveia et al., 2001).

2.1.4 Sexualhormone

Während bis zum Eintritt der Pubertät hauptsächlich Somatotropin, IGF-1, Trijodthyronin und Glucocorticoide für eine physiologische Skelettentwicklung zuständig sind, wird die Wachstumsregulation nach der Pubertät von den Geschlechtshormonen übernommen.

Sexualhormone, die sich von Cholesterin ableiten, werden als Steroidhormone bezeichnet. Diese unterscheiden sich bei Mann und Frau. Während beim Mann in den Leydig-Zellen der Hoden Testosteron gebildet wird, bildet die Frau Östradiol in den Thekazellen der Follikel. Ein geringer Teil der Östrogene wird extraovariell in der Placenta, in der Nebenniere, sowie in der Leber und im Muskel- und Fettgewebe synthetisiert.

Beide sind für den Knochenstoffwechsel von großer Bedeutung, ein kontinuierlicher Aufbau der Knochendichte ist beim Fehlen von Östrogenen bei der Frau bzw. beim Mann ohne Androgene nicht möglich.

Sexualsteroiden (Östrogene, Androgene, Gestagene) nehmen innerhalb des Knochenumsatzes eine zentrale Rolle ein. Ihre Wirkung ist von der Anwesenheit der

entsprechenden Rezeptoren (ER, Östrogenrezeptor; AR, Androgenrezeptor) auf Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten abhängig. Sie haben einen modulierenden Effekt auf knochenprotektive Faktoren. Ihre Wirkung ist proportional zur Wirkstoffkonzentration (Notelovitz, 2002).

2.1.4.1 Östrogene

Östrogene, vor allem Östradiol das das wichtigste Hormon dieser Gruppe ist, gelten als die wichtigsten Sexualsteroiden für den Erhalt der skelettalen Homöostase, was seit Jahren durch die Hormonersatztherapie und der daraus resultierenden Reduktion postmenopausaler Osteoporose bewiesen wird.

Die biologische Rolle der Östrogene innerhalb des Knochenstoffwechsels.

Im Vergleich zu den Hormonen Testosteron und Progesteron gilt der Östrogenspiegel als bedeutender Indikator für Knochenmasse und -resorption bei frühen postmenopausalen Frauen sowie älteren Frauen und Männern (Greendale et al., 1997).

Eine reduzierte Östrogenkonzentration kann sowohl den schnellen postmenopausalen Knochenverlust (Typ I-Osteoporose) als auch den langsameren altersbezogenen Knochenverlust (Typ II-Osteoporose) induzieren (Riggs et al., 1998). Dies beruht darauf, dass das Skelett in Form von Zyklen einem ständigen Umbauprozess unterliegt, der durch Osteoblasten und Osteoklasten gesteuert wird. Hierbei modulieren Östrogene den Umbauprozess, indem sie die Anzahl seiner Zyklen verlangsamen und vor Knochenschwund schützen (Manolagas et al., 2002). Diese Senkung der Zyklusraten resultiert aus einer gleichzeitigen Suppression der Osteoblasten- und Osteoklastengenerierung der Zellvorläufer (Syed & Khosla, 2005).

Die meisten Studien zeigten in einem OVX-Osteopeniemodell (siehe Punkt 2.1.5.1) nach Östrogensubstitution einen reduzierten Knochen turnover, der sowohl die Resorption als auch die Formation betrifft, wobei die Resorption stärker betroffen ist (Turner et al., 1994).

Die Wirksamkeit einer Östrogensubstitution bei bestehendem Östrogenmangel wurde in zahlreichen Tierversuchen untersucht. So fanden beispielsweise Zhou et al. (2001) heraus, dass Östrogen-Gaben bei ovariectomierten Ratten nicht nur vor

Knochenverlust schützen, sondern sogar zu einer gesteigerten Knochenbildung führen. Bei Frauen konnte als Ergebnis einer Langzeittherapie festgestellt werden, dass die Substitution von Östrogenen sowohl den Knochenabbau als auch die Frakturinzidenz auf das Niveau der Prämenopause senkt (Delmas, 1997).

Zu den physiologischen Wirkungen der Östrogene gehören auch eine Modulation der PTH-Wirkung, eine erhöhte Calcitoninfreisetzung und eine gesteigerte intestinale Calciumabsorption (Riggs & Spelsberg, 1996). So beobachtete Qu et al. (1998) bei ovariectomierten Mäusen, dass die Anwesenheit von Östradiol (E_2) bei OVX-Tieren sowohl den Ca-Gehalt wie auch die Bildung von Knochenknötchen ansteigen ließ.

Östrogene und deren Effekte auf die Osteoblasten und Osteoklasten

Da Osteoblasten $ER\alpha$ exprimieren, gelten sie als direkte Zielzellen der Östrogene (Dominique, 2004). Ebenso wurden Osteoklasten als direkte Zielzellen der Östrogene identifiziert. Doch Östrogene nehmen nicht nur Einfluss auf die Osteoblasten und Osteoklasten, sondern auch auf deren Vorläuferzellen (Syed & Khosla, 2005). Zusätzlich konnte eine Interaktion der Zellen beobachtet werden, denn Osteoblasten sind über die Steuerung der Cytokine in der Lage, die Osteoblastenformation zu beeinflussen (Spelsberg et al., 1999). Folglich besteht die Möglichkeit des bidirektional ablaufenden „Cross-talks“ sowohl zwischen den Osteoblasten und Osteoklasten als auch zwischen deren Vorläuferzellen, was sich auf die Synthese und Entwicklung der Osteoklasten nachteilig auswirken könnte. Dadurch können Östrogene einen direkten wie auch indirekten Effekt auf Knochenzellen ausüben und somit verschiedene Prozesse innerhalb des Knochenstoffwechsels steuern. So stimuliert E_2 sequenziell die Differenzierung der Osteoblasten (Qu et al., 1998), wie auch die Osteoklastengenese, was sich positiv auf die Aufrechterhaltung der lokalen Knochenzellaktivität auswirkt (Zallone, 2006).

Östrogengesteuerte Regulation der Cytokinsynthese in Osteoblasten

Weitere knochenprotektive Wirkungen der Östrogene werden über eine lokale Senkung der Sekretion von Osteoklasten-stimulierenden Mediatoren und Förderung der Sekretion Osteoklasten-hemmender Mediatoren vermittelt (Riggs & Spelsberg, 1996). Zu diesen Mediatoren gehören z.B. die knochenresorptiven Cytokine, deren Regulation zu den besterforschten Mechanismen der Östrogenwirkung auf den Knochen zählt. Östrogene regulieren die Expression von IL1 und IL6, den

Schlüsselmediatoren des Knochenverlustes (Zallone, 2006). IL6, ein Aktivator unreifer Osteoklasten, wird von Östrogenen durch Unterdrückung des IL6-Promotors gehemmt (Stein & Yang, 1995). Ebenso inhibieren Östrogene die Synthese des Macrophage-Colony-Stimulating-Factors (M-CSF), der als unabdingbarer Faktor der Osteoklastenformation gilt (Spelsberg et al., 1999).

Der Östrogenrezeptor

Auf allen Knochenzellen befinden sich Rezeptoren für Östrogene (Notelovitz, 2002). Die Östrogenwirkungen werden über zwei verschiedene nukleäre Rezeptoren vermittelt, die Östrogen-Rezeptoren (ER) α und β , die durch Östrogene aktiviert werden können. Östrogene als lipophile Substanzen gelangen mittels Diffusion durch die Zellmembran zum Rezeptor. Vom Rezeptorkomplex, aus mehreren Untereinheiten bestehend, dissoziieren sie durch die Bindung des Hormons das sogenannte „Heat-Shock“-Protein ab. Der aktivierte Rezeptor weist eine doppelte Spezifität auf. Während sich auf der einen Molekülseite in Nähe des C-Terminus eine Hormonbindungsstelle befindet, ist in Nähe des N-Terminus eine DNA-Bindungsstelle lokalisiert. Die DNA-Bindungsstelle ist innerhalb des Proteinkomplexes abgedeckt, wohingegen die Hormonbindungsstelle frei zugänglich ist. An diese bindet ein Östrogenmolekül und bewirkt eine Konformationsänderung, die eine Dissoziation des Komplexes einleitet. Infolgedessen wird die DNA-Bindungsstelle freigelegt, und es kommt zur Erkennung, Bindung und Transkription des jeweiligen Gens.

Die beiden Rezeptoren α und β sind für unterschiedliche Wirkungen verantwortlich. Da Osteoblasten ER α exprimieren, geht man davon aus, dass diese die direkten Zielzellen von Östrogenen sind (Dominique, 2004).

Die Aktivierung des ER α dient zum Erhalt der volumetrischen Dichte des Knochens wie auch der mechanischen Stärke des kortikalen Knochens (Moverare et al., 2006). Darüber hinaus dient der ER α nicht nur der Vermittlung von Östrogeneffekten, sondern indirekt auch der von Androgenen. Androgene werden über die Aromatase zu Östrogen umgewandelt und können somit Einfluss auf den α -Rezeptor nehmen (Adachi & Takayanagi, 2006). Durch Aktivierung des ER α unter Beteiligung von Androgenen kommt es zum Erhalt des Trabekularknochens (Moverare et al., 2006). Im Gegensatz dazu übt der ER β -Rezeptor eine wachstumslimitierende Wirkung auf den Knochen aus (Lindberg et al., 2005). Untersuchungen mit Rattenosteoblasten

ergaben, dass die Konzentrationen der Östrogenrezeptoren vom Typ „ α “ in der Zeit der Matrixreifung erhöht, während sie innerhalb der Mineralisierung erniedrigt waren. Im Vergleich dazu waren die Östrogen-Rezeptoren vom Typ „ β “ über die gesamte Osteoblastendifferenzierung hinweg konstant. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich die Aktivitäten der Östrogene in erster Linie während der Matrixreifung auf die Osteoblasten erstrecken (Wiren et al., 2002).

2.1.4.2 Androgene

Unter Androgenen versteht man einen Sammelbegriff für alle männlichen Sexualhormone, die für die Ausbildung und Entwicklung sekundärer männlicher Geschlechtsmerkmale verantwortlich sind. Das wichtigste Androgen stellt Testosteron dar.

Testosteron wird in den Leydig-Zellen produziert. Der Großteil des Testosterons liegt in gebundener Form (an das sexual hormone binding globuline gebunden) vor, lediglich 2% liegen frei vor. Die tägliche Testosteronbildung beträgt ungefähr 7 mg (Kudlacek et al., 2000).

Testosteron hat allgemein betrachtet eine anabole Wirkung auf den Organismus, so auch beim Knochen (Michael et al., 2005).

Androgene schützen vor Knochenschwund, indem sie die Knochenumbaurate verlangsamen. Durch Abschwächung der Synthese von Osteoblasten und Osteoklasten wird die Anzahl der Umbauzyklen vermindert. Diese Effekte werden über proapoptotische Wirkung auf Osteoklasten und antiapoptotische Effekte auf Osteoblasten und Osteozyten vermittelt (Manolagas et al., 2002).

Die Wirkungen der Androgene werden über einen speziellen Androgenrezeptor vermittelt, dessen Vorkommen auf allen Knochenzellen das Knochengewebe als potentiell Zielgewebe der Androgene erkennen lässt (Hofbauer & Khosla, 1999; Notelovitz, 2002).

So führt eine Aktivierung des Androgenrezeptors zum Erhalt der Trabekularknochen, indem die Anzahl der Trabekel bewahrt wird (Moverare et al., 2006), doch nicht nur zum Erhalt der Trabekularknochen, sondern auch zu deren Entwicklung und der

Bildung der Kortikalknochen. Ebenso ist die Expansion periostaler Knochen nur im Beisein eines aktivierten Androgen-Rezeptors möglich (Venken et al., 2006).

Da Androgene teilweise zu Östrogenen aromatisiert werden, können sie manche Wirkungen auch über ER α vermitteln (Vanderschueren et al., 2004). So wird z.B. vermutet, dass die Androgenwirkung auf das radiale Knochenwachstum, welches zu einer Erhöhung des Knochenwachstums führt, sowohl via AR als auch über ER α vermittelt wird (Lindberg et al., 2005).

Häufig lässt sich eine androgenvermittelte Wirkung nicht nur einem Rezeptor zuschreiben, sondern ist vom Zusammenspiel mehrerer Faktoren, z.B. der Erhöhung der Osteoblastenaktivität und gleichzeitiger Hemmung der Osteoklasten abhängig (Wiren, 2005).

Die Reduktion der pro-resorptiven Cytokine ist ein weiterer Weg, der zur Hemmung der Knochenresorption durch Androgene führt (Syed & Khosla, 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich Androgene positiv auf die BMC (bone mineral content) und BMD (bone mineral density) auswirken (Prakasam et al., 1999). So führt Androgen z.B. sowohl bei heranwachsenden Frauen wie auch bei erwachsenen prämenopausalen Frauen zu einer Anhebung der BMD (Notelovitz, 2002).

Es spielt ebenfalls eine wichtige Rolle für die kortikale als auch spongiöse Knochenmasse sowie für deren Aufrechterhaltung und Wachstum (Adachi et Takayanagi, 2006).

2.1.5 Beeinflußung der Sexualhormonproduktion in der Veterinärmedizin

Sowohl in der Heimtier- als auch in der Nutztierhaltung findet die Unterdrückung der Sexualhormonproduktion Anwendung. In der Nutztierhaltung kann sie eingesetzt werden, um die durch Sexualhormone erzeugten geruchlichen und geschmacklichen Veränderungen des Fleisches (wie z.B. bei Eberfleisch) zu verhindern.

Ein weiteres Anwendungsgebiet für die Unterdrückung von Sexualhormonen liegt im Bereich der Forschung. So dienen z.B. die Ovariohysterektomie als Modell der

Osteoporoseforschung und die Orchiectomie als Modell des Hypogonadismus. Im Folgenden werden nur für diese Arbeit relevante Beispiele angeführt.

2.1.5.1 Ovariectomie im Tiermodell

In der Veterinärmedizin findet eine Ovariectomie hauptsächlich im Kleintiersektor Anwendung. Ein weiteres Indikationsgebiet findet sich in Form von Tiermodellen im Bereich der medizinischen Forschung.

Ein Absinken der Östrogenkonzentration infolge der Menopause spielt bei der Entstehung der postmenopausalen Osteoporose eine bedeutende Rolle. Allerdings existiert mit Ausnahme weniger Primaten keine Tierart, bei der es physiologischerweise zu einer Menopause kommt. Somit bleibt in der Forschung oftmals nur die Möglichkeit der mittels Ovariectomie induzierten Menopause. Folglich ist kein Tiermodell in der Lage, dem Verlust der ovariellen Funktion der Frau gänzlich zu entsprechen. Während die Menopause und der damit verbundene Östrogenverlust bei der Frau ein kontinuierlicher und sukzessiver Prozeß ist, bewirkt eine Ovariectomie einen abrupten Abfall des Östrogenspiegels mit einem entsprechend höheren Knochen turnover.

Die FDA (Food and Drug Administration, 1994) hat Richtlinien für Studien veröffentlicht, die zur Erprobung von Medikamenten zur Prophylaxe und Behandlung von Osteoporose dienen. Diese schreiben vor, dass präklinische Studien zuerst an einem „small animal model“ und anschließend an einem „large animal model“ untersucht werden müssen. Es existieren verschiedene Tiermodelle, die jedoch sämtlich mit spezifischen Vor- und Nachteilen behaftet sind.

Das Minipig als OVX-Modell

Auf Grund seiner Körpergröße und seinem adulten Körpergewicht von bis zu 60kg stellt das Minipig ein Tiermodell dar, das groß genug ist, um ausreichende Mengen von Blut und Urin zu Untersuchungszwecken gewinnen zu können. Außerdem besteht die Möglichkeit, wiederholte Knochenbiopsien durchzuführen. Im Vergleich zum Hausschwein ist es einfacher in seiner Handhabung und benötigt weniger Platz. Allerdings müssen mögliche Aggressionen berücksichtigt werden.

Mit Ausnahme von Primaten besitzt das Schwein einige spezifische Vorteile gegenüber anderen Tiermodellen. Das Schwein ist dem Menschen bezüglich seines Knochenstoffwechsels wie auch der allgemeinen Anatomie und Physiologie sehr ähnlich. Zudem weisen Schweine einen polyöstrischen polysaisonalen Zyklus mit einer Zykluslänge von 18 bis 21 Tagen auf, was fast dem der Frau entspricht (Bustad & McClellan, 1966). Allerdings hat das Schwein im Vergleich zum Menschen eine höhere Knochenmasse sowie einen dichteren trabekulären Knochen (Mosekilde et al., 1987). Das ovariektomierte Schwein gilt als ein von der FDA anerkanntes „large animal model“. Hinzu kommt, dass das Schwein eine Besonderheit innerhalb des Sexualzyklus aufweist. Im Vergleich zu anderen Tierarten erreicht die Sau am 18. Zyklustag ihren Maximalwert der Östrogenkonzentration, das heißt vor der Ovulation, während alle anderen Tierarten ihren Maximalwert während der Ovulation erreichen (siehe Abb.1).

In der Abbildung 1 ist der Verlauf der Östrogenkonzentration während des Sexualzyklus verschiedener Tierarten vergleichend dargestellt.

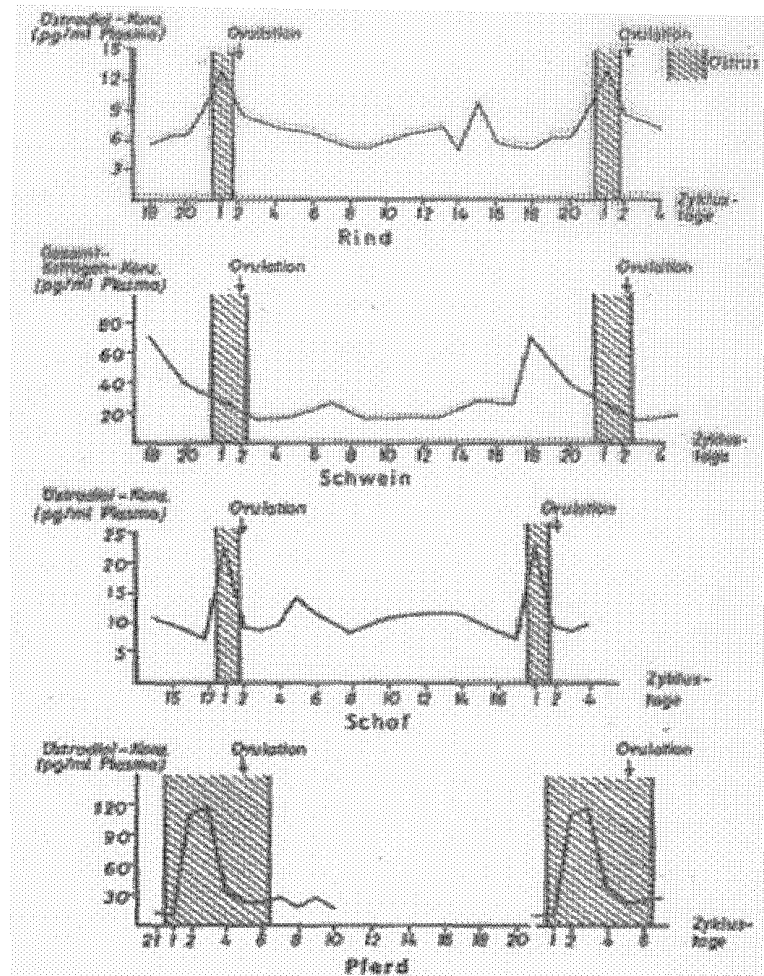


Abbildung 1: Verlauf der Östrogenkonzentrationen (pg/ml) während des Sexualzyklus von Rind, Schwein, Schaf und Pferd

(Bildquelle: Prof. Waehner „Endokrinologie der Fortpflanzung“).

Rhesusaffen als OVX-Modell

Der größte Vorteil des Primaten ist in der großen Ähnlichkeit des Organsystems mit dem des Menschen zu sehen. Ebenso weisen der monatliche Zyklus wie auch das Hormonmuster weiblicher Makaken teilweise große Übereinstimmungen mit denen des Menschen auf (Hodgen et al., 1977).

Mann et al. (1990) konnten durch die Gabe von Gonadotropin-Releasing-Hormonen einen dem der postmenopausalen Frau vergleichbaren Abfall der Knochendichte erzeugen.

Bei Studien zum postmenopausalen Knochenverlust muß berücksichtigt werden, dass Makaken erst im Alter von neun Jahren die „peak bone mass“ erreichen. Da ältere Tiere sowohl teurer in der Beschaffung als auch schwieriger im Umgang sind, werden meistens jüngere Tiere in den Studien eingesetzt (Jerome et al., 1993).

Außerdem müssen im Umgang mit Primaten das Risiko der Zoonose wie auch die ethischen Aspekte Berücksichtigung finden.

Ovariectomierte Rhesusaffen wurden von der FDA als ein „large animal model“ anerkannt.

Der Hund als OVX-Modell

Der Hund ist meist einfacher im Umgang und kostengünstiger als der Rhesusaffe. Der kortikale Knochen des Hundes besitzt Haversche Blutgefäße und ist hinsichtlich des Knochenremodelings im trabekulären und kortikalen Knochen dem Menschen ähnlich (Boyce et al., 1990).

Der Zyklus des Hundes ist saisonal monoöstrisch und zweimal jährlich. Dadurch ist der Östrogenspiegel über einen relativ langen Zeitraum sehr niedrig. Auf Grund dessen kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Östrogenspiegel des Hundes bezüglich des Knochenmetabolismus eine eher untergeordnete Rolle spielt. So existieren in der Tiermedizin auch keine Berichte über Spontanfrakturen, obwohl ein Großteil weiblicher Hunde ovari- bzw. ovariohysterektomiert ist.

Ein Nachteil des Tiermodells Hund sind die schwer zu beschaffende Anzahl vor allem älterer Hunde sowie die höheren Anforderungen an Pflege und Unterbringung. Auch hier spielt der ethische Aspekt eine große Rolle, da der Hund für viele Menschen als treues Familienmitglied gilt.

Die Ratte als OVX-Modell

Die Ratte gilt als einziges von der FDA anerkanntes „small animal model“. Die ovariectomierte Ratte ist das am häufigsten verwendete OVX-Tiermodell (Jeroen et al., 1996). Es existieren zwei unterschiedliche Modelle, das „mature rat model“ und das „aged rat model“. Beim „mature rat model“ sind die Tiere drei Monate, beim „aged rat model“ zwölf Monate alt.

Da die Erkrankung Osteoporose im fortgeschrittenen Alter eintritt, sollte auch im Tiermodell ein abgeschlossenes Knochenwachstum vorliegen. Da allerdings ein Östrogenfazit durch alters- oder krankheitsbedingten Knochenverlust überlagert werden kann, sollte die Ovariectomie nicht allzu spät erfolgen (Birner, 1995).

Ein Nachteil des Rattenmodells ist die geringe Körpergröße und das entsprechend kleine Blutvolumen. Hinzu kommt, dass Langzeitstudien auf Grund der kurzen Lebenserwartung (drei bis vier Jahre) nicht möglich sind. Ebenso muss der kurze polyöstrische Zyklus (alle vier bis fünf Tage) berücksichtigt werden.

Im Gegensatz dazu sind folgende Aspekte von Vorteil: Ratten sind in größeren Mengen zu beschaffen und kostengünstig. Des Weiteren ist ihre Unterbringung, Pflege und Fütterung mit vergleichsweise geringem Aufwand verbunden. Da die Ratte seit Jahrzehnten als Versuchstier dient, ist eine Vielzahl von Untersuchungsergebnissen wie z.B. über die Phosphor- und Calciumspiegel sowie über die Knochenmarker vorhanden (Rodgers et al., 1993; Newman et al., 1995).

2.1.5.2 Orchiectomie

Im Bereich der Heimtiere besteht für eine Orchiectomie ein weites veterinärmedizinisches Indikationsspektrum, wie z.B. auf Grund von Hodentumoren oder Prostatavergrößerungen. Bei Kleintieren wie Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten (und auch bei Hund und Katze) dient die Orchiectomie hauptsächlich der Verhinderung unerwünschten Nachwuchses.

Bei der Haltung landwirtschaftlicher Nutztiere hat die Orchiectomie eine ganz andere Bedeutung. Dort wird sie zur Verhinderung der durch Sexualhormone erzeugten geruchlichen und geschmacklichen Veränderungen des Fleisches (wie z.B. bei Eberfleisch) verwendet oder zur Verbesserung der Schlachtleistung, insbesondere bei Schwein und Rind. Andererseits stellt die Orchiectomie im Rahmen der Versuchsdurchführung eine Methode zur Erstellung des Hypogonadismusmodells dar.

2.1.5.2.1 Tiermodell

Die männliche orchiectomierte Ratte wird häufig als Tiermodell bei Studien zur Erforschung des Hypogonadismus eingesetzt. Die bei der männlichen Ratte durch Androgenverlust induzierten Effekte scheinen denen der Männer sehr ähnlich zu sein. Somit stellt das Tiermodell der männlichen Ratte ein geeignetes Modell zur Erforschung neuer Behandlungs- und Präventionsmethoden der Osteoporose beim Mann dar.

So konnte Erben (2001) nachweisen, dass eine Orchiectomie von männlichen Ratten zu einem deutlichen und anhaltenden erhöhten Knochen turnover sowie einem Verlust des spongiosen und des kortikalen Knochens führt. Ferner kann mit Hilfe des Tiermodells der männlichen Ratte die Regulation von Androgenen und Östrogenen im männlichen Skelett sowie innerhalb des Immunsystems untersucht werden.

Borst & Conover (2006) führten mit verschiedenen Rattenstämmen Untersuchungen bezüglich kataboler Effekte in Folge einer Orchiectomie durch und belegten damit die Eignung von männlichen Ratten, insbesondere des Stamms „Fischer 344“, zur Untersuchung der durch Hypogonadismus hervorgerufenen Effekte.

2.1.5.2.2 Nutztierproduktion

Die Orchiectomie wird im Bereich der Nutztierproduktion, vor allem beim Schwein, zur Verhinderung der durch Sexualhormone verursachten geschmacklichen und geruchlichen Veränderungen des Fleisches eingesetzt.

Ohne Orchiectomie entsteht bei dem vom Schwein gewonnenen Fleisch der unerwünschte Ebergeruch. Zusammen mit Skatol gilt Androstenon in Bezug auf den Ebergeruch als hauptverantwortlich. Es handelt sich dabei um ein Androgen, dessen Produktion in den Leydig-Zellen stattfindet. Im Gegensatz zum Testosteron wirkt es nicht hormonell, sondern als Pheromon. Es liegt als lipophiles Molekül im Fettgewebe vor und kumuliert dort.

Je älter ein unkastrierter Eber wird, desto mehr Androstenon lagert sich im Fettgewebe ein, was den charakteristischen Geschmack und Geruch des Fleisches erzeugt. Deswegen sind der Geruch und der Geschmack bei geschlachteten Zuchtebern im Vergleich zu jungen Mastebnern wesentlich stärker ausgeprägt.

Eine Alternative zur chirurgischen Unterdrückung der Sexualhormonproduktion, mittels Orchiectomie, stellt die immunologische Unterdrückung der Sexualhormonproduktion mit Hilfe der GnRH-Immunisierung dar.

2.1.5.3 Immunologische Unterdrückung der Sexualhormonproduktion („Immunkastration“)

Zur Unterdrückung des oben erwähnten Ebergeruchs kann neben der Kastration auch eine immunologische Unterdrückung der Sexualhormonproduktion angewendet werden. Diese Methode wird zurzeit vor allem in Australien, Neuseeland, Mexiko und Brasilien eingesetzt. 2007 wurde diese Methode auch in der Schweiz zugelassen.

Der Vorteil dieser Anwendung liegt darin, dass die Tiere erst kurz (4 bis 6 Wochen) vor der Schlachtung behandelt werden und die nicht kastrierten Tiere somit während der Mastperiode höhere Tageszunahmen bei geringerer Fetteinlagerung erzielen können (Oliver et al., 2003).

Somit stellt diese Methode eine Alternative zu einer chirurgischen Kastration dar. Sie wird mit Hilfe von GnRH-Vakzinen durchgeführt. Das einzige auf dem Markt kommerziell erhältliche Präparat ist hierbei Improvac® (Pfizer Animal Health, Australia), andere Vakzinen befinden sich derzeit in Großbritannien und den USA in

der klinischen Erprobungsphase. Durch die Applikation dieser GnRH-Vakzine kommt es zu einer Stimulierung des Immunsystems, welche die Bildung natürlicher Antikörper hervorruft, die das vom Hypothalamus produzierten, endogene GnRH neutralisieren.

Da GnRH für die Ausschüttung des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des Luteinisierenden Hormons (LH) verantwortlich ist (das in hohen Pulsationen zu einer LH-Ausschüttung führt und in niedrigen Pulsationen eine FSH-Ausschüttung bewirkt), kommt es zu einer Inhibition des Luteinisierenden Hormons (LH), wie auch des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) (Crane, 2006). Daher entspricht diese Methode hinsichtlich ihrer Wirkung einer chirurgischen Kastration und kann als „Immunkastration“ bezeichnet werden.

Improvac® ist eine Injektionslösung die sich aus einem inkompletten, synthetischen Analogon des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH), einem Trägerprotein sowie einem wässrigen Adjuvanssystem zusammensetzt. Das GnRH-Analogon (Hapten), konjugiert mit dem Carrierprotein, fungiert als Antigen.

Um eine Wirkung zu erzielen, müssen zwei Applikationen des Impfstoffes erfolgen. Diese sollten im Abstand von ungefähr vier bis fünf Wochen verabreicht werden. Die erste Injektion hat keinen Einfluss auf den Hormonhaushalt. Sie dient zunächst zur Ausbildung von Gedächtniszellen, wodurch das Immunsystem sensibilisiert wird (Schwyter, 2007). Erst die Booster-Impfung regt das Immunsystem zur Produktion von Antikörpern an; es kommt im Anschluss zur Ausbildung eines spezifischen GnRH-Antikörpertiters, der zu einer Neutralisierung des natürlichen GnRH führen soll.

Allerdings ist die Wirkung von Improvac® transient, da der Effekt von der jeweiligen Höhe des Antikörpertiters abhängig ist (Crane, 2006).

Bei den immunologisch kastrierten Ebern konnten geringere Konzentrationen an Testosteron, Estronsulfat, Androstenon, Skatol und Indol gegenüber intakten Ebern gemessen werden. Folglich kommt es zu einer weniger ausgeprägten geruchlichen und geschmacklichen Veränderung des Fleisches, welches einem orchiektomierten Schwein entspricht.

Zudem nahm der Anteil an Magerfleisch im Vergleich zu intakten Ebern ab. (Zamaratskaia et al., 2007a).

Ferner wirkt sich eine Behandlung mit Improvac® auch auf die Geschlechtsorgane aus, so dass die Bulbourethraldrüse kürzer als bei intakten Tieren und das Gewicht

der Hoden im Vergleich zu unkastrierten Ebern niedriger ist (Zamaratskaia et al., 2007b).

Histologisch lässt sich auf Grund der Improvac®-Behandlung eine Atrophie der Leydig-Zellen, der Hoden und der Bulbourethraldrüse erkennen (Hilbe et al., 2006).

Im Nebenhoden sind nur wenige oder sogar keine Spermatozoen auffindbar (Hilbe et al., 2006). Eine Immunisierung mit Improvac® hat nicht nur physische, sondern auch psychische Auswirkungen. So konnte bei männlichen Schweinen eine Reduktion des aggressiven Verhaltens nachgewiesen werden (Zamaratskaia et al., 2007a).

Die Effekte von Improvac® wurden auch bei Stuten untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine Beeinflussung aller gemessenen Parameter (Plasma-Progesteron, Östrusverhalten und Ovarienaktivität). Dabei kam es zu einer Reduktion aller Parameter, außer 17- β -Östradiol, das durch die Behandlung mit Improvac® unbeeinflusst blieb (Imboden et al., 2006).

Bisher liegen keinerlei Untersuchungen mit Improvac® bei weiblichen Schweinen vor.

2.2 Imbalancen des Hormonhaushaltes

2.2.1 Hypothyreose

Die Ursachen einer Hypothyreose liegen entweder in einer zu geringe Produktion von Schilddrüsenhormonen oder in einer mangelnde Ansprechbarkeit der Körperzellen, z.B. durch eine zu geringe Wirkung der Schilddrüsenhormone auf die Zielzellen. Als primäre Hypothyreose bezeichnet man eine Unterfunktion der Schilddrüse, die durch eine direkte Erkrankung der Thyreoidea zustande gekommen ist. Sie ist durch eine Reduzierung an freiem Thyroxin (fT4) und einer Erhöhung von TSH gekennzeichnet. Wesentlich seltener liegt eine fehlende Stimulation der Thyreoidea durch eine Funktionsstörung der Hypophyse zu Grunde, bei der fT4 und TSH unter dem Normwert liegen und die als sekundäre Hypothyreose bezeichnet wird (Schindler, 2003). Eine Reduzierung von TSH und fT4 kann auch im Rahmen einer Hypothalamusstörung vorkommen und stellt die tertiäre Form der Hypothyreose dar. Des Weiteren lässt sich zwischen angeborener und erworbener Hypothyreose unterscheiden. Eine angeborene Hypothyreose liegt vor, wenn die Schilddrüse gar nicht ausgebildet wurde oder zu klein ist.

Ursachen einer erworbenen Unterfunktion der Schilddrüse sind Entzündungen, Schilddrüsenkrebs und dessen Therapie wie auch in seltenen Fällen Jodmangel. Des Weiteren können sowohl für eine Hypothyreose als auch für eine subklinische Hypothyreose die Faktoren Autoimmunthyreoditis, Radiojodtherapie, Operation, Medikamente, Thyreostatika, Jodexzesse, Interferone oder Lithium ursächlich sein. Mit zunehmendem Alter steigt zudem die Prävalenz. So beträgt diese generell bei Frauen 4% bis 10 %, während sie bei älteren Frauen zwischen 7% bis 26 % liegt (Schindler, 2003).

2.2.2 Hyperthyreose

Eine Hyperthyreose ist durch eine erhöhte Schilddrüsenfunktion gekennzeichnet, die sich in einer vermehrten Produktion von Schilddrüsenhormonen äußert.

Mögliche Ursachen können eine Immunthyreoditis, Neoplasien oder TSH-produzierende Tumore sein. Mit dem steigenden Alter nimmt die Prävalenz der Hyperthyreose zu.

Sowohl für ein normales Knochenwachstum als auch für eine normale Knochenstruktur sind Schilddrüsenhormone wie L-Thyroxin unabdingbar. Eine Erhöhung wirkt sich jedoch negativ auf den Knochen aus. Bei gleichzeitig erniedrigten TSH-Werten, wie es vor allem bei TSH-supprimierenden Schilddrüsenhormonsubstitutionen der Fall ist, wird der ungünstige Effekt weiter verstärkt und es kann zu Knochendichteverlusten kommen (Schindler, 2003).

Des Weiteren wird durch eine Hyperthyreose der Stoffwechsel vermehrt angeregt und es kommt zu einem erhöhten Grundumsatz. Einerseits wird hierdurch zwar die Knochenformation gesteigert, andererseits erfährt auch die Knochenresorption einen Anstieg. Da diese gegenüber der Knochenbildung überwiegt, resultiert bilanziell ein Knochenmasseverlust (Grisar & Pietschmann, 2000).

2.2.3 Postmenopausale Osteoporose

Eine Osteoporose ist zum einen durch den Verlust an Knochenmasse, zum anderen durch die charakteristisch veränderte Mikroarchitektur (Johnston & Slemenda, 1995) und der damit einhergehenden Erhöhung des Frakturrisikos gekennzeichnet (Holzer et al., 2007). Definitionsgemäß liegt eine Osteoporose laut den Richtlinien der WHO (1994) dann vor, wenn die Abweichung der Knochendichte (BMD) mehr als die 2,5-fache Standardabweichung (SD) im Vergleich zum Mittelwert gesunder Probanden gleichen Geschlechts beträgt.

Die postmenopausale Osteoporose gehört zu den Typ I-Osteoporosen und wird somit zu den primären Osteoporosen gezählt.

Momentane Schätzungen der Prävalenz postmenopausaler Osteoporose bei Frauen über 50 Jahren liegen bei rund 30 % (Hadjji, 2003).

Der Östrogenmangel spielt trotz multifaktorieller Pathogenese der postmenopausalen Osteoporose eine entscheidende Rolle.

Das Knochengewebe unterliegt in Form von Remodelingzyklen lebenslang einem steten Auf- und Abbau. Jährlich werden etwa 4% bis 10 % der Knochenmasse des gesamten Körpers erneuert (Hadjji, 2003).

Durch den Eintritt in die Menopause kommt es zu einem Mangel an Östrogenen, der die Frequenz des Remodelingzyklusses erhöht (Hadjji, 2003). Die Folge ist die Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Knochenresorption und Knochenformation zu Gunsten der Knochenresorption. Dabei überwiegt die Osteoklastenaktivität gegenüber der Osteoblastentätigkeit (Holzer et al., 2007). Diese gesteigerte Osteoklastenaktivität resultiert auch aus der Interleukin-6 geförderten Osteoklastogenese, die normalerweise durch 17- β -Östradiol unterdrückt wird. Durch den Östrogenverlust entfällt ebenfalls die Suppression auf das resorptive Interleukin-6 und somit resultiert eine Interleukin-6-stimulierte Osteoklastogenese (Jilka et al., 1992).

Des Weiteren führen Östrogene in vitro zu einer Apoptose der Osteoklasten, indem sie die Osteoblasten zur Bildung von TGF β anregen. Dadurch induziert eine reduzierte Östrogenkonzentration das Absinken des TGF β -Spiegels und vermindert somit die stimulierte Apoptose der Osteoklasten (Hughes et al., 1996).

Bei der Entwicklung einer Osteoporose ist anscheinend auch eine genetische Komponente beteiligt. Es wurde eine Korrelation zwischen einer sehr geringen Knochenmasse und dem damit einhergehenden gesteigerten Frakturrisiko sowie einem intronischen Polymorphismus des TGF- β -Gens gefunden.

Ähnlich verhält es sich mit dem Osteocalcin-Gen, das ebenfalls mit der Knochendichte assoziiert wird.

Außerdem ist das Kollagen-Typ-1-Gen von Interesse, bei dem Mutationen in der proteinkodierenden Region schwere Formen des osteoporotischen Phänotyps in Form der Osteogenesis imperfecta hervorrufen. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die Untersuchungen der genetischen Grundlagen der Osteoporose noch nicht vollständig aufgeklärt sind (Jap et al., 2001).

Ein weiteres Argument dafür, dass genetische Aspekte bei der Entstehung der Osteoporose eine Rolle spielen, liefern epidemiologische Untersuchungen, aus denen hervorgeht, dass das Risiko für osteoporotische Frakturen bei postmenopausalen kaukasischen (weißen) Frauen höher ist als bei asiatischen und schwarzen Frauen (DVO-Leitlinie „Osteoporose bei postmenopausalen Frauen“).

Röntgenologisch stellt sich die Osteoporose in Form einer steigenden Anzahl von Resorptionslakunen im Bereich der Knochenoberfläche dar. Darauf folgen eine Ausdünnung der Knochenbälkchen und später das vollständige Verschwinden der Querverbindungen. Dies führt häufig zu Einbrüchen der Endplatte oder zu Wirbelkörperfrakturen (Hadji, 2003).

Der proximale Femur, der distale Radius sowie die Wirbelsäule gelten als primäre Lokalisationen für solche osteoporosebedingten Frakturen (Jap et al, 2001).

2.2.4 Osteoporose beim Mann

Das klinische Bild der Osteoporose des Mannes gleicht dem der Frau. Es handelt sich um einen systemisch verminderten Mineralgehalt des Knochens, der mit einer gesteigerten Frakturinzidenz einhergeht (Kudlacek & Willvonseder, 2003). Es wird zwischen einer metabolischen und einer idiopathischen Osteoporose, aber auch zwischen einer primären und einer sekundären Form unterschieden.

Im Gegensatz zur Frau, bei der man den Auslöser der postmenopausalen Osteoporose auf einen Mangel an Östrogenen zurückführen kann, ist beim Mann keine eindeutige Ursache bekannt.

Als Grundlage der Osteoporose wird das ADAM (androgen deficiency syndrome of the aging male) - ein Syndrom mit Serumtestosteronverlust – diskutiert, was aber noch nicht als bewiesen gilt (Kudlacek et al., 2000).

Legrand et al. (2007) hingegen vertreten die Ansicht, dass die Hauptursache für die Osteoporose beim Mann meist sekundär ist. Zu den Risikofaktoren zählen Alter, Alkoholabusus, Kortikosteroidbehandlungen, Hypogonadismus und chronische Erkrankungen.

Unabhängig von diesen terminologischen Kategorisierungen gilt es als bewiesen, dass die Androgenproduktion beim Mann mit zunehmenden Alter abnimmt, jedoch kommt es hier zu keinem prompten Sistieren, wie es von der Menopause bekannt ist (Kudlacek & Willvonseder, 2003). Der allmählich absinkende Testosteronspiegel weist eine Korrelation zu einem gesteigerten Frakturrisiko von Knochen auf. So konnte eine Reduktion der Serumtestosteronkonzentration bei 20 % der Männer mit Wirbelkörperfrakturen belegt werden. Bei Männern, die eine Schenkelhalsfraktur erlitten hatten, waren sogar 50 % von der reduzierten Serumtestosteronkonzentration betroffen (Kudlacek & Willvonseder, 2003).

Stepan et al. (1989) untersuchten gesunde, per Gerichtsbeschluss kastrierte Männer und konnten bei diesen einen enormen Knochendichteverlust im Bereich der Wirbelsäule feststellen. Ebenso konnte der positive Effekt von Androgensubstitution auf die Dichte der Wirbelknochen belegt werden (Kudlacek et al., 2000). Während 0,3 % bis 1,2 % Reduzierung der Knochenmasse jährlich als physiologisch angesehen wird, betrug der Knochenmasseverlust bei diesen Männern jährlich 7 % (Kudlacek & Willvonseder, 2003).

Bei der idiopathischen Osteoporose konnten bezüglich des Gesamt-Testosteronspiegels keine Unterschiede zur gesunden Vergleichsgruppe festgestellt werden, wohl aber hinsichtlich des sex hormone binding globuline (SHBG-) Spiegel. Mit dem enorm erhöhten SHBG-Spiegel ging ein erniedrigter Free-Androgen-Index einher. Ebenso waren der Östrogenspiegel und der Knochenresorptionsparameter verändert. Während Ersterer vermindert war, war Letzterer erheblich gestiegen, so dass zwischen beiden Werten eine negative Korrelation vorlag. Auf Grund dieser

Daten liegt die Annahme nahe, dass die geringere Bioverfügbarkeit des Testosterons durch den gesteigerten SHBG–Spiegel bedingt ist und somit weniger Testosteron für die Umwandlung zum Östradiol bereitsteht. Dies wiederum erklärt den verminderten Östradiolspiegel, dem ein Anstieg der Osteoklasten bzw. der Knochenresorption folgt, da die hemmende Wirkung des Östradiols auf die Osteoklasten entfällt (Pietschmann, 2004).

Obwohl, wie oben beschrieben, das klinische Bild der Osteoporose bei Mann und Frau vergleichbar ist, können folgende Unterschiede festgehalten werden:

Ein wesentlicher Unterschied besteht im Zeitpunkt, zu dem die Osteoporose auftritt, und der Prävalenz. Während bei Männern vor Erreichen des 45. Lebensjahres häufiger Frakturen anzutreffen sind, treten sie bei Frauen in höherem Alter vermehrt in Erscheinung. Insgesamt entsprechen die Osteoporosefälle der Männer nur ungefähr einem Drittel der Inzidenz bei Frauen (Kudlacek & Willvonseder, 2003).

Sowohl die höhere maximale Knochendichte des Mannes, als auch der im Gegensatz zur Frau vergleichsweise geringere Knochenmineralgehaltverlust wird als Ursache für die niedrigere Frakturinzidenz bei Männern angesehen (Kudlacek & Willvonseder, 2003).

Doch auch die Knochenqualität spielt neben der Knochenmasse hinsichtlich der Knochenfragilität eine entscheidende Rolle. Dabei sei auf die Geometrie des Knochens hingewiesen, welche ein weiterer bestimmender Faktor der Knochenqualität ist. Im Vergleich zur Frau besitzen die Wirbelkörper des Mannes einen größeren Querschnitt. Dadurch bedingt kommt es allgemein zu weniger Einbrüchen innerhalb des Wirbels (Pietschmann et al., 2004).

2.2.5 Hypogonadismus

Für Hypogonadismus liegt bisher noch keine allgemeingültige Definition vor (Zitzmann & Nieschlag, 2001), es existiert jedoch ein Schwellenwert, dessen Unterschreitung als hypogonadal bezeichnet wird. Bei diesem Schwellenwert handelt es sich um die Testosteronkonzentration, die bei < 12 nmol/l liegen muss, um von einem Hypogonadismus sprechen zu können (Kratzik et al., 2005).

Der Altershypogonadismus wird als ein biochemisches Syndrom im fortgeschrittenen Alter bezeichnet, was unabhängig von einer verminderten genomischen Aktivität für Androgene gekennzeichnet ist (Kratzik et al., 2005).

Man unterscheidet zwischen zwei Formen des Hypogonadismus, dem Altershypogonadismus und dem, der unabhängig vom Alter auftritt. In jeder Altersstufe kann sich der männliche Hypogonadismus manifestieren (Jockenhövel F., 2005).

Die Ausprägung der klinischen Manifestation unterscheidet sich zwischen dem Altershypogonadismus und dem, der schon in jungen Jahren in Erscheinung tritt. Nur beim Hypogonadismus, der in jungen Jahren eintritt, lässt sich der signifikante somatische Charakter erkennen, der bei älteren Patienten häufig nicht auszumachen ist. So bleibt z.B. eine stark verkleinerte Prostata, die in Folge eines Hypogonadismus nur bei jungen Männern zu finden ist, bei älteren Männern aus (Zitzmann & Nieschlag, 2005).

Mit fortschreitendem Alter kann beim Mann eine Abnahme der Testosteronbiosynthese beobachtet werden, allerdings variiert diese sehr in Bezug auf den Zeitpunkt des Beginns sowie in ihrer Dynamik und im Ausmaß (Kratzik et al., 2005). Der Eintritt des Hypogonadismus im Alter ist nicht zwingend, denn circa 60% der über 80-Jährigen haben einen eugonadalen Testosterongehalt (Zitzmann & Nieschlag, 2001). Momentan wird angenommen, dass mit dem Eintritt oder dem Überschreiten der fünften Lebensdekade ungefähr ein Drittel aller Männer ein partielles Androgendefizit aufweisen (Lunglmayr, 2005).

Mögliche Ursachen, die bei der Entstehung des Altershypogonadismus eine Rolle spielen können, sind folgende: Abweichungen im Bereich der Hypothalamus-Hypophysen-Testis-Achse und des Gesundheitszustandes, wie chronische Erkrankungen, z.B. Leberschäden, Depressionen, Diabetes oder Neuropathien, die eine Reduktion des Testosterongehalts um 10 % bis 15 % im Vergleich zu gesunden Männern bewirken können. Eine Absenkung von circa 25 % des ursprünglichen Testosteronwertes kann auf Adipositas zurückzuführen sein. Eine akute Erkrankung, wie z.B. Myokardinfarkt, Operationen oder Infektionen, kann sich in einem bis zu 70 % niedrigeren Testosterongehalt manifestieren (Lunglmayr, 2005).

Doch auch andere extragonadale Faktoren, wie bestimmte Arzneimittel, können eine Beteiligung bei der Entstehung des Hypogonadismus haben (Kratzik et al., 2005). So sind z.B. H2-Blocker oder Spironolacton in der Lage, Androgenrezeptoren zu blockieren, was sowohl zu einer Beeinflussung der Androgenaktivität als auch – sekretion führen kann, während unterschiedliche Sedativa den hepatischen Steroidmetabolismus steigern und Opiate die LH-Pulsatilität verändern können (Zitzmann & Nieschlag, 2001).

Infolgedessen können vaskuläre Schäden innerhalb des Hodens auftreten, die zu einer Zirkulationsstörung der Leydig-Zellen und zu deren Reduktion führen (Lunglmayr, 2005).

In der Massachusetts-Male-Aging-Study (MMAS) wurde mit fortschreitendem Alter eine Testosteronabnahme gezeigt; diese betrug jährlich 1,6 % des Gesamttestosterons und 2 % bis 3 % beim freien Testosteron. Im Gegensatz dazu konnte beim sexualhormonbindenden Globulin (SHBG) und beim Luteinisierenden Hormon ein Anstieg verzeichnet werden. Die gesteigerte Synthese des sexualhormonbindenden Globulins führt zu einer vermehrten Bindung des Testosterons im Plasma und somit zu einer Abnahme der bioverfügbaren Testosteronfraktion. Dadurch erklärt sich die Reduktion des freien Testosterons (Kratzik et al, 2005). Dieser Vorgang wird durch eine abnehmende Freisetzung des Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) und der Wachstumshormone, die für die Inhibierung der SHBG-Produktion in den Hepatozyten verantwortlich sind, eingeleitet (Zitzmann & Nieschlag, 2001).

2.3 Hormoneinsatz

2.3.1 Nutzen - Risiko

Der Einsatz von Hormonen zu therapeutischen Zwecken erfolgt entweder in physiologischen oder supraphysiologischen Konzentrationen, wobei vor allem der Einsatz in hohen Dosierungen auch nicht frei von Risiken ist.

Bei der Hormonsubstitutionstherapie der Osteoporose handelt es sich um kombinierte Estrogen-Gestagen-Präparate (HRT), es existieren aber auch Estrogenmonotherapien (ERT).

Sie werden in erster Linie bei klimakterischen und urogenitalen Beschwerden eingesetzt sowie teilweise zur Primärprävention der Osteoporose.

Auch im Bereich der Empfängnisverhütung spielen Hormone eine große Rolle. Hier werden sie in supraphysiologischen Konzentrationen zur Unterbrechung des Regelkreises eingesetzt.

(Zu den folgenden Kapiteln siehe Übersichtsarbeit von Rabe et al., 2006)

2.3.2 Osteoporose

Die primär-präventive Wirkung von ERT/HRT bei Osteoporose konnte in zahlreichen Studien belegt werden. So wurden unter Einsatz von ERT/HRT sowohl eine Zunahme der Knochendichte wie auch eine reduzierte Frakturinzidenzrate um 30 bis 40 % nachgewiesen.

Allerdings gilt der Einsatz von Hormonen schon lange nicht mehr als erstes Mittel der Wahl in Bezug auf die Therapieempfehlungen bei Osteoporose, da eindeutig ein gesteigertes Risiko von Brustkrebs, Thrombose wie auch von Herzinfarkt und Schlaganfall nachgewiesen werden konnte. Somit gilt laut der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft die Verwendung von Hormonpräparaten bei der Behandlung von Osteoporose als Ausnahmefall.

Heutzutage gelten Antiosteoporotika wie Bisphosphonate (Alendronat, Risedronat), Östrogenrezeptor-Modulatoren (z.B. Raloxifen), Calcium und Vitamin D₃ auf Grund ihrer Wirksamkeit und ihrer Nebenwirkungsprofile als Mittel der ersten Wahl. Jedoch sind auch diese noch nicht optimiert, da sie teilweise Hitzewallungen, ösophagogastrale Irritationen, Magen-Darm-Beschwerden sowie ungenügende Compliance hervorrufen können. Zusätzlich bleibt das Thromboserisiko bestehen.

2.3.3 Mammarkarzinome

In Bezug auf ein erhöhtes Risiko eines Mammarkarzinoms unter Einfluss einer kombinierten HRT wurde eine große Anzahl von Studien durchgeführt, die allerdings sehr unterschiedliche Ergebnisse aufweisen.

Bisher existieren keine Beweise dafür, dass HRT oder ERT ursächlich für Mammarkarzinome sind. Steroiden wird in Bezug auf Brustkrebs eher die Rolle des Induktors als die des Promoters zugewiesen (Rabe et al., 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Inzidenz unter HRT erhöhte, jedoch nach mehr als 5 Jahren nach Beendigung der HRT wieder verminderte.

Das bestätigt die These der Stimulation von präexistenten Karzinomen, da sonst bei einem proliferativen Effekt das Risiko auch noch Jahre nach Beendigung der HRT fortbestehen müsste (Luzuy, 2005).

Im Gegensatz dazu belegt die Studie der Women's Health Initiative (WHI) bei Einsatz einer Hormonersatztherapie eine erhöhte Brustkrebshäufigkeit (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 2003).

Zum Abschluss ist zu bemerken, dass auch das Risiko der Krebsentstehung unter HRT in Relation gesetzt werden muss. Eine in Lancet veröffentlichte Metaanalyse (Luzuy, 2005) ergab bei Langzeitanwendung einer HRT eine Brustkrebsrisikoerhöhung von 0,5 %. Die Nurses Health Study zeigte, dass mit jedem über das vierzigste Lebensjahr hinausgehende Jahr, in dem die Frau in die Menopause eintritt, ein Anstieg des Brustkrebsrisikos von 2,8 % verbunden ist (Luzuy, 2005).

2.3.4 Kolorektale Karzinome

Kolorektale Karzinome gewinnen immer mehr an Bedeutung, da ihre Häufigkeit innerhalb der letzten Jahre enorm zugenommen hat. Mittlerweile stellen sie nach dem Mammarkarzinom die zweithäufigste Karzinomform bei Frauen dar.

Unter HRT-Anwendung konnte eine Risikoreduzierung von 30 % für das Auftreten von kolorektalen Karzinomen beobachtet werden.

Bei einer Behandlung mit einem Estrogen-Monoarm hat sich eine Alterskorrelation bezüglich des Risikos abgezeichnet: Aus bisher noch ungeklärten Gründen kam es

bei Frauen von über 70 Jahren zu einem signifikanten Risikoanstieg, während bei Frauen im Alter von unter 60 Jahren eine ca. 40 %ige Risikominderung beobachtet wurde.

Insofern kann der HRT/ERT im Einzelfall eine bemerkenswerte präventive Wirkung zugesprochen werden, wobei die Mechanismen der Risikominderung zurzeit noch ungeklärt sind (Rabe et al., 2006).

2.3.5 Endometriumkarzinome

Das Risiko für eine Entstehung des Endometriumkarzinoms ist sehr unterschiedlich, je nachdem ob HRT oder ERT zur Anwendung kommt.

Bei einer ERT besteht eine immense Steigerung des Risikos für ein Endometriumkarzinom. Bei einer sequentiellen HRT ist ebenfalls ein erhöhtes Risiko für die Bildung eines estrogenabhängigen Endometriumkarzinoms nicht auszuschließen. Im Gegensatz dazu kann mit einer steten kombinierten HRT das Risiko reduziert werden (Rabe et al., 2006).

2.3.6 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Koronare Herzerkrankungen stellen auch für Frauen die häufigste Morbiditäts- und Mortalitätsursache dar. Auf Grund dessen sollte ihnen die stärkste Gewichtung bei jeglicher Therapiestellung zuteil werden (Windler et al., 2004).

Für das Infarktisiko konnte sowohl unter alleinigem Estrogeneinsatz wie auch bei Kombinationen mit Gestagenen eine Reduzierung von 50 % beobachtet werden.

Sowohl einer HRT wie auch einer ERT kann eine kardiologische Primärprävention zugeschrieben werden. Zu beachten sei allerdings, dass der Therapiebeginn in den ersten vier Jahren nach Menopauseneintritt und möglichst vor Erreichen des 60. Lebensjahres durchgeführt werden sollte, um eine Risikoreduzierung eines Herzinfarktes zu erzielen (Rabe et al., 2006).

Langzeiteinnahmen von Hormonen können eine Hypertonie induzieren. Der Ausprägungsgrad variiert von einer Blutdruckerhöhung bei 2 % bis 5 % bis hin zur klinisch relevanten Hypertonie.

Ebenso kommt es laut einer Studie der Women's Health Initiative unter Langzeitanwendung von Hormonen zu einem eindeutig gesteigerten Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 2003).

2.3.7 Thromboserisiken

Bei der Anwendung von HRT/ERT besteht allgemein das Risiko einer Thrombose. Dies ist bei oraler Applikation um das Vierfache erhöht und bei Frauen mit kombinierter Faktor-V- und Faktor-II-Mutation sogar um den Faktor 25 gesteigert. In Anbetracht dessen sollte bei Patienten mit einem sehr hohen Thromboserisiko auf eine HRT/ERT–Therapie verzichtet werden, da diese in einem solchen Fall als Kontraindikation anzusehen ist. Das Thromboserisiko lässt sich durch transdermale Anwendung von Estrogen zwar verringern, jedoch nicht gänzlich vermeiden (Rabe et al., 2006).

2.3.8 Hirninsulte

In Bezug auf Hirninsulte stellt eine HRT wie auch eine ERT ein gesteigertes Risiko dar. Diese Risikosteigerung kann laut einer WHI–Studie (Woman's Health Initiative) 40 % betragen, jedoch betrifft dies nur Insulte thromboembolischer Natur, nicht jedoch die intrazerebralen oder subarachnoidalen Blutungen. Für ischämische Insulte fand die Nurses Health Study ebenfalls ein gesteigertes Insultrisiko heraus, allerdings nicht bei niedriger Dosierung (0,3 mg konjugierte Estrogene).

Es ist bekannt, dass bestimmte Metalloproteinasen durch oral verabreichte Estrogene hochreguliert werden und somit vor allem in akuten Situationen wie nach einem kürzlich erlebten Herzinfarkt, eine Destabilisierung arteriosklerotischer Plaques herbeiführen können (Rabe et al., 2006).

2.3.9 Gallenwegserkrankungen

Es konnte nach längerer Anwendung (ungefähr fünf Jahre) einer equinen Estrogentherapie mit MPA kombiniert eine 2 - 3fache Risikosteigerung für Gallensteinleiden und / oder Cholezystitis ermittelt werden.

Primär bei älteren Frauen ist auf diese Risikoerhöhung zu achten. Daher kann eine orale HRT/ERT bei bestehender Cholezystolithiasis als relative Kontraindikation eingestuft werden. Auf Grund dessen sollte bei einem bestehenden Risiko HRT/ERT nur transdermal appliziert werden (Rabe et al., 2006).

2.3.10 Testosteronsubstitution bei Hypogonadismus

Die Entscheidung zur Testosteronsubstitution beim Mann hängt davon ab, ob die Serum-Testosteron-Konzentration reduziert ist oder ob klinisch manifestierte Symptome eines Androgenmangels vorliegen. Erst wenn eine Kombination dieser beiden Kriterien vorliegt und eine Kontraindikation auszuschließen ist, wird zu einer Testosterontherapie geraten. Unter einer Testosteronsubstitution kommt es zu einer Muskelmassezunahme, ebenso zu einer Steigerung der fettfreien Körpermasse (Jockenhövel & Schubert, 2003). Weitere Effekte sind ein Anstieg der Knochendichte sowie eine Abnahme der Knochenresorptionsmarker und eine Erhöhung der Serummarker für Osteoblastentätigkeit (Wang et al., 2003).

Hinsichtlich des Lipidprofils bewirkt sie eine Reduktion des Gesamtcholesterins, besonders des LDL-Cholesterins, während das HDL-Cholesterin unbeeinflusst bleibt. Doch all den Vorteilen der Testosteronsubstitution steht der potentiell negative Effekt auf die Prostata gegenüber. Bisher ist noch nicht geklärt, ob Androgengaben zur Bildung eines Prostatakarzinoms führen. Ebenso unklar ist die Entstehung maligner Zellen durch Testosteronsubstitution; die Gefahr besteht eher in der Förderung der Progression von schon vorhandenen malignen Zellen, doch auch dies ist bisher nicht bewiesen.

Fest steht, dass Gaben von Testosteron bei Männern mit einer verkleinerten Prostata auf Grund von Hypogonadismus zu einer Stimulierung des Prostatawachstums führen.

Als Kontraindikationen gelten ein vorhandenes Prostatakarzinom sowie eine Polyglobulie und das Mammarkarzinom des Mannes.

Vorsicht geboten sei bei bestehender benigner Prostatahyperplasie (Jockenhövel F. & Schubert M., 2003).

2.4 Knochenstoffwechsel

Bei den hier aufgeführten Knochenparametern handelt es sich um die Knochenparameter, die beim Schwein reproduzierbar anwendbar waren und gezeigt haben, dass sie den Knochenstoffwechsel der Minipigs widerspiegeln (Babel 2007; Reif, 2007).

2.4.1 Knochenformation

Als Parameter der Knochenformation gelten folgende Knochenmarker: Carboxyterminales Propeptid des Typ 1-Kollagens (PICP), die Gesamt-Alkalische Phosphatase (ALP), die knochenspezifische Alkalische Phosphatase sowie Osteonectin und Osteocalcin.

2.4.1.1 Osteocalcin

Osteocalcin ist ein Protein von 46–50 Aminosäuren, dessen Bildung Vitamin K-abhängig und durch Vitamin D stimulierbar ist.

Es wird ausschließlich von Osteoblasten synthetisiert und gilt daher als Marker für die Osteoblastenfunktion. Seine Biosynthese erfolgt durch proteolytische Abspaltung aus einem Vorläufermolekül (Camozzi et al., 2007). Durch eine Peptidase wird aus dem Prä-Pro-Osteocalcin das Pro-Osteocalcin und dies wird durch anschließende Entfernung des Propeptids und nachfolgender Vitamin K-abhängiger γ -Carboxylierung zum bioaktiven Osteocalcin (Fournier et al., 1989; Booth et al., 2003). Dieses wird auch Knochen-GLA-Protein genannt, da es in seiner Primärstruktur drei γ -Carboxyglutaminsäurereste (GLA) aufweist. Während der Mineralisation der

Knochenmatrix wird es von Osteoblasten synthetisiert und über die drei γ -Carboxyglutaminsäurereste (GLA) in die Knochenmatrix integriert (Allen, 2003). Da der Großteil des Osteocalcins in die Matrix eingebaut wird, erreicht nur ein geringer Teil den peripheren Kreislauf (Camoszi et al., 2007). Dieser geringe Anteil, der in den Kreislauf gelangt, unterliegt einer raschen Biodegradation (Fournier et al., 1989). Folglich messen viele mono- und polyklonale Antikörper neben dem intakten Osteocalcin auch die Osteocalcinfragmente.

Die physiologische Bedeutung des Osteocalcins ist noch nicht eindeutig nachgewiesen worden. Während Resch & Bernecker (2004) sie in der Regulation der Calciumhomöostase und Hemmung der Präzipitation von Calcium und Phosphat sehen, sind andere Autoren der Ansicht, dass die Rolle des Osteocalcins in der Regulierung des Blutzuckers liegt.

Osteocalcin weist eine Halbwertszeit von ungefähr vier Minuten auf. Es unterliegt einer circadianen Rhythmik und wird hauptsächlich über die Niere ausgeschieden.

Nicht nur die circadiane Rhythmik, sondern auch andere Faktoren sind in der Lage, eine Veränderung des Osteocalcinspiegels herbeizuführen. So lassen z.B. die Menopause, Knochenmetastasen, Morbus Paget, Hyperthyreodismus oder renale Osteodystrophien den Osteocalcinspiegel ansteigen. Eine orale Antikoagulanzenientherapie mit Vitamin K-Antagonisten, ein Hypothyreodismus oder eine lange Kortikosteroid - Therapie führen dagegen genau zum Gegenteil (Resch & Bernecker, 2004).

Auf Grund dessen wird über Osteocalcin als möglichem Parameter zur Diagnose von Knochenerkrankungen nachgedacht.

2.4.1.2 Knochenspezifische Alkalische Phosphatase

Bei der Alkalischen Phosphatase (ALP) handelt es sich um ein membranständiges Enzym, das aus einer Reihe von Isoenzymen besteht, die in verschiedenen Geweben wie Knochen, Leber und Darm nachweisbar sind.

Die Isoenzyme werden durch vier Gene kodiert. Auf Grund dessen lassen sich die Isoenzyme in eine osteoblastenspezifische, hepatospezifische, und eine renale Form

einteilen. Der Unterschied dieser drei Formen liegt lediglich in der Tertiärstruktur des Proteins und dem posttranslationalen Glykosylierungsmuster (Moos, 1992).

Das osteoblastäre Isoenzym ist ein Glykoprotein, das auf der Zelloberfläche von Osteoblasten vorkommt (Swaminathan, 2001) und auch als knochenspezifische Alkalische Phosphatase (bALP) bezeichnet wird. Die bALP gilt als hochspezifischer Marker für die Osteoblastentätigkeit (Dresner-Pollak et al, 1996). Somit liefert ihre Bestimmung verlässliche Aussagen bezüglich des Knochenstoffwechsels.

Erkrankungen, wie z.B. die postmenopausale Osteoporose, metastasierende Tumore, Hyperparathyreoidismus oder Hyperthyreosen bewirken einen Anstieg der bALP-Serumkonzentration, da sie eine gute Korrelation zur Knochendichte aufweist (Behnke et al., 1996). So konnte Pedrazzoni et al., 1996 bei Frauen mit Osteoporose einen signifikant höheren bALP-Wert messen als bei etwas jüngeren postmenopausalen Frauen.

2.4.2 Knochenresorption

Zu den Markern der Knochenresorption werden Hydroxylysinglycoside, Urincalcium, Tartratresistente saure Phosphatasen, Hydroxyprolin und Crosslaps gezählt.

2.4.2.1 Crosslaps

Bei den Crosslaps handelt es sich um carboxy-terminale Telopeptide des Kollagens Typ I, ein niedermolekulares Peptid, das an Pyridinolin gebunden ist.

Streng genommen ist Typ I-Kollagen in allen Geweben vorhanden, dennoch wird primär der Abbau des Knochenkollagens anhand der Konzentration des zirkulierenden carboxyterminalen Telopeptids wiedergegeben (Resch & Bernecker, 2004).

Crosslaps werden durch die Aktivität von Osteoklasten beim Abbau von Knochenmasse freigesetzt, indem die ausgereiften Matrixkollagene proteolytisch gespalten und abgebaut werden. Somit gelangen sie in die Zirkulation und werden nicht mehr metabolisiert.

Die Crosslaps können im Blut nachgewiesen werden. Da sie zum Teil aber auch über die Niere ausgeschieden werden, ist ein Nachweis im Harn ebenfalls möglich (Vancata, 2002).

In der Osteoporosediagnostik sind Crosslaps fest etabliert. Die Knochenmarker können nicht nur bei der Erstellung eines Osteoporose-Therapieplans helfen, sondern auch Aussagen über die Effizienz einer Therapie ermöglichen (Gasser, 2001).

Athletinnen leiden häufig an frühzeitiger Osteoporose; bei entsprechenden Untersuchungen konnte z.B. ein signifikant höherer Anteil der Knochenabbaumarker Crosslaps im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen festgestellt werden (Herrmann & Herrmann, 2004).

2.4.2.2 Pyridinolin und Desoxypyridinolin (Kollagen-Crosslinks)

Als Hauptvertreter gelten Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD), die Quervernetzungsprodukte der Kollagenketten sind und während der Kollagenreifung gebildet werden. Diese Quervernetzungsverbindungen kommen primär zwischen den Aminosäuren des helikalen Teils eines Moleküls und den Resten der amino- oder carboxyterminalen Region eines zweiten Moleküls vor. Sie werden als Telopeptide bezeichnet und sind für die große Stabilität der Kollagene verantwortlich.

Durch den proteolytischen Abbau im Rahmen der Knochenresorption gelangen Bestandteile des Matrixkollagens in die Blutzirkulation, wo sie nicht mehr metabolisiert werden und über die Niere ausgeschieden werden. Dadurch ist die Nachweismöglichkeit über den Urin gegeben.

Da Desoxypyridinolin hauptsächlich im Knochen nachgewiesen werden konnte, während Pyridinolin auch im Knorpelgewebe und Bändern vorkommt, gilt Desoxypyridinolin als Resorptionsmarker mit der höchsten Knochenspezifität (Eyre et al., 1984, Seibel et al., 1992).

Es konnte eine Korrelation zwischen den Kollagen-Crosslinks und der histomorphometrischen Auswertung bei an Osteoporose erkrankten Menschen festgestellt werden. Es besteht eine Korrelation zwischen fortgeschrittenem Alter und der

Ausscheidung von PYD und DPD. Bei menopausalen Frauen war ein Anstieg um 50-100 % zu beobachten (Delmas, 1993; Seibel et al., 1993).

3. Material und Methoden

3.1 Ziel des Versuches

Ziel dieser Studie war es erstmalig zu prüfen, ob eine nichtinvasive hormonelle Behandlung am Minipig, als „large animal model“, in der Lage ist, hinsichtlich der Sexualhormonproduktion die gleichen Effekte wie ein ovariektomiertes Osteoporosemodell hervorzurufen.

Es sollte überprüft werden, ob die Unterdrückung der Sexualhormonproduktion zu ähnlichen Veränderungen im Knochenstoffwechsel führt, wie bei der Erkrankung Osteoporose.

Dies könnte, bei erfolgreichem Ergebnis, als Grundlage eines nichtinvasiven Großtiermodells für Osteoporosestudien dienen.

Der Versuch wurde mit der Genehmigung der Regierung von Oberbayern (Aktenzeichen: 55.2-1-54-2531-38-06) durchgeführt.

3.2 Versuchsdurchführung

Die Versuche wurden mit 10 Dresdner Minipigs durchgeführt, deren Alter zu Beginn des Versuches 31 Monate betrug. Die Dauer des Versuches umfasste 18 Wochen.

Zu Versuchsbeginn wurden die Tiere in zwei Gruppen randomisiert eingeteilt, einer Kontrollgruppe (n=4) und einer Versuchsgruppe (n=6).

Den Tieren der Versuchsgruppe wurde dreimal subkutan ein Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Analogon, mit einem Trägerprotein konjugiert, injiziert. Als Präparat diente Improvac® (Pfizer Animal Health, Australia). Die Injektionen erfolgten zu den Zeitpunkten Woche 0, 6 und 14.

Die Versuchsgruppe wird im folgenden Text als immunkastrierte Gruppe bezeichnet. Die Tiere der Kontrollgruppe hingegen blieben unbehandelt und dienten als intakte Kontrollgruppe.

Die beiden Gruppen unterschieden sich auch hinsichtlich der Calciumzufuhr. Die Tiere der immunkastrierten Gruppe erhielten über die gesamte Versuchsdauer hinweg eine Calciumversorgung, die knapp unter der Empfehlung für Schweine lag, während die Tiere aus der Kontrollgruppe Calcium-normal versorgt wurden.

Allen Schweinen wurden in regelmäßigen Abständen (Woche 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 18) Blut entnommen und daraus Serum gewonnen. Im Serum wurde die Konzentration von 17- β -Östradiol sowie die Konzentrationen der biochemischen Parameter des Knochenstoffwechsels Osteocalcin und Crosslaps bestimmt.

In Abb.2 ist der Versuchsaufbau zusammengefasst dargestellt:

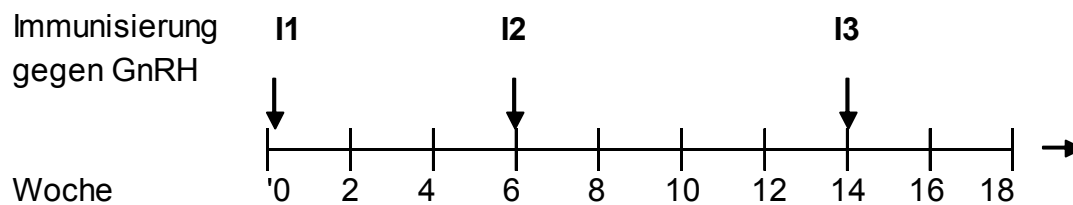


Abbildung 2: Zeitliche Übersicht des Versuchsaufbaus. I1, I2, I3: Immunisierung gegen GnRH.

Bestimmung der Knochenmarker: Woche 0, 2, 6, 8, 10, 12, 14, 18

Bestimmung der Östrogene: Woche 0, 6, 12, 18

3.3 Haltung und Fütterung

Die Minipigs wurden in Einzelboxen mit Sichtkontakt zum benachbarten Schwein gehalten („Dänisches System“). Als Einstreu in den Boxen diente Stroh.

Die Fütterung erfolgte zweimal täglich: Eine Ration beinhaltete 275 g pelletiertes kommerziell hergestelltes Alleinfutter für Minipigs (Zimmerer - Werk, Landshut) sowie etwas Heu als zusätzliche Rohfaserquelle.

Bis auf den Calciumgehalt war die Zusammensetzung des Futters für die Kontroll- und Versuchsgruppe identisch. Während der Calciumgehalt im Futter der Kontrollgruppe 1,0 % betrug, lag er bei der Versuchsgruppe bei 0,7 % (siehe Tabelle 1).

Wasser stand den Tieren über eine Nippeltränke ad libitum zur Verfügung.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Alleinfutters

	Kontrollgruppe	Immunkastrierte Gruppe
Rp	16,3 %	
Rfe	3,3 %	
Rfa	14,2 %	
Ra	7,8 %	
P	0,7 %	
Na	0,2 %	
Mg	0,3 %	
Ca	1,0 %	0,7 %

Zu Versuchsbeginn erhielten die Tiere gegen Parasitenbefall Ivomec® (Ivermectin, Merial, Hallbergmoos) subkutan.

Die Klauenpflege wurde regelmäßig mit Hilfe eines Bandschleifers und einer Zange durchgeführt. Die Tiere erhielten zu diesem Zweck eine Allgemeinanästhesie, aus einer Kombination von Ursotamin (Ketaminhydrochlorid, Firma Serumwerke, Bernburg AG) und Stresnil (Azaperon, Firma Janssen Pharmaceutica, Beerse; Belgien).

3.4 Applikation des Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Analogons („Immunkastration“)

Zu den Zeitpunkten Woche 0, 6 und 14 wurde den Tieren der Versuchsgruppe (immunkastrierte Gruppe) ein Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Analogon, an ein Trägerprotein gebunden, injiziert (s.c.). Als Präparat diente Improvac® (Pfizer Animal Health, Australia). Die Dosierung betrug 2ml / Tier, was im Mittel einer Dosis von 0,05 mg Antigen pro kg Körpergewicht entspricht.

Die Tiere wurden mittels Drahtschlinge fixiert. Die erste und dritte Injektion erfolgten subkutan in eine aufgezoogene Hautfalte hinter dem Ohr, am M. brachiocephalicus. Die zweite Injektion erfolgte auf der gegenüberliegenden Seite.

3.5 Serumgewinnung

Um tageszeitliche Schwankungen auszuschließen, erfolgte die Blutabnahme immer zur selben Uhrzeit, nüchtern um 9.00 Uhr. Die Minipigs wurden dabei mit Hilfe einer Drahtschlinge fixiert. An der Vena jugularis dextra wurde mittels Monovetten (Monovette®, 9 ml, der Firma Sarstedt, Nürnberg) im Durchschnitt 5 ml Blut pro Tier entnommen, das unmittelbar zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das überstehende Serum abpipettiert und in Eppendorf Cups bis zur Analyse bei -80°C tiefgefroren.

3.6 Bestimmung der Östradiol – Konzentration

Die Bestimmung der 17- β - Östradiolkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des Estradiol II CalSets II (Elecsys 1010, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Beim Elecsys 1010 handelt es sich um ein vollautomatisches Multibatch – Analysengerät auf Basis des elektrochemischen Lumineszenzverfahrens zur Bestimmung immunologischer Tests.

Die auf Chemolumineszenz basierenden Reaktionen werden elektronisch initiiert und die jeweilige Lichtemission bestimmt. Damit der Elecsys in der Lage ist, die zu messenden Serumproben, Standards und Kontrollen zu erfassen, wurden diese in mit Barcodes versehene Röhrchen überführt.

Bevor die Messungen stattfanden, wurde der Elecsys vor jeder Inbetriebnahme kalibriert.

Die darauf folgende Messung erfolgte vollautomatisch.

3.7 Bestimmung des Osteocalcins

Die Bestimmung des Osteocalcins erfolgte mit Hilfe des Metra Osteocalcin Immunoassays (Metra Osteocalcin EIA, Quidel Corporation, San Diego, CA, USA), der zur quantitativen Bestimmung von intaktem (De-novo-) Osteocalcin im Serum dient.

Beim Metra Osteocalcin EIA handelt es sich um einen kompetitiven Immunoassay. Dieser Test beruht auf Teststreifen, die mit Osteocalcin beschichtet sind, einem Anti-Osteocalcin-Antikörper von Mäusen sowie einem alkalischen Anti-Maus-IgG-Phosphatasekonjugat und einem pNPP-(p-Nitrophenyl-Phosphat)-Substrat.

Das zu untersuchende Serum musste in einem Verhältnis von 1: 10 mit Waschpuffer verdünnt werden, da die Konzentration des Osteocalcins im Serum zu hoch war und dadurch außerhalb des Messbereiches lag.

Alle zu verwendenden Reagenzien sollten vor Testbeginn Raumtemperatur (in einem Temperaturbereich zwischen 20 und 25 °C) haben.

Der zu verwendende Waschpuffer muss in einem Verhältnis von 1:10 mit entionisiertem Wasser angesetzt werden.

Zunächst wurden in die Testreihen der Mikrotiterplatte entweder jeweils 25 µl Standardlösung, Kontrolle oder Probe pipettiert, gefolgt von je 125 µl Anti – Osteocalcin und für 120 ± 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Enzymkonjugat vorbereitet, indem alle Fläschchen des Enzymkonjugates mit 10 ml Waschpuffer befüllt wurden.

Nach der Inkubation schloss sich der nächste Waschschrift an, der mit jeweils 200 µl Waschpuffer manuell durchgeführt wurde und insgesamt dreimal erfolgte.

Anschließend wurden die Testreihen mit je 150 µl Enzymkonjugat beschichtet und für 60 ± 5 Minuten inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde die Substratlösung angesetzt (Auflösung einer Substratablette in der Substratpufferflasche).

Nach beendeter Inkubation wurden die Mikrotiterwells erneut gewaschen, dreimal mit jeweils 200 µl Waschpuffer pro Well.

Anschließend wurden die Teststreifen mit je 150 µl Substratlösung beschichtet und für 35 – 40 Minuten inkubiert.

Dieser Vorgang wurde mit Hilfe der Stopplösung unterbrochen, von der jeweils 50 µl in die Wells pipettiert wurde.

Daraufhin folgte innerhalb von 15 Minuten die Messung der Extinktion bei 405 nm.

3.8 Bestimmung der Crosslaps

Die Bestimmung der Crosslaps erfolgte mit Hilfe eines Serum CrossLaps® ELISA (Nordic Bioscience Diagnostics, Herlev, Dänemark). Beim Serum CrossLaps® ELISA handelt es sich um einen enzymimmunologischen Test, der zur Quantifizierung von Abbauprodukten C-terminaler Telopeptide des Typ-1 Kollagens Verwendung findet. Vor Beginn der Testdurchführung wurde der Waschpuffer in einer Verdünnung von 1 + 50 mit destilliertem Wasser angesetzt, die Antikörperlösung wurde ebenfalls vorab hergestellt, indem der Peroxidase-konjugierte Antikörper, der biotinylierte Antikörper und der Inkubationspuffer in einem Volumenverhältnis von 1: 1: 100 angesetzt wurden.

Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass alle Reagenzien während der Testdurchführung Raumtemperatur (18 – 22 °C) hatten.

Zu Beginn wurden die Mikrotiterwells mit jeweils 50 µl Standard (A – F), Kontrolle oder unbekannter Probe beschickt, anschließend wurden jeweils 150 µl der Antikörperlösung dazu pipettiert. Dieses Gemisch wurde für 120 ± 5 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Mikrotiterplatte fünfmal manuell mit jeweils 200 µl Waschpuffer gewaschen.

Danach wurden jeweils 100 µl der Substratlösung zu den Teststreifen gegeben und diese dann erneut inkubiert (15 Minuten). Anschließend wurden in jedes Well 100 µl von der Stopplösung pipettiert. Innerhalb der nächsten zwei Stunden erfolgt die Absorptionsmessung bei 450 nm mit 650 nm als Referenz.

3.9 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten wurde mit Hilfe des Mann-Whitney Rank Sum Tests des Statistikprogramms SigmaStat, Version 3.0, Systat Software Inc., Richmond, CA, USA, durchgeführt.

Es wurde jeweils der arithmetische Mittelwert (MW) zur Zusammenfassung von Einzelwerten gebildet, sowie die Standardabweichung (SD) als Maß für die Streuung der Einzelwerte berechnet.

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt wurden mit „*“ gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 Allgemeinbefinden und Gewichtsentwicklung

Das Allgemeinbefinden der Minipigs war über den gesamten Versuch hinweg ungestört und als gut zu bewerten.

Ein Teil der Tiere war zwischenzeitlich von Räudemilben befallen; diese wurden mit einer Dectomax® (Doramectin, Pfizer) Injektion i.m. (1ml für 33 kg) behandelt.

Während des gesamten Versuchszeitraums war eine leichte Gewichtszunahme zu verzeichnen. Bei Versuchsbeginn lag das durchschnittliche Gewicht bei 36,96 kg, in Woche 18 betrug das Durchschnittsgewicht 38,95 kg.

Aus Tabelle 2 geht die Gewichtsentwicklung beider Gruppen im Verlauf des Versuches hervor.

Tabelle 2: Mittlere Gewichte (MW \pm SD) in kg der Minipigs der immunisierten Gruppe (n=6) und der Kontrollgruppe (n=4) im Verlauf des Versuches

Woche	Kontrollgruppe (Mittelwert)	Immunisierte Gruppe (Mittelwert)
0	36,84 \pm	37,08 \pm
18	37,91 \pm	39,98 \pm

4.2 17- β -Östradiol

Tabelle 3 sind die Konzentrationen an 17- β -Östradiol im Serum der Einzeltiere in beiden Gruppen im Verlauf des Versuches zu entnehmen.

Tabelle 3: 17- β -Östradiolkonzentrationen (in pg/ml) der Einzeltiere der Kontrollgruppe (n = 4) und der immunisierten Gruppe (n = 6) zu den Untersuchungszeitpunkten Woche 0, 6, 12 und 18

Woche	Kontrollgruppe				Immunisierte Gruppe					
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 6	Tier 7	Tier 8	Tier 9	Tier10
0#	27,49	16,47	19,26	18,97	54,73	35,08	25,62	32,43	34,38	37,01
6#	58,29	19,82	19,03	16,32	47,09	32,45	27,09	23,90	25,42	34,93
12	18,01	18,34	20,41	21,10	43,85	44,05	28,90	21,88	26,04	14,04
18	16,68	21,04	24,04	8,26	30,71	33,75	23,59	23,61	26,90	14,25

: Zeitpunkte der Immunisierung gegen GnRH mittels Improvac®

Bei den Tieren der Kontrollgruppe ist über den Versuchsverlauf bis auf zwei Ausnahmen eine relativ gleichmäßige Östradiolkonzentration im Serum zu beobachten. Die Ausnahmen stellten zum einen Tier Nr. 1 mit einem Anstieg um über 100 % in Woche 6 dar, und zum anderen Tier Nr. 4 mit einem Abfall um ca. 50 % in Woche 18.

In der immunisierten Gruppe ist bei allen Tieren bis auf ein einziges Tier zu einem Zeitpunkt (Tier Nr. 6, Woche 12) ein kontinuierlicher Abfall der Östradiolkonzentrationen über den gesamten Versuchszeitraum zu beobachten.

In den Abbildungen 3 und 4 ist dieser Einzeltierverlauf für die zwei Gruppen graphisch dargestellt.

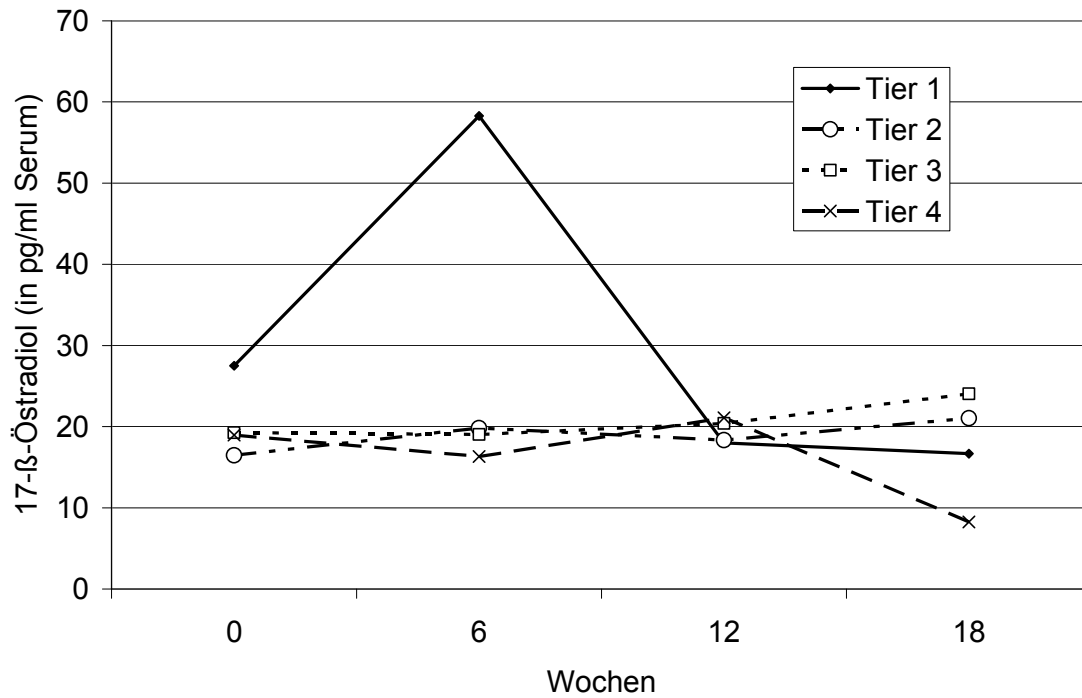


Abbildung 3: Verlauf der 17-β -Östradiolkonzentrationen (pg/ml) für die 4 Tiere der Kontrollgruppe über den gesamten Versuchszeitraum (Woche 0-18)

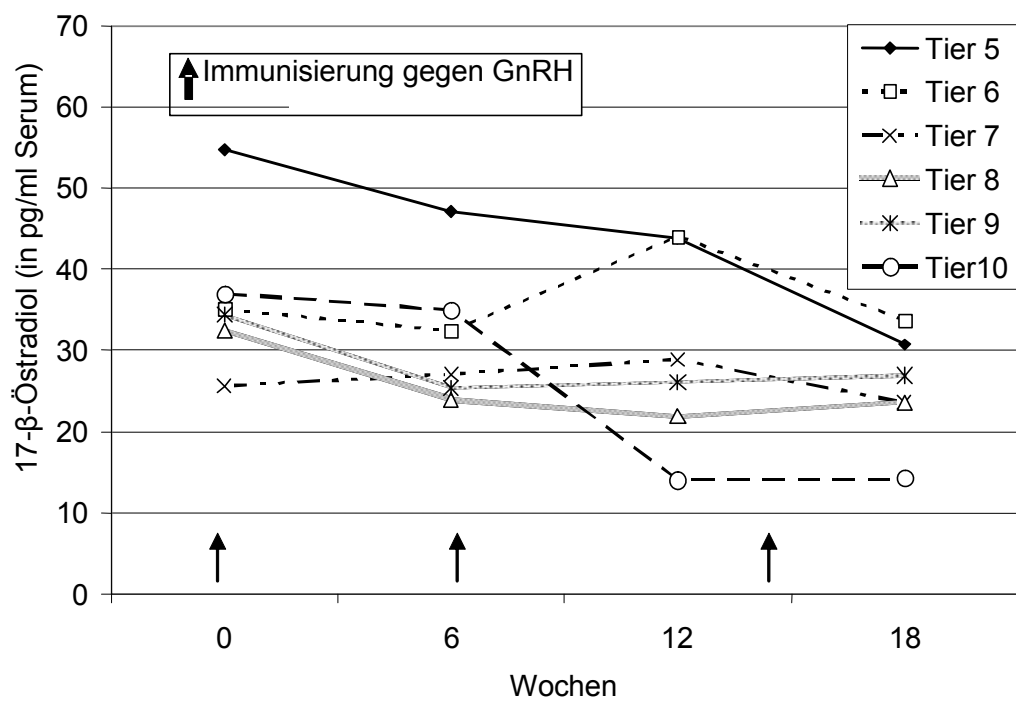


Abbildung 4: Verlauf der 17-β-Östradiolkonzentrationen (pg/ml) für die 6 Tiere der Versuchsgruppe über den gesamten Versuchszeitraum (Woche 0-18)

Tabelle 4 stellt die mittleren Konzentrationen an 17- β -Östradiol beider untersuchten Gruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten dar.

Tabelle 4: Mittlere Konzentrationen der 17- β -Östradiolwerte (MW \pm SD) in pg/ml im Serum der Minipigs der immunisierten Gruppe (n=6) und der Kontrollgruppe (n=4) zu den Zeitpunkten Woche 0, 6, 12 und 18

Woche	Kontrollgruppe	Immunisierte Gruppe
0#	20,55 \pm 4,79	36,54 \pm 9,74*
6#	28,37 \pm 20,01	31,81 \pm 8,59
12	19,47 \pm 1,52	29,79 \pm 12,05
18	17,51 \pm 6,86	25,47 \pm 6,8

(p < 0,05)

: Zeitpunkte der Immunisierung gegen GnRH mittels Improvac®

Zu Beginn der Studie liegt ein signifikanter Unterschied bezüglich der Östradiolwerte zwischen den beiden Gruppen vor.

Im weiteren Verlauf kommt es im Gruppenmittelwert für Östradiol in der Kontrollgruppe zunächst zu einem Anstieg, der dann wieder in den Bereich des Ausgangswertes abfällt.

In der Gruppe der immunisierten Tiere ist ein kontinuierlicher Abfall zu beobachten, der nach 18 Wochen in einem Östradiolwert resultiert, der um 30 % unterhalb des Ausgangswertes liegt.

Um den Verlauf der Östradiolkonzentration über den gesamten Versuchszeitraum zu beurteilen, wurden für beide Gruppen die sog. „area under the curve“ (AUC, Fläche unter der Kurve) berechnet, die sich aus dem Verlauf der Östradiolkonzentration ergibt. In Tabelle 5 sind die mittleren Werte für die Berechnung der Fläche unter der Kurve für Östradiol dargestellt.

Tabelle 5: Fläche unter der Kurve (AUC) der 17- β -Östradiolkonzentrationen im Serum (MW \pm SD) der beiden Gruppen über den gesamten Zeitraum der Untersuchung (18 Wochen).

	AUC von 17- β -Östradiol in pg/ml
Kontrollgruppe	66,9 \pm 21,4
Immunisierte Gruppe	92,6 \pm 24,3

Die AUC-Werte der immunisierten Gruppe liegen dabei um ca. 28 % oberhalb der Werte der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis ist jedoch statistisch nicht signifikant und sollte nicht überbewertet werden, da es in erster Linie den zu Beginn der Untersuchung höheren Östradiolwert der Tiere der immunisierten Gruppe widerspiegelt.

4.3 Osteocalcin

Tabelle 6 sind die Osteocalcinkonzentrationen im Serum der Einzeltiere in beiden Gruppen im Verlauf des Versuches zu entnehmen.

Tabelle 6: Osteocalcinkonzentrationen (in ng/ml) der einzelnen Tiere beider Gruppen in den Wochen 0, 2, 6, 8, 10, 12, 14 und 18

Woche	Kontrollgruppe				Immunisierte Gruppe					
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 6	Tier 7	Tier 8	Tier 9	Tier10
0 #	244,54	288,25	192,58	298,97	188,87	100,62	298,99	134,23	272,58	299,38
2	158,47	139,28	69,20	107,43	101,43	153,02	107,65	117,74	122,98	99,25
6 #	138,57	118,56	43,79	126,41	43,90	113,21	73,42	83,11	59,27	69,58
8	122,1	105,25	47,94	121,89	45,30	73,36	37,33	79,37	115,18	112,89
10	59,8	90,20	41,51	90,96	298,13	89,16	61,08	82,78	83,59	62,24
12	128,7	131,46	129,36	135,85	138,24	103,01	118,84	154,19	165,9	96,71
14 #	98,33	196,7	109,22	263,92	181,84	82,56	35,12	170,66	162,47	84,06
18	91,36	148,64	211,53	44,96	117,33	87,00	37,04	94,32	157,08	208,66

: Zeitpunkte der Immunisierung gegen GnRH mittels Improvac®

Trotz teilweise erheblicher interindividueller Schwankungen fiel die Osteocalcinkonzentration im Serum im Schnitt bei allen Tieren innerhalb des Versuchszeitraums von 18 Wochen auf durchschnittlich 60 % des Ausgangswertes.

Die einzige Ausnahme bildet ein Tier (Nr. 3) der Kontrollgruppe, dessen Osteocalcinwert nach 18 Wochen oberhalb des Ausgangswertes lag.

In den Abbildungen 5 und 6 ist dieser Einzeltierverlauf für die zwei Gruppen graphisch dargestellt.

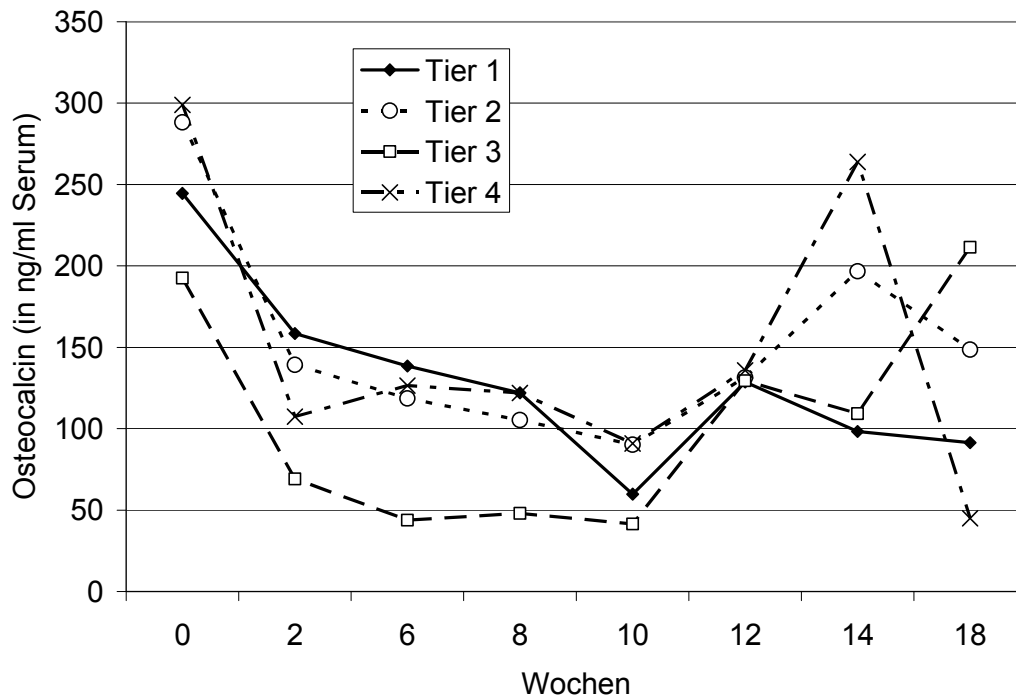


Abbildung 5: Verlauf der Osteocalcinkonzentrationen (ng/ml) für die 4 Tiere der Kontrollgruppe über den gesamten Versuchszeitraum (Woche 0-18)

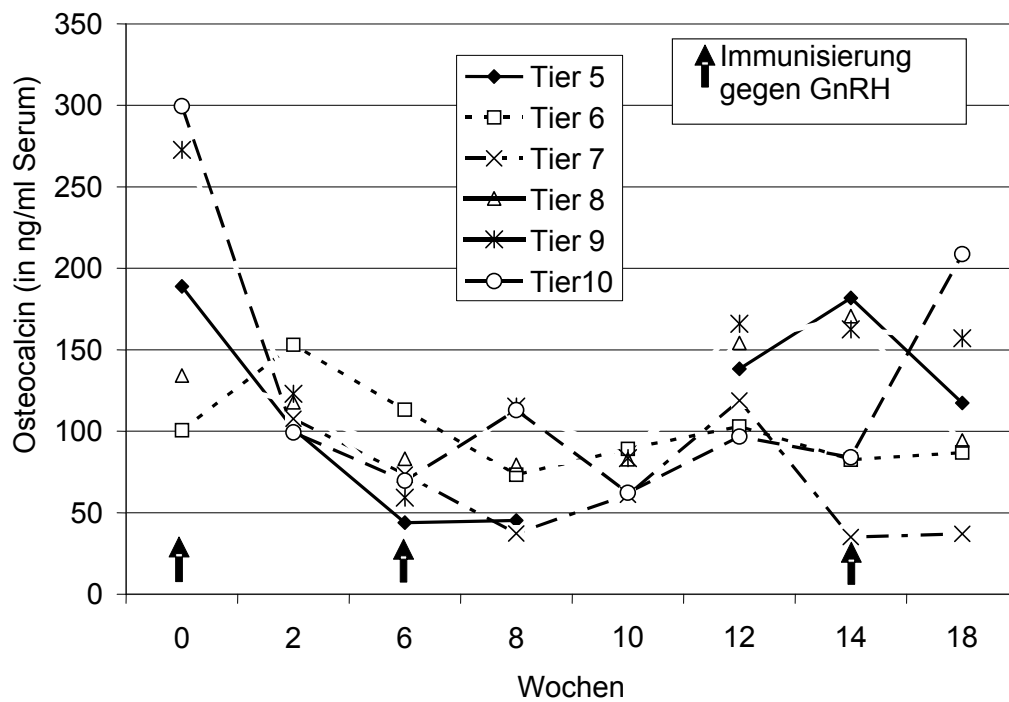


Abbildung 6: Verlauf der Osteocalcinkonzentrationen (ng/ml) für die 6 Tiere der Versuchsgruppe über den gesamten Versuchszeitraum (Woche 0-18)

In Tabelle 7 sind die Mittelwerte von Osteocalcin im Serum bei beiden Gruppen über die gesamte Versuchsdauer wiedergegeben.

Tabelle 7: Mittlere Konzentrationen von Osteocalcin (MW \pm SD) in ng/ml im Serum der Minipigs der immunisierten Gruppe (n=6) und der Kontrollgruppe (n=4) im Zeitraum nach der Injektion des GnRF-Analogons.

Woche	Kontroll – Gruppe	Immunisierte Gruppe
0#	256,08 \pm 48,44	177,14 \pm 93,79
2	118,59 \pm 39,08	117,01 \pm 19,89
6#	106,83 \pm 42,83	73,75 \pm 23,51
8	99,29 \pm 35,13	77,24 \pm 32,69
10	70,62 \pm 24,23	82,59 \pm 20,42
12	131,34 \pm 3,23	129,4 \pm 27,97
14#	167,29 \pm 78,29	119,45 \pm 60,15
18	124,12 \pm 72,07	116,9 \pm 59,69

: Zeitpunkte der Immunisierung gegen GnRH mittels Improvac®

Betrachtet man die mittleren Osteocalcinkonzentrationen in beiden Gruppen, so fällt auf, dass sich im Mittel ein fast paralleler Verlauf ergibt. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Versuchsgruppe fallen die Werte bis zur 6. Woche ab, um danach wieder anzusteigen, wobei es in der Kontrollgruppe zu einem stärkeren Anstieg als in der Versuchsgruppe (Woche 14) kommt. Dieser Unterschied ist jedoch zwischen den zwei Gruppen statistisch nicht signifikant. Trotz des Anstiegs im letzten Drittel des Untersuchungszeitraums erreichen die mittleren Osteocalcinkonzentrationen nicht mehr das Niveau des Versuchsbeginns.

Um die Osteocalcinexpression über den gesamten Versuchszeitraum zu beurteilen, wurden für beide Gruppen die sog. „area under the curve“ (AUC, Fläche unter der Kurve) berechnet, die sich aus dem Verlauf der Osteocalcinkonzentration ergibt. In Tabelle 8 sind die mittleren Werte für die Berechnung der Fläche unter der Kurve für Osteocalcin dargestellt.

Tabelle 8: Fläche unter der Kurve (AUC) der Osteocalcinkonzentrationen im Serum (MW \pm SD) der beiden Gruppen über den gesamten Zeitraum der Untersuchung (18 Wochen).

	AUC von Osteocalcin in ng/ml
Kontrollgruppe	884,1 \pm 173,1
Immunisierte Gruppe	764,5 \pm 146,1

Bei der Betrachtung der Werte fällt auch hier wieder die relativ hohe Standardabweichung auf, die die starke interindividuelle Streuung innerhalb der beiden Gruppen widerspiegelt. Die AUC für Osteocalcin lag in der Kontrollgruppe 15 % oberhalb der Konzentration in der Versuchsgruppe, jedoch ist dieser Unterschied nicht statistisch signifikant.

4.4 Crosslaps

Aus Tabelle 9 gehen die Crosslapskonzentrationen der Einzeltiere in beiden Gruppen im Verlauf des Versuches hervor.

Tabelle 9: Crosslapskonzentrationen (in ng/ml) der einzelnen Tiere, aus der Kontrollgruppe (n = 4) und der immunisierten Gruppe (n = 6) über den gesamten Versuchszeitraum (Woche 0-18)

Woche	Kontrollgruppe				Immunisierte Gruppe					
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 6	Tier 7	Tier 8	Tier 9	Tier10
0 #	0,651	0,676	0,422	0,425	0,243	0,885	0,442	0,685	0,458	0,328
2	1,461	0,674	0,829	1,214	0,616	1,493	1,509	1,110	0,585	0,423
6#	1,184	1,319	0,439	0,710	0,891	0,605	0,942	0,934	0,717	0,724
8	1,667	1,779	0,564	1,153	0,970	0,622	0,862	0,996	0,838	0,704
10	1,145	1,486	0,386	0,605	1,038	0,226	0,475	1,225	0,958	0,776
12	0,539	0,524	0,209	0,284	0,285	0,167	0,354	0,333	0,275	0,270
14#	0,622	0,542	0,289	0,344	0,426	0,306	0,419	0,489	0,607	0,377
18	0,380	0,481	0,148	0,143	0,177	0,234	0,374	0,226	0,288	0,306

: Zeitpunkte der Immunisierung gegen GnRH mittels Improvac®

Bei allen Tieren der beiden Gruppen kann mit Ausnahme eines Tieres (Tier Nr. 2) in der Kontrollgruppe in den ersten zwei Wochen des Versuchs ein Anstieg der Crosslapskonzentration im Serum beobachtet werden. Dieser Anstieg setzt sich bis zur 8. Woche fort, wobei der Anstieg bei den Tieren der Kontrollgruppe wesentlich deutlicher zu beobachten ist, als bei den Tieren der Versuchsgruppe. Danach folgt ein genereller Abfall der Crosslapskonzentrationen, wobei dieser unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit bei den einzelnen Tieren unterschiedlich stark ausfällt und es bei manchen Tieren noch in der Woche 14 zu einem leichten Anstieg kommt.

In den Abbildungen 7 und 8 ist dieser Einzeltierverlauf für die zwei Gruppen graphisch dargestellt.

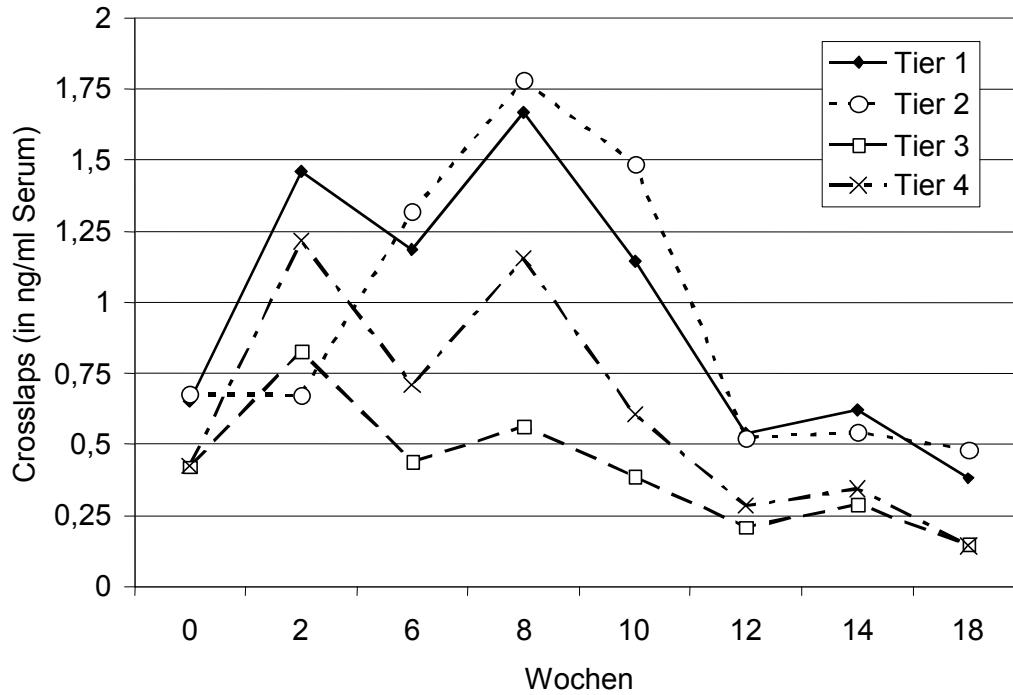


Abbildung 7: Verlauf der Crosslapskonzentrationen (ng/ml) für die 4 Tiere der Kontrollgruppe über den gesamten Versuchszeitraum (Woche 0-18)

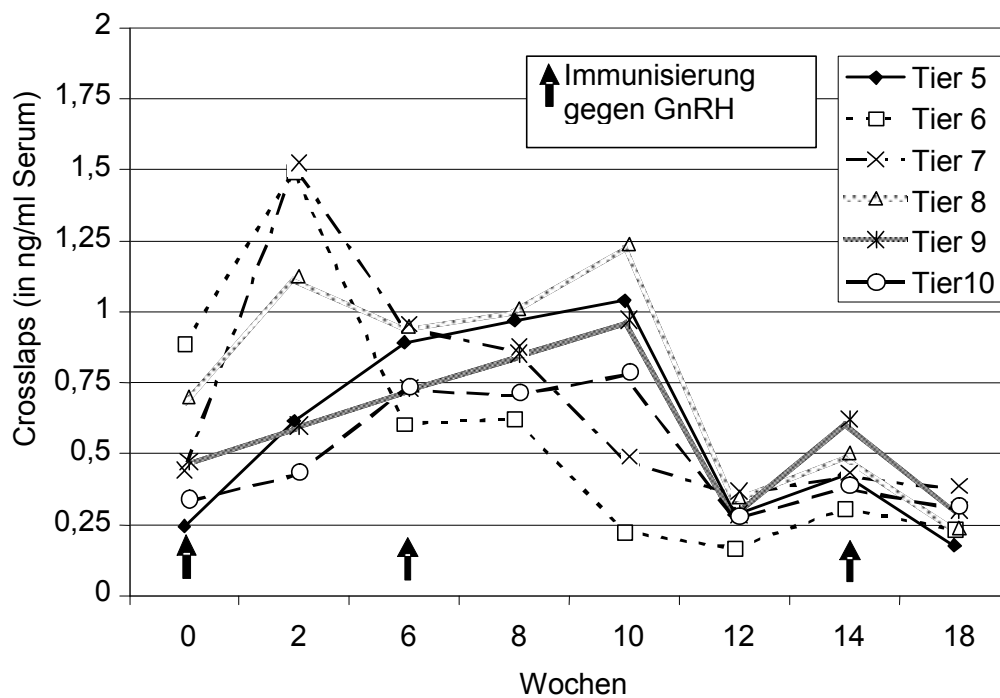


Abbildung 8: Verlauf der Crosslapskonzentrationen (ng/ml) für die 6 Tiere der Versuchsgruppe über den gesamten Versuchszeitraum (Woche 0-18)

In Tabelle 10 sind die Mittelwerte der Crosslapskonzentrationen beider Gruppen über die gesamte Versuchsdauer wiedergegeben

Tabelle 10: Mittlere Konzentrationen der Crosslaps (MW \pm SD) in ng/ml im Serum der Minipigs aus der immunisierten Gruppe (n=6) und der Kontrollgruppe (n=4)

Woche	Kontrollgruppe	Immunisierten Gruppe
0#	0,54 \pm 0,14	0,51 \pm 0,24
2	1,04 \pm 0,36	0,96 \pm 0,48
6#	0,91 \pm 0,41	0,80 \pm 0,14
8	1,29 \pm 0,56	0,83 \pm 0,15
10	0,91 \pm 0,5	0,78 \pm 0,37
12	0,39 \pm 0,17	0,28 \pm 0,07
14#	0,45 \pm 0,16	0,44 \pm 0,10
18	0,29 \pm 0,17	0,27 \pm 0,07

: Zeitpunkte der Immunisierung gegen GnRH mittels Improvac®

Bei Betrachtung der Mittelwerte der Crosslapskonzentrationen fällt auf, dass sie in beiden Gruppen einen nahezu vergleichbaren Verlauf über den gesamten Versuchszeitraum zeigen, wobei es in der Kontrollgruppe im Gegensatz zur Versuchsgruppe zu einem deutlichen Anstieg in der 8. Woche des Versuchs kommt. Dieser Unterschied ist jedoch zwischen den Gruppen statistisch nicht abzusichern. Zu Ende des Versuches (Woche 12 bis 18) sind bei beiden Gruppen Schwankungen mit einem geringen Anstieg der Konzentrationen zu beobachten. Am Ende des Versuchs liegen die Crosslapskonzentrationen in der Kontrollgruppe und in der immunisierten Gruppe jeweils ca. 50 % unterhalb der Konzentrationen des Versuchsbeginns.

Um die Crosslapsexpression über den gesamten Versuchszeitraum zu beurteilen, wurden für beide Gruppen die sog. area under the curve (AUC, Fläche unter der Kurve) berechnet, die sich aus dem Verlauf der Crosslapskonzentration ergibt. In Tabelle 11 sind die mittleren Werte für die Berechnung der Fläche unter der Kurve für die Crosslaps dargestellt.

Tabelle 11: Statistische Auswertung der Fläche unter der Kurve (AUC) der Crosslapgehalte im Serum beider Gruppen über den gesamten Versuchsablauf hinweg

	AUC von Crosslaps in ng/ml
Kontrollgruppe	5,4 ± 2,0
Immunisierte Gruppe	4,5 ± 0,7

Die AUC-Werte für die Crosslaps liegen in der Kontrollgruppe ca. 17 % oberhalb der Werte der Versuchsgruppe, jedoch ist dieser Unterschied nicht statistisch signifikant.

5. Diskussion

5.1 Ausgewähltes Modell

Ziel dieser Studie war es erstmals zu prüfen, ob es möglich ist, ein nichtinvasives Großtier-Osteoporosemodell für den Knochenstoffwechsel zu etablieren.

Zu diesem Zweck sollte bei Minipigs, als „large animal model“, durch eine nichtinvasive Behandlung die Sexualhormonproduktion in dem Maße unterdrückt werden, dass es zu Veränderungen im Knochenstoffwechsel kommt, die den Veränderungen bei der Erkrankung Osteoporose bzw. den Effekten bei ovariectomierten Osteoporose-Modellen entsprechen. Bei erfolgreichem Ergebnis könnte somit die Grundlage für den Einsatz eines nichtinvasiven Großtier-Osteoporosemodells geschaffen werden.

Neben ethischen Gründen, aus denen ein nichtinvasives Tiermodell immer einem invasiven Ansatz vorzuziehen ist, liegt der Hauptvorteil eines solchen möglichen Modells im Wegfall des operativen Eingriffs. Dieser stellt nicht nur für das Tier selbst eine erhebliche Belastung dar, sondern kann auch mit weiteren nicht zu vernachlässigenden Komplikationen (z.B. Narkose, Wundheilung) verbunden sein.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurden in der vorliegenden Untersuchung die Tiere der Versuchsgruppe dreimal gegen GnRH immunisiert. Als Präparat wurde dabei Improvac® (Pfizer, Animal Health, Australia) verwendet. Improvac® wird in Ländern wie Australien normalerweise bei männlichen Mastschweinen zur Unterdrückung der LH-Freisetzung – bewirkt durch eine Blockade der GnRH-Synthese - und damit zur Vermeidung des Geschlechtsgeruchs bei Lebensmitteln tierischen Ursprungs verwendet.

In dieser Studie wurde Improvac® erstmals bei weiblichen Schweinen mit dem Ziel einer Unterdrückung der Sexualhormonproduktion eingesetzt, was auf Grund einer verhinderten FSH-Freisetzung zu einer Unterdrückung der Follikelreifung führen würde.

Die Immunisierung mit Improvac® induziert bei den männlichen Mastschweinen eine Immunreaktion gegen das endogene Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH), das über eine Blockade der LH-Freisetzung die Hodenfunktion und die Testosteronsynthese steuert bzw. unterdrückt. Als Antigen des Impfstoffes dient ein synthetisch hergestelltes, verkürztes, unvollständiges GnRH-Analogon, das mit

einem immunogenen Trägerprotein konjugiert ist. Das Konjugat ist ferner mit einem Adjuvans versetzt, um die Immunogenität zu steigern.

Die erwünschten Folgen der Immunisierung bestehen in einer Senkung der Testosteronsynthese durch verminderte GnRH-Aktivität. Mit dem Testosteronspiegel sinkt auch die Konzentration von Androstenon und Skatol, den hauptsächlich für den Ebergeruch verantwortlichen Komponenten.

Die erste Impfung mit einer Initialdosis Improvac® hat noch keinen Einfluß auf die Hodenfunktion. Erst nach einem gewissen Zeitraum von ungefähr zwei bis drei Wochen nach der zweiten Injektion kommt es zu einer Unterdrückung der Hodenfunktion, die auf einer gesteigerten Antikörperproduktion gegen GnRH beruht und somit zu einer temporären immunologischen Kastration führt.

Da der Effekt von Improvac® erst nach der zweiten Impfung eintritt, und diese vier bis sechs Wochen vor der Schlachtung injiziert wird, können die immunisierten männlichen Schweine in der Mastperiode auf Grund ihrer erhaltenen natürlichen Stoffwechseleffizienz mit gleicher Geschwindigkeit und Wachstumsrate wie intakte (unkastrierte) Eber zunehmen. Durch den Einsatz von Improvac® bleibt das später gewonnene Fleisch frei von Ebergeruch.

Gleichzeitig zeichnen sich die Schlachtkörper, im Vergleich zu den frühzeitig chirurgisch kastrierten männlichen Schweinen, durch einen höheren Magerfleischanteil und weniger Fett aus.

In der vorliegenden Studie sollte überprüft werden, ob die Immunisierung gegen GnRH auch bei weiblichen Minipigs zu einer Unterdrückung der Ovarfunktion führt, mit der Folge eines sogenannten „high-turnover“-Knochenstoffwechsels, woraus ein Verlust an Knochenmasse resultiert. Bei Osteoporose kommt es postmenopausal - bedingt durch Östrogenmangel - zu einem erhöhten Calcium-Verlust. Hierdurch nimmt die PTH-Sekretion ab und infolgedessen auch die $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ - Produktion, was zu einer Abnahme der intestinalen Calciumabsorption und zu einem ansteigenden Knochenverlust führt. Somit führt der Mangel an Östrogenen zu einem Knochenverlust, der durch einen gesteigerten Knochen turnover eingeleitet wird. Der gestiegenen Knochenresorption wird keine adäquate Knochenformation zur Kompensation entgegengesetzt (Eriksen et al., 1990), was zu einem Überwiegen der Knochenresorption gegenüber der Knochenformation führt.

Tritt diese Veränderung des Knochenstoffwechsels und der Knochenmasse innerhalb eines abgrenzbaren Zeitraums und bei mehreren Tieren reproduzierbar ein, so kann diese Methode als Grundlage zur Weiterentwicklung für ein mögliches Osteoporose-Großtiermodell dienen.

In dieser Untersuchung wurde der GnRH-Impfstoff (Improvac®) insgesamt dreimal appliziert. Die Applikationen erfolgten in einem Abstand von sechs (zwischen erster und zweiter Injektion) bzw. acht Wochen (zwischen zweiter und dritter Gabe). Bei männlichen Tieren wird in der Regel ein Abstand von vier Wochen zwischen der ersten und zweiten Immunisierung gewählt (Dunshea et al., 2001). Bei diesem Versuch wurde das Intervall absichtlich verlängert, da Improvac® bei einem Abstand von ungefähr 5 – 7 Wochen zwischen den einzelnen Immunisierungen eine bessere Wirkungsentfaltung, besonders im Hinblick auf den Hormonhaushalt, aufweisen soll (Banholzer, persönliche Mitteilung).

Die Tiere der Kontrollgruppe wurden über den gesamten Versuch hinweg Calcium-normal versorgt, während die Calciumversorgung der Versuchsgruppe knapp unterhalb der Calciumempfehlung für Schweine lag. Diese geringe Calciumzufuhr sollte mögliche Effekte am Knochen verstärken und entspricht auch der Situation der Menopause, bei der die intestinale Calciumresorption zurückgeht (Heany et al., 1989). Mosekilde et al. (1993) konnte bei der Untersuchung von Ovariectomie-induzierten Abnahmen der Knochendichte feststellen, dass die Schweine, die zusätzlich zur Ovariectomie eine restriktive Calciumfütterung aufwiesen, deutlichere Strukturveränderungen der Knochen aufwiesen als Calcium-normalversorgte Schweine.

5.2 Gewichtsentwicklung der Minipigs

Das Gewicht der Minipigs wurde in regelmäßigen Abständen kontrolliert, um allgemeinen und immunisationsbedingten Gewichtsschwankungen rechtzeitig entgegenwirken zu können.

Im Hinblick auf den Knochenmetabolismus wie auch auf den Hormonhaushalt ist eine katabole Stoffwechsellage zu vermeiden, da sich Schwankungen des Gewichtes

nicht nur auf die Knochenparameter, sondern auch auf die Hormonproduktion auswirken können und infolgedessen die Ergebnisse verfälschen können. So kann eine reduzierte Körpermasse ein Absinken der Serumöstrogenkonzentration nach sich ziehen (Ricci et al., 2001). Doch auch Übergewicht wirkt sich auf die 17- β -Östradiolkonzentration aus (Emaus et al., 2008). Ebenso verändern sich auch Osteocalcin und Crosslaps in Abhängigkeit zum „body mass index“ (BMI) (Hotta et al., 1998).

Futter stand den Tieren nicht ad libitum zur Verfügung, sondern wurde aus den oben angeführten Gründen zwei Mal pro Tag in einer definierten Menge einzeln pro Tier angeboten. So war sichergestellt, dass es zu keiner unverhältnismäßigen Futteraufnahme und damit zu einer hohen Gewichtszunahme kommen konnte.

Das Tierkollektiv wies lediglich eine geringfügige Gewichtszunahme auf; wobei innerhalb der zwei Gruppen keine signifikanten Gewichtsunterschiede festgestellt werden konnten.

Auf Grund dessen ist davon auszugehen, dass gewichtsbedingte Einflüsse auf den Knochen- oder Hormonhaushalt und deren Parameter auszuschließen sind.

Des Weiteren lässt sich daraus schließen, dass die Immunkastration keinen Einfluss auf das Gewicht ausübt, da eine gleichmäßige Gewichtszunahme der Kontrolltiere wie auch der immunisierten Tiere zu verzeichnen war. Auch diesbezüglich war kein Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen festzustellen. Dieser Aspekt stellt einen weiteren Vorteil gegenüber der Ovariectomie dar, da es nach einer Ovariectomie häufig zu starken Fetteinlagerungen und damit zu ungewollten Effekten auf den Knochenstoffwechsel kommen kann.

5.3 Hormonhaushalt

Bei diesem Versuch wurde die Bestimmung von 17- β -Östradiol der Bestimmung von Gesamtöstrogen vorgezogen, da die physiologische Östrogenwirkung primär durch dieses Derivat vermittelt wird (Weber, persönliche Mitteilung). Des Weiteren korreliert bei Frauen ein niedriger 17- β -Östradiolserumspiegel mit einer erniedrigten Knochenmasse (Lindsay & Cosman, 1992).

Die Bestimmung der Östradiolwerte aus dem Serum erfolgte automatisiert mit Hilfe des Elecsys 1010 und des Estradiol II CalSets II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Sie erfolgte zu den Zeitpunkten Woche 0, 6, 12 und 18 des Versuchs, also jeweils zu den Immunisierungszeitpunkten sowie 6 Wochen nach der ersten und 8 Wochen nach der zweiten Immunisierung.

Die Anwendbarkeit der Bestimmungsmethode für das Minipig wurde bereits durch Babel (2007) gezeigt.

Bei Betrachtung der absoluten Werte fällt auf, dass die Gehalte in der Versuchsgruppe deutlich oberhalb der Kontrollgruppe liegen. Diese Unterschiede können jedoch zufällig durch unterschiedliche Zyklusstadien bedingt sein. Für die Interpretation wurden daher relative Veränderungen herangezogen. Die Mittelwerte der beiden Gruppen sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt:

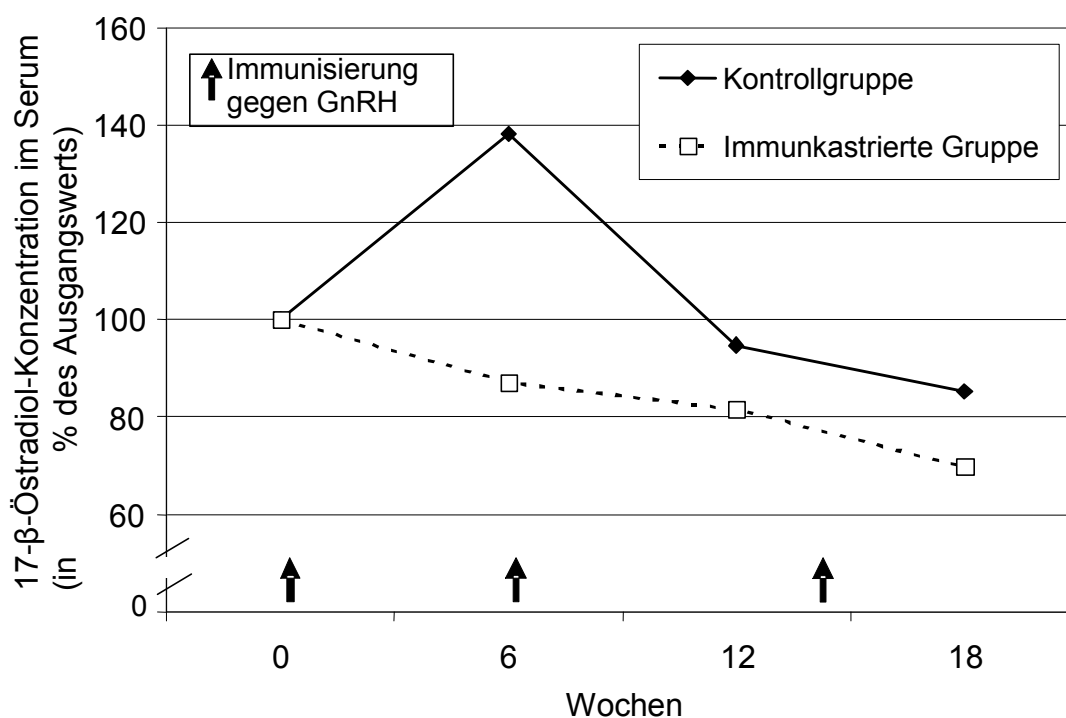


Abbildung 9: Verlauf des 17- β -Östradiols im Serum in den zwei Untersuchungsgruppen in % des Ausgangswertes

Die Östradiolkonzentrationen sanken nach der Immunisierung („Immunkastration“) kontinuierlich ab, allerdings war dieser Abfall statistisch nicht signifikant. Dies kann einerseits auf die geringe Tierzahl ($n = 6$) in der Gruppe, andererseits auf die Streuung innerhalb der Gruppe zurückzuführen sein. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der Kontrollgruppe, so fällt auf, dass es in der Kontrollgruppe

im Verlauf der Untersuchung zu einem starken Anstieg in der Woche 6 und anschliessend wieder zu einem Abfall kam. Da die Tiere der Kontrollgruppe keiner Behandlung unterzogen wurden und circadiane Einflüsse durch die Festlegung der Blutentnahmezeitpunkte auszuschließen sind, muss dieser Verlauf des 17- β -Östradiols zyklusbedingt sein. In der Tat ist dieser stark erhöhte Mittelwert auf den Messwert eines einzigen Tieres zurückzuführen. Bei den drei restlichen Tieren der Kontrollgruppe war kein vergleichbarer Anstieg zu sehen. Das Tier Nr. 1 muß sich daher höchstwahrscheinlich zum Messzeitpunkt kurz vorm Östrus befunden haben.

Das Vorliegen von zyklischen Schwankungen des Östrogens wurde auch von Chiu et al. (1999) belegt. In der behandelten Versuchsgruppe war zu keinem Zeitpunkt ein solcher Anstieg zu beobachten. Eine Unterdrückung der Ovarfunktion zum Zeitpunkt der ersten Wiederholungsimmunisierung war noch nicht zu erwarten.

Der langsame und kontinuierliche Abfall der Östrogenkonzentration könnte darauf hindeuten, dass die wiederholte Immunisierung gegen GnRH im Rahmen des geprüften Tiermodells erfolgreich war. Eine endgültige Aussage ist jedoch erst möglich, wenn in weiteren Untersuchungen eine Unterdrückung des Sexualzyklus gezeigt werden kann. Da es über den Versuchszeitraum zu keinem Anstieg der Östrogene kam, kann man davon ausgehen, dass die gewählten Abstände für die Behandlung nicht zu groß gewählt waren.

Bei ovariectomierten Tieren wurde ein Abfall der 17- β -Östradiolkonzentration um 40 % gezeigt. So sanken die Werte von 17- β -Östradiol bei ovariohysterektomierten Minipigs innerhalb von zwei Wochen nach der Operation um 38,5 % bzw. 6 Wochen postoperativ um 40 % (Babel, 2007). In dem hier untersuchten Tiermodell kam es innerhalb von 6 Wochen nach der zweiten Immunisierung zu einem Abfall der Östradiolkonzentration von 18 % und 12 Wochen nach der zweiten Behandlung von 30,3 % (siehe Abb. 10).

Dies spricht dafür, dass die Immunisierung im Vergleich zur Ovariohysterektomie zu einer verzögerten und unvollständigen Unterdrückung der Östrogensynthese führt.

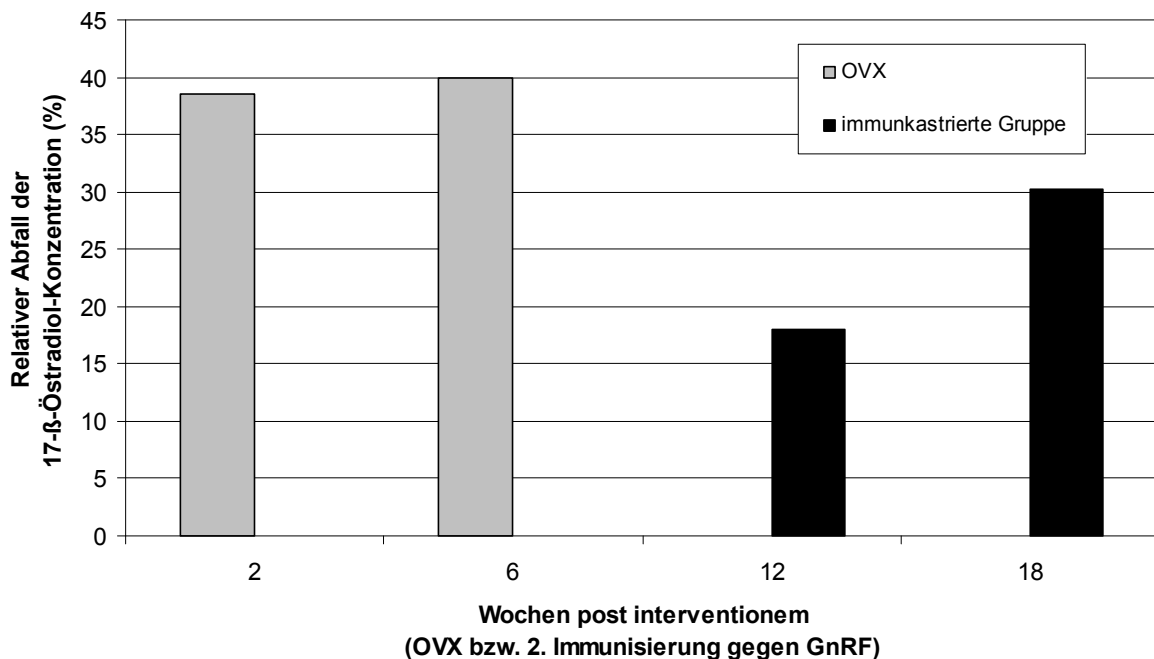


Abbildung 10: Relativer Abfall der 17-β-Östradiolkonzentrationen im Serum bei Minipigs nach Ovariectomie (OVX) (Babel, 2007) und nach Immunisierung.

Diese Ergebnisse können somit als Hinweis gewertet werden, dass es durch die sogenannte „Immunkastration“ bei weiblichen Tieren zu einer teilweisen Unterdrückung der Sexualhormonproduktion (17-β-Östradiol) kommt. Die beobachteten Effekte sind dabei unterhalb der Effekte einer Ovariectomie angesiedelt, die ohne längere Verzögerung bereits nach 2 Wochen auftreten. Daher kann an dieser Stelle spekuliert werden, dass es eventuell innerhalb eines längeren Versuchszeitraums zu stärkeren Effekten auf die 17-β-Östradiol-Konzentration kommen würde.

Zusammenfassend kann jedoch festgehalten werden, dass erstmals gezeigt werden konnte, dass die Östrogensynthese beim weiblichen Minipig durch die Immunisierung gegen GnRH supprimiert werden kann. Ob dadurch auch andere Sexualhormone in ihrer Bildung beeinflusst werden, kann nicht beurteilt werden.

Diese These wird auch durch eine weiterführende Untersuchung unserer Arbeitsgruppe gestützt, in der die Ovarien- und Uterusgewichte von Minipigs in einer Untersuchung mit vergleichbarem Versuchsdesign 30 Wochen nach einer ersten GnRH-Immunisierung (bzw. 24 Wochen nach der zweiten Immunisierung, bzw. 16 Wochen nach der dritten Immunisierung) bestimmt wurden. Hierbei zeigte sich, dass

sowohl die Gewichte der Ovarien als auch der Uteri in der behandelten Gruppe signifikant unterhalb der Gewichte der nicht behandelten Kontrollgruppe lagen (Vogelmann, Dissertation in Vorbereitung).

5.4 Knochenstoffwechsel

5.4.1 Knochenmarkerbestimmung

Mit Hilfe der Knochenmarker können die dynamischen Prozesse des Knochenstoffwechsels beurteilt werden. Idealerweise sollte dafür ein Resorptions- wie auch ein Formationsmarker herangezogen werden.

In dieser Studie wurden die Konzentrationen an Osteocalcin im Serum als Parameter der Knochenformation und an Crosslaps im Serum als Parameter der Knochenresorption ausgewählt. Es handelt sich bei beiden Parametern um hochspezifische Marker des Knochenstoffwechsels (Lian & Friedman, 1978).

Zur Messung der Knochenmarker werden auf Grund ihrer leichten Handhabung und der schnellen Ergebnisse meistens ELISAs benutzt. Der Großteil der auf dem Markt befindlichen Knochenmarker-Assays ist jedoch für die Humanmedizin bestimmt. Nur wenige dieser Assays sind für die Anwendung bei anderen Spezies validiert. Wenn zwischen dem Parameter des humanspezifischen Assays und dem Parameter der zu untersuchenden Tierart eine Kreuzreaktivität besteht, ist der humanspezifische Assay für die jeweilige Tierart verwendbar.

Die Bestimmung des Osteocalcingehaltes aus dem Serum der Minipigs wurde mit dem ELISA „Metra Osteocalcin Immunoassay“ der Firma Quidel Corporation, San Diego, USA, durchgeführt. Die Bestimmung der Crosslaps-Konzentration erfolgte mit dem ELISA „Crosslaps“ der Firma Nordic Bioscience Diagnostics, Herlev, Dänemark. Für beide Assays konnte eine Kreuzreaktivität zum Schwein nachgewiesen werden (Allen, 2003).

Die Anwendbarkeit für Schweine wurde für beide Parameter bereits durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt (Babel, 2007).

Direkt nach der Serumgewinnung wurde das Serum tiefgefroren und bis zur Bestimmung bei -80 °C gelagert, um eine Degradation des Osteocalcins zu vermeiden, da bereits während der Lagerung bei Raumtemperatur 50 % bis 70 % der Immunoreaktivität verloren gehen (Blumsohn et al., 1995).

Somit kann davon ausgegangen werden, dass die ausgewählten Parameter für die Beurteilung des Knochenstoffwechsels beim Schwein geeignet und aussagekräftig sind.

5.4.2 Verlauf der Knochenmarker

Parameter des Knochenstoffwechsels unterliegen sowohl circadianen als auch zyklusbedingten Schwankungen. Diese Tatsache kann leicht am Beispiel des Osteocalcins gezeigt werden.

So konnten Tsutsumi et al. (2004) zeigen, dass Osteocalcin auch bei Minipigs tageszeitlichen Schwankungen unterliegt. Osteocalcin unterliegt aber nicht nur circadianen Rhythmen, sondern wird auch durch den Sexualzyklus beeinflusst. Hotchkiss und Brommage (2000) untersuchten den Menstrualzyklus bei Primaten am Beispiel der Javaneraffen (Cynomolgen) hinsichtlich eventueller Veränderungen im Knochenstoffwechsel und konnten signifikante Schwankungen von Osteocalcin während des Sexualzyklus nachweisen. Die höchsten Osteocalcinwerte wurden während der Lutealphase erreicht und spiegeln dort die gesteigerte Osteoblastenaktivität wider (Nielsen et al., 1990).

Um circadiane Schwankungen innerhalb der Messwerte bei den verwendeten Parametern auszuschließen, erfolgte die Serumgewinnung über den gesamten Versuchszeitraum immer zur gleichen Uhrzeit.

Da es aus versuchstechnischen Gründen nicht möglich war, die Tiere vor Studienbeginn zu synchronisieren, muss bei der Interpretation der Ergebnisse der beiden Parameter des Knochenstoffwechsels ein eventueller Einfluss des Sexualzyklus berücksichtigt werden.

Betrachtet man Osteoporosemodelle, bei denen die Tiere einer Ovariectomie unterzogen wurden, so kommt es sowohl bei den sogenannten „small animal models“ als auch bei den sogenannten „large animal models“ innerhalb weniger Wochen infolge fehlender Ovarfunktion zu einem „high-turnover“-Knochenstoffwechsel. Während dieses stark erhöhten Knochenturnovers können sowohl stark erhöhte Konzentrationen für Parameter sowohl der Knochenformation als auch der Knochenresorption gemessen werden. So kommt es bei ovariectomierten Ratten

bereits nach 4 Wochen zu einem signifikant erhöhten Knochenstoffwechsel (Birner, 1995) und bei ovariectomierten Minipigs unter restriktiver Calciumgabe nach 3 Monaten zu einem Anstieg der Knochenresorption (Scholz-Ahrens et al., 1996).

Bezieht man diese Ergebnisse von ovariectomierten Tieren in die Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Studie ein, so müsste man erwarten, dass es bei erfolgreicher Unterdrückung der Sexualhormonproduktion und erwartetem Effekt auf den Knochenstoffwechsel innerhalb des Untersuchungszeitraums zu einem deutlichen Anstieg der Knochenresorption (Anstieg der Crosslaps-Konzentration) und infolgedessen zu einem deutlichen Anstieg der Knochenformation (Anstieg der Osteocalcin-Konzentration) kommen sollte. Die Calcium-restriktive Fütterung sollte einen solchen Effekt zusätzlich verstärken. Da die für den Umbau des Skeletts zur Verfügung stehende Menge an Calcium in erster Linie aus der oralen Zufuhr und damit der intestinalen Calciumresorption resultiert, kann eine unzureichende Calciumzufuhr negative Effekte am Knochen unterstützen (Sebastian et al., 1994).

Bei Betrachtung der Ergebnisse für Crosslaps und Osteocalcin kann festgestellt werden, dass die Konzentrationen beider Parameter sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der immunkastrierten Gruppe einen vergleichbaren Verlauf zeigen (siehe Abb. 11 und 12).

Der Verlauf beider Marker ist in der Kontrollgruppe - wie bereits dargestellt - wahrscheinlich zyklusabhängig. Da der Verlauf in der immunkastrierten Gruppe fast identisch ist, muss auch in dieser Gruppe davon ausgegangen werden, dass es während des Untersuchungszeitraums von 18 Wochen noch zu keiner ausreichenden Unterdrückung der Sexualhormone gekommen ist. So nimmt die Konzentration an 17- β -Östradiol über den Untersuchungszeitraum nur langsam ab. Somit muss festgehalten werden, dass die durch die Immunkastration erzielten Effekte im Hormonhaushalt noch keine ausreichenden Wirkungen erzielen können, die mit einem „high-turnover“-Knochenstoffwechsel nach Ovariectomie vergleichbar sind.

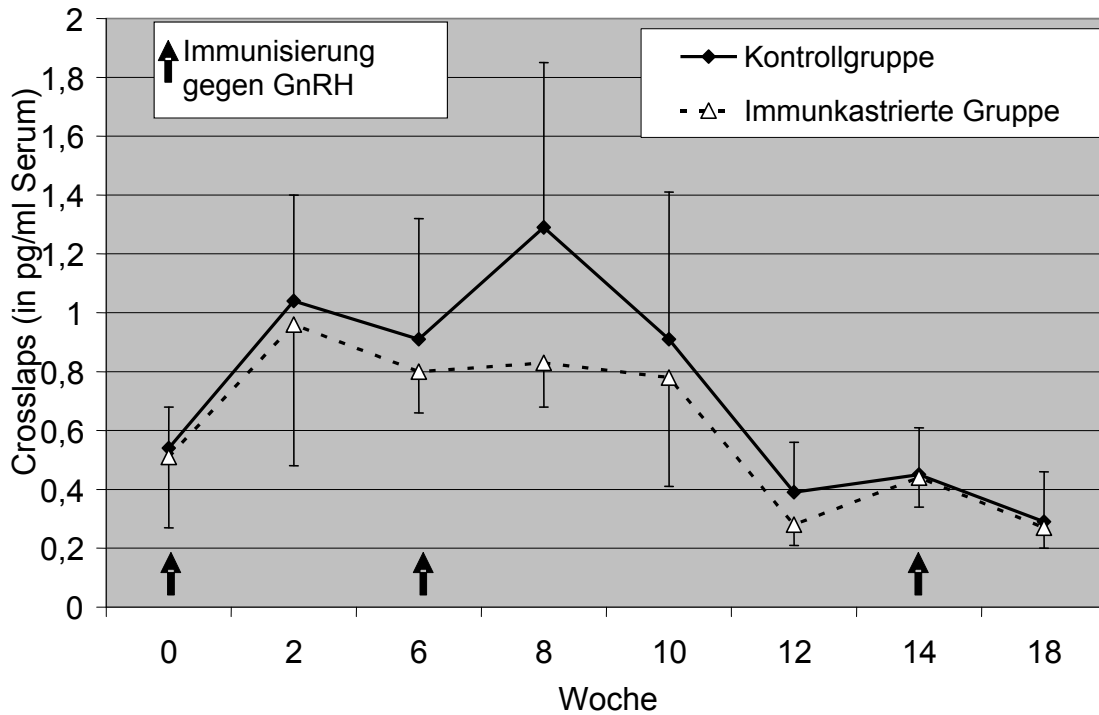


Abbildung 11: Verlauf der mittleren Crosslaps-Konzentration im Serum (MW \pm SD) in ng/ml Serum in beiden Untersuchungsgruppen über den gesamten Versuchszeitraum von 18 Wochen

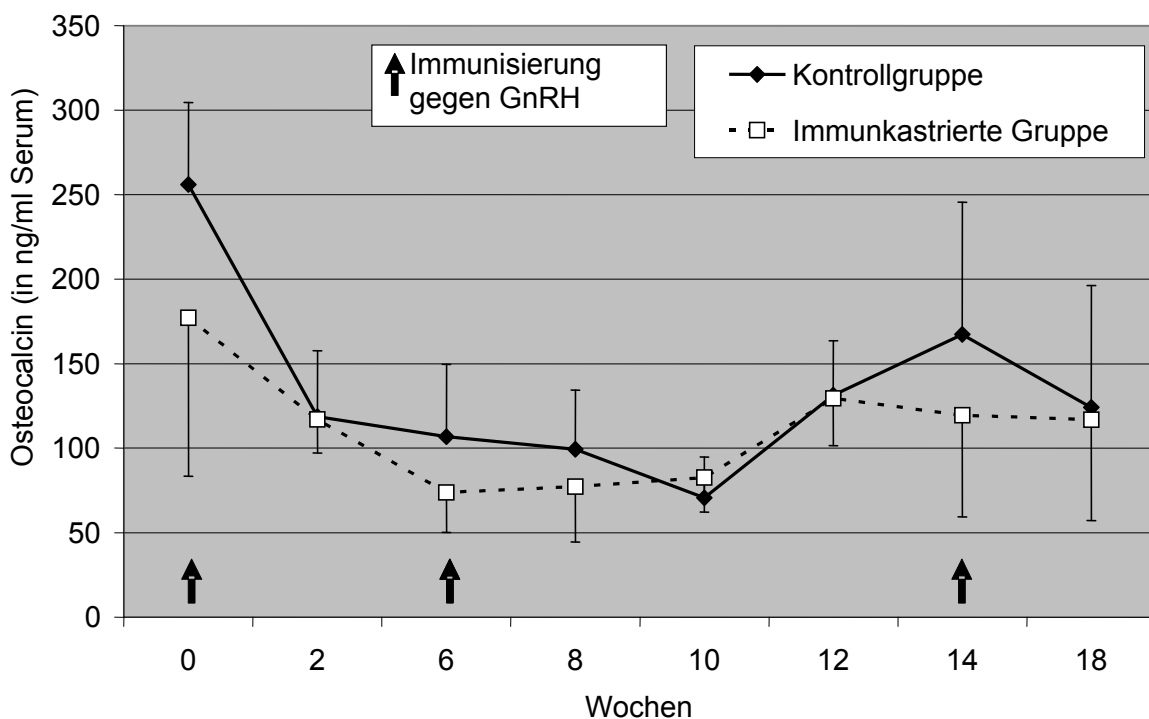


Abbildung 12: Verlauf der mittleren Osteocalcin-Konzentration im Serum (MW \pm SD)

in ng/ml Serum in beiden Untersuchungsgruppen über den gesamten Versuchszeitraum von 18 Wochen.

Allerdings ist hinsichtlich der Knochenresorption zu beobachten, dass es bei höherer Östradiolkonzentration bei einem Tier in der Kontrollgruppe zu einem Peak der Crosslapsekonzentration kam (Woche 8). In der immunkastrierten Gruppe lag zu diesem Zeitpunkt die Östradiolkonzentration zwar noch innerhalb der erwarteten Schwankungsbreite, jedoch weit unterhalb des Gehalts in der Kontrollgruppe, und auch die Crosslapsekonzentration im Serum lag in der immunkastrierten Gruppe deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe. Somit kann spekuliert werden, dass zumindest ein gewisser Zusammenhang zwischen Östradiolkonzentration und Knochenresorption besteht, der allerdings zu keinem Zeitpunkt zu einem „high-turnover“-Knochenstoffwechsel führt.

Die teilweise sehr hohe interindividuelle Streuung bei beiden untersuchten Parametern zu den einzelnen Messzeitpunkten dürfte darauf zurückzuführen sein, dass der Zyklusverlauf der Tiere nicht synchronisiert war, und somit sicherlich Verschiebungen des Zyklusverlaufs zwischen den einzelnen Tieren bestanden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es innerhalb des gewählten Untersuchungszeitraums weder durch die calciumrestriktive Fütterung noch durch die GnRH-Immunsierung zu Effekten im Knochenstoffwechsel kam, die mit den Effekten eines Ovariectomie-Modells zu vergleichen wären. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch die GnRH-Immunsierung keine Effekte am Knochen zu erzielen sind. Aufgrund der dargestellten Ergebnisse ist es jedoch als wahrscheinlicher anzusehen, dass es durch die GnRH-Applikation zwar zu einer Unterdrückung der Östradiolsynthese kommt, diese innerhalb des gewählten Untersuchungszeitraums jedoch nicht das Ausmaß zeigt, um Veränderungen am Knochenstoffwechsel auszulösen.

Somit kann spekuliert werden, dass die Immunsierung gegen GnRH (Immunkastration) durchaus eine Möglichkeit darstellt, bei weiblichen Minipigs die Östrogenproduktion zu unterdrücken, jedoch müsste für mögliche Effekte im Knochenstoffwechsel und damit eventuell auch am Knochen ein längerer Untersuchungszeitraum gewählt werden.

6. Zusammenfassung

Tiermodelle sind trotz der ständigen Weiterentwicklung von in vitro Untersuchungsverfahren in der medizinischen Forschung gegenwärtig noch immer unerlässlich. So ist z.B. in der Osteoporoseforschung die Prüfung von neuen Therapeutika an einem sogenannte Kleintier- sowie Großtiermodell durch die FDA (Food and Drug Administration) vorgeschrieben. Die Tiermodelle beruhen dabei auf dem operativen Eingriff einer Ovariectomie bzw. Ovariohysterektomie. Durch den dadurch erzeugten Mangel an Sexualhormonen kommt es zur Beeinträchtigung des Knochenstoffwechsels, die zu osteoporotischen Veränderungen am Knochen führt. Nicht nur aus ethischen Gesichtspunkten sollte aber versucht werden, den Einsatz solcher invasiver Eingriffe zu minimieren.

Ziel dieser Arbeit war es daher erstmals, die Machbarkeit eines nichtinvasiven Großtier-Osteoporosemodells am Beispiel des weiblichen Minipigs für den Knochenstoffwechsel zu prüfen.

Die Untersuchung wurde über einen Zeitraum von 18 Wochen an zehn weiblichen Dresdner Minipigs durchgeführt, wobei vier Tiere als intakte Kontrollgruppe dienten und sechs Tiere die Versuchsgruppe darstellten. Die Tiere der Versuchsgruppe wurden dreimal (in Woche 0, 6 und 14) mit einem Impfstoff gegen GnRH (Improvac®) immunisiert. Durch diese Behandlung sollte eine immunologische Suppression von FSH und somit auch der ovarielle Östrogensynthese hervorgerufen werden („Immunkastration“). Dadurch sollten vergleichbare Veränderungen im Knochenstoffwechsel ausgelöst werden, wie sie bei einem invasiven Eingriff der Ovariectomie bzw. Ovariohysterektomie erfolgen. Um mögliche Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel zu verstärken, erhielten die Tiere der Versuchsgruppe im Gegensatz zu den Tieren der Kontrollgruppe eine Calcium-restriktive Fütterung.

Anhand von Serumparametern wurde dabei sowohl der Einfluss auf den Hormonhaushalt als auch auf den Knochenstoffwechsel überprüft. Als Parameter wurden 17- β -Östradiol sowie Crosslaps (Marker der Knochenresorption) und Osteocalcin (Marker der Knochenformation) in regelmäßigen Abständen bestimmt.

Während des Untersuchungszeitraums fiel die Östrogenkonzentration in der Versuchsgruppe kontinuierlich um 30% ab, während sie in der Kontrollgruppe den natürlichen zyklusbedingten Schwankungen unterlegen war. Dies lässt auf eine Unterdrückung der Östrogensynthese durch die GnRH-Immunsierung schließen.

Sowohl der Verlauf der Crosslaps- als auch der Osteocalcin-Konzentration ergab keinen Unterschied zwischen dem Knochenstoffwechsel der Tiere in der Versuchs- bzw. Kontrollgruppe. Somit konnten im Untersuchungszeitraum weder durch die Immunkastration noch durch die Calcium-restriktive Fütterung mögliche Effekte auf den Knochenstoffwechsel erzielt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Immunisierung gegen GnRH durchaus eine Möglichkeit darstellt, bei weiblichen Minipigs die Ovarfunktion auf einem nichtinvasiven Weg zu unterdrücken. Für die Überprüfung möglicher Effekte auf den Knochenstoffwechsel müsste ein längerer Untersuchungszeitraum gewählt werden.

7. Summary

Anne Fröhlke

„Investigations on the bone metabolism in immunocastrated minipigs - A pilot study for the evaluation of a non-invasive osteoporosis model“

Regardless the continuous ongoing development of in-vitro test models, animal models are still indispensable in medicinal research. Within the frame of the osteoporosis research the FDA (Food and Drug Administration) prescribes that new therapeutic drugs need to be tested in a so-called small animal model and additionally in a large animal model. The respective animal models are based on surgical intervention, i.e. ovariectomy or ovariectomy, respectively. The resulting lack of sexual hormones leads to a lapse of bone metabolism which produces osteoporotic changes at the bone. However, not only under ethical aspects all attempts should be made to minimise the use of such invasive interventions.

It was therefore the aim of the present thesis to investigate for the first time the feasibility of the use of a non-invasive large animal osteoporosis model for the bone metabolism based on female minipigs. The investigation was carried out over a period of 18 weeks enrolling 10 female Dresden Minipigs, whereas 4 animals served as intact control group and 6 animals as test group. The animals of the test group received at 3 time points (week 0, 6 and 14) a subcutaneous injection of a Gonadotropine Releasing Factor (GnRF-Analagon) conjugated with a carrier protein. This treatment aimed to produce an immunological suppression of the production of sexual hormones (immunocastration), which can produce changes in bone metabolism comparable to the results of the invasive intervention of ovariectomy or ovariectomy, respectively. To reinforce potential effects, the animals of the test group received – in comparison to the animals of the control group – a calcium restrictive nutrition.

Based on serum parameters the influence on both the hormonal balance and the bone metabolism has been investigated. The parameters 17β -estradiol as well as crosslaps (marker for bone resorption) and osteocalcine (marker for bone formation) were determined in regular intervals. During the investigational period 17β -estradiol continuously decreased in the test group by 30 %, whereas this parameter was only subject to physiological cycle-related changes in the animals of the control group. It

could therefore be shown, that the immunocastration has an impact on the balance of sexual hormones of the animals, which was however - due the only small number of animals - not statistically significant. The course of concentrations of both crosslaps and osteocalcine did not reveal differences between the bone metabolism of the animals in the test group and those of the control group, respectively. Consequently effects on the bone metabolism could - under the chosen conditions - neither be produced by the immuno-castration nor by the calcium restrictive nutrition.

In conclusion it can be stated, that the administration of GnRF analogues (immuno-castration) can be considered a principal option to suppress the production of sexual hormones in female minipigs by non-invasive methods, however a longer investigational period should be chosen to investigate potential effects on bone metabolism and consequently also on the bone.

8. Literaturverzeichnis

Abbiati G., Arrigoni M., Frignani S., Longoni A., Bartucci F., Castiglioni C (1994)
Effect of salmon calcitonin on deoxypyridinoline (Dypr) urinary excretion in healthy
volunteers
Calcif Tissue Int 55: 346-8

Adachi M., Takayanagi R. (2006)
Age-dependent decrease in plasma androgens, and role of androgens in bone
mineral density and bone metabolism
Clin Calcicum; 16(3): 429-35

Allen MJ., (2003)
Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations
Vet Clin Pathol 2003; 32 (3): 101-13

Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft
Handlungsleitlinie Osteoporose aus Empfehlungen zur Prävention und Therapie der
Osteoporose
Arzneiverordnung in der Praxis 2003, 1:1-4

Babel B., (2007)
Investigation on bone metabolism in intact and ovariectomized miniature pigs
Vet Med Diss, München

Banovac K., Koren E. (2000)
Triiodothyronine stimulates the release of membrane-bound alkaline phosphatase in
osteoblastic cells
Calcif Tissue Int.; 67(6): 460-5

Baker AR., Hollingshead PG., Pitts-Meek S., Hansen S., Taylor R., Stewart TA
(1992)
Osteoblast-specific expression of growth hormone stimulates bone growth in
transgenic mice
Mol Cell Biol.; 12(12): 5541-7

Banholzer E. (2007)

Persönliche Mitteilung

Fachtierärztin für Schweine, tätig bei Pfizer

Behnke B., Altrogge H., Delling G, Kruse H.P., Muller W.-D.E. (1996)

Bone mineral density in pediatric patients after renal transplantation

Clin Nephrol 46:24-9

Birner H. (1995)

Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels bei der Ratte und beim Menschen,

Vitamine als Prophylaxe im Osteoporose-Modell Ratte

Vet Med Diss, München

Blumsohn A., Hannon RA., Eastell R., (1995)

Apparent instability of osteocalcin in serum as measured with different commercially available immunoassays

Clin Chem 41 (2): 318-9

Booth SL., Broe KE., Gagnon DR., Tucker KL., Hannan MT., McLean RR., Dawson-Hughes B., Wilson PW., Cupples LA., Kiel DP. (2003)

Vitamin K intake and bone mineral density in woman and men

Am J Clin Nutr; 77(2): 512-6

Borst SE., Conover CF (2006)

Orchiectomized Fischer 344 male rat models body composition in hypogonadal state

Life Sci (4): 411-5

Boyce R.W., Franks A.F., Jankowsky M.L., Orcutt C.M., Piacquadio A.M., White J.M., Bevan J. A. (1990)

Sequential histomorphometric changes in cancellous bone from ovariectomized dogs

J Bone Min Res 5:947-53

Bustad L.K., McClellan R.O. (1966)

Swine in biomedical research

Proc Int Symp, Richland, Frayn Printing Corp, Seattle, USA

Camozzi V., Tossi A., Simoni., Pagani F., Francucci CM., Moro L. (2007)

Role of biochemical markers of bone remodeling in clinical practice

J Endocrinol Invest; 30 (6 Suppl): 13-7

Chenu C., Valentin-Opran A., Chavassieux P., Saez S., Meunier P.J., Delmas PD (1990)

Insuline like growth factor 1 hormonal regulation by growth hormone and by 1,25(OH)₂ D₃ and activity on human osteoblast-like cells in short-term cultures

Bone 11 (2): 81-6

Chiu KM, Ju J., Mayes D., Bacchetti P., Weitz S., Arnaud CD (1999)

Changes in bone resorption during the menstrual cycle

J Bone Miner Res; 14 (4): 609-15

Christiansen C. (1994)

Postmenopausal bone loss and the risk of osteoporosis

Osteoporos Int; 4 Suppl 1:47-51

Colvard D, Eriksen P, Keeting E, Wilson D, Lubhan F, French F, Riggs B, Spelsberg T (1989)

Identification of androgen receptor in androgen in normal human osteoblast like cells

Proc Nat Acad Sci (Wash); 86: 854-7

Crane J. (2006)

Improvac® - Ein neuer Weg zur Kontrolle des Ebergeruchs beim männlichen Schwein

Pfizer Symposium, IPVS Congress 2006

Unter: http://www.svsm.ch/Texte%20%C3%B6ffentlich/IPVS_06.pdf, abgerufen am 29. 01. 08

Delmas PD (1993)

Biochemical markers of bone turnover for the clinical investigation of osteoporosis.

Osteoporos Int 3: 81-6

Delmas P.D. (1997)

Hormone replacement therapy in the prevention and treatment of osteoporosis

Osteoporos Int 7: 3-7

DeLuca H.F. (1990)

Osteoporosis and the metabolites of vitamin D

Metabolism 39 (suppl 1): 3-9

Dimai H-P. (2004)

Etablierte Therapieoptionen bei postmenopausaler Osteoporose

Journal für Mineralstoffwechsel; 11 (2): 11-6

Disilvio L., Jameson J., Gamie Z., Giannoudis PV., Tsiridis E. (2006)

In vitro evaluation of the direct effect of estradiol on human osteoblasts (HOB) and human mesenchymal stem cells (h-MSCs)

Injury; 37 (3S):33-42

Dominique M. (2004)

Characterization of estrogen receptor alpha in mouse osteoblasts

Universitätsbibliothek Heidelberg

www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/5157, abgerufen am: 15.12.2006

Dresner-Pollak R, Parker RA, Poku M, Thompson J, Seibel MJ and Greenspan SL (1996)

Biochemical markers of bone turnover reflect femoral bone loss in elderly women.

Calcif Tissue Int 59: 328-33

Dunshea FR., Colantoni C., Howard K., McCauley I., Jackson P., Long KA., Lopaticki S., Nugent EA., Simons JA., Walker J., Hennessy DP. (2001)

Vaccination of boars with GnRF vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance

Journal of Animal Science, (10): 2524 - 35

DVO-Leitlinie

Osteoporose bei postmenopausalen Frauen

Im Internet gefunden unter: [//www.lutherhaus.de/osteo/leitlinien-dvo/leitlinie_meno.php](http://www.lutherhaus.de/osteo/leitlinien-dvo/leitlinie_meno.php), abgerufen am 28.08.07

Emaus A, Espetvedt S, Veierod MB, Ballard – Barbash R, Furberg AS, Ellison PT, Jasienska G, Hjartaker A, Thune I (2008)

17-(beta)-Estradiol in relation to age at menarche and adult obesity in premenopausal women

Hum Reprod. Epub ahead of print

Erben R.G. (2001)

Skeletal effects of androgen withdrawal

J Musculoskelet Neuronal Interact. 1(3): 225-33

Eriksen E.F., Hodgson S.F., Eastell R., Cedel S.L., O'Fallon W.M., Riggs B.L. (1990)

Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: Quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels

J Bone Miner Res 5: 311-19

Evdokimov AE., Karas' SI. (2001)

Dyshormonal train bone disease in young people

Voen Med Zh; 322(4): 27-31

Eyre D.R., Koob T.J., Van N.-K.P. (1984)

Quantitation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high-performance liquid chromatography

Anal Biochem 137: 380-8

FDA (Food and Drug Administration) (1994)

Guidelines for the preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis

Division of Metabolic and Endocrine Drug Products

Maryland: 1-24

Feldmann E.C., Nelson R.W. (1996)

Hypercalcemia and primary hyperparathyroidism

Canine and Feline Endocrinology and Reproduction, 455-96

Fournier B., Gineyts E., Delmas P.D. (1989)

Evidence that free gamma carboxyglutamic acid circulates in serum

Clin Chim Acta 182: 173-82

Fukuyama S, Tashjian A, (1989)

Direct modulation by androgens of the response of human bone cells (SaOS-2) to human parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein

Endocrinology; 125: 1789-94

Gasser RW. (2001)

Anwendung und klinische Relevanz der Bestimmung von Knochenumbau markern bei Osteoporose: ein Überblick

Journal für Mineralstoffwechsel; 8 (3), 15-9

Gouveia CH, Schultz JJ, Bianco AC, Brent GA. (2001)

Thyroid hormone stimulation of osteocalcin gene expression in ROS 17/2.8 cells is mediated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms.

J Endocrinol; 170(3): 667-75.

Greendale G.A, Edelstein S., Barrett-Connor E. (1997)

Endogenous sex steroids and bone mineral density in older women and men: The Rancho Bernardo study

J Bone Miner Res 12: 1833-43

Grisar J., Pietschmann P. (2000)

Sekundäre Osteoporose

Journal für Mineralstoffwechsel; 7 (2): 16-9

Guicheux J., Heymann D., Rousselle AV., Gouin F., Pilet P., Yamada S., Daculsi G. (1998)

Growth hormone stimulatory effects on osteoclastic resorption are partly mediated by insulin-like growth factor 1: an in vitro study

Bone ; 22(1): 25-31

Hadji P. (2003)

HRT in der Prävention der postmenopausalen Osteoporose: Bestätigung der Wirksamkeit durch die „Women´s Health Initiative“ (WHI)

Journal für Menopause; 10 (2): 26-9

Herrmann M., Herrmann W., (2004)

The assessment of bone metabolism in female elite endurance athletes by biochemical bone markers

Clin Chem Lab Med; 42 (12) : 1384-9

Heaney RP, Recker RR, Stegman MR and Moy AJ (1989)

Calcium absorption in women: relationships to calcium intake, estrogen status, and age. J Bone Miner Res 4: 469-75

Hilbe M., Jaros P., Ehrensperger F., Zlinszky K., Janett F., Hässig M., Thun R.,(2006)

Histomorphological and immunohistochemical findings in testes, bulbourethral glands and brain of immunologically castrated male piglets

Schweiz Arch Tierheilkunde; 148 (11): 559-608

Hock J.M., Gera I. (1992)

Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption of the anabolic response of bone to parathyroid hormone

J Bone Miner Res 7: 65-72

Hodgen G.D., Goodman A.L., O'Connor A., Johnson D.K. (1977)
Menopause in rhesus monkeys: Model for study of disorders in the human climacteric
Am J Obstet Gynecol 127: 581-4

Hofbauer L.C. (1999)
Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology
and bone metabolism
Eur. J. Endocrinol. 141: 195-210

Hofbauer L.C., Khosla S., (1999)
Androgen effects on bone metabolism: recent progress and controversies
Eur J Endocrinol.; 140(4): 271-86

Holzer G., Bröll H., Resch H., Pietschmann P., Sieghart S., Dobnig H., Erlacher L.,
Finkenstedt G., Pecherstorfer M., Pirich C., (2007)
Konensus – Statment: Therapie der postmenopausalen Osteoporose –
Anwendungsbereiche von parenteralen Bisphosphonaten
Journal für Mineralstoffwechsel; 14 (1): 45-50

Hotchkiss CE, Brommage R., (2000)
Changes in bone turnover during the menstrual cycle in cynomolgus monkeys
Calcif Tissue Int.; 66 (3): 224-8

Hotta M., Shibasaki T., Sato K., Demura H., (1998)
The importance of body weight history in the occurrence and recovery of
osteoporosis in patients with anorexia nervosa: evaluation by dual X-ray
absorptiometry and bone metabolic markers
Eur J Endocrinol.; 139(3): 276-83

Hughes D.E., Dai A., Tiffe J. C., Li H.H., Mundy G.R., Boyce B.F. (1996)
Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β
Nat Med 2: 1132-6

- Imboden I., Janett F., Burger D., Crowe MA., Hässig M., Thun R. (2006)
Influence of immunization against GnRF on reproductive cyclicity and estrous behavior in the mare
Theriogenology; 66 (8): 1866-75
- Jap D., Beckmann MW., Fasching P., Niederacher D., Oppelt PG., (2001)
Genetik der Osteoporose
Journal für Menopause; 8 (3): 19-25
- Jeroen A., van Audekercke R., Talalaj M., Geusens P., Bramm E., Dequeker J. (1996)
Effects of 1 α -vitamin D3 and estrogen therapy on cortical bone mechanical properties in the ovariectomized rat model
Endocrinology 137: 1358-64
- Jerome C.P., Carlson C.S., Register T.C., Bain F.T., Jayo M.J., Weaver D.S., Adams M.R. (1993)
Bone functional changes in intact, ovariectomized, and ovariectomized hormone-supplemented adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) evaluated by serum markers and dynamic histomorphometry
J Bone Min Res 9: 527-40
- Jilka RL., Hangoc G., Girasole G., Passeri G., Williams DC., Abrams JS., Boyce B., Broxmeyer H., Manolagas SC., (1992)
Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6
Science, Vol 257, Issue 5066 : 88-91
- Jockenhöveln F., (2001)
Hormonale Therapiemöglichkeiten beim Mann in der „Andropause“
Journal für Menopause; 8 (2): 39-42
- Jockenhövel F., (2005)
Neuentwicklung in der Testosterontherapie – Nebido®
Journal für Urologie und Urogynäkologie; 12 (1) : 22-4

Jockenhövel F., Schubert M., (2003)

Hormonersatztherapie beim Mann – Sinn oder Unsinn ?

Blickpunkt der Mann; 1 (1): 14-9

Johnston CC Jr., Slemenda CW (1995)

Pathogenesis of osteoporosis

Bone; 17 (2 Suppl): 19-22

Kratzik C., Dlouhy EM., Lunglmayr G., Schatzl G (2005)

Der hypogonadale ältere Mann in der urologischen Praxis

Blickpunkt der Mann; 3 (2): 10-5

Kudlacek S., Freudenthaler O., Resch H., Willvonseder R., (2000)

Die Osteoporose beim Mann

Journal für Mineralstoffwechsel; 7 (3): 21-5

Kudlacek S., Willvonseder R., (2003)

Diagnose der Osteoporose beim Mann

Blickpunkt der Mann; 1 (2): 17-9

Kundi M., Freidrich F., Friedrich FL., (2004)

Hormonersatztherapie und Mammakarzinomrisiko – zur Interpretation
epidemiologischer Evidenz

Journal für Menopause; 11 (1): 8-18

Legrand E., Audran M., Guggenbuhl P., Levasseur R., Chales G., Basle MF.,
Chappard D (2007)

Trabecular bone microarchitecture is related to the number of risk factors and
etiology in osteoporotic men

Microsc Res Tech

Lian J.B., Friedman P.A. (1978)

The vitamin K-dependent synthesis of gamma-carboxyglutamic acid by microsomes

J Biol Chem 253: 6623-26

Lindberg MK., Vandenput L., Moverare Skrtic S., Vanderschueren D., Boonen S., Bouillon R., Ohlsson C. (2005)
Androgens and the skeleton
Minerva Endocrinol.; 30(1): 15-25

Lindsay R and Cosman F (1992)
Primary Osteoporosis.
In: Disorders of bone and mineral metabolism (ed: Coe FL, Favus MJ), Raven Press, New York: 831-88

Lips P., (2006)
Vitamin D physiology
Prog Biophys Mol Biol 92(1): 4-8

Longo M., Peruzzi B., Fortunati D., De Luca V., Denger S., Caselli G., Migliaccio S., Teti A. (2006)
Modulation of human estrogen receptor (alpha) F promoter by a protein kinase C/c-Src-dependent mechanism in osteoblast-like cells
J Mol Endocrinol; 37(3): 489-502

Lunglmayr G., (2005)
Der sekundäre Hypogonadismus des älteren Mannes
Journal für Urologie und Urogynäkologie; 12 (Sonderheft 1): 8-14

Luzuy F. (2005)
Hormonersatztherapie und Brustkrebsrisiko : aktuelle Situation
Journal für Menopause; 12 (1): 22-4

Manolagas SC., Kousteni C., Jilka RL. (2002)
Sex steroids and bone
Recent Prog Horm Res; 57:385-409

Mann D.R., Gouls K.G., Collins D.C. (1990)

Potential primate model for bone loss resulting from medical oophorectomy or menopause.

J Clin Endocrinol Metabol 71: 105-10

Michael H., Harkonen PL., Vaananen Hk., Hentunen TA, (2005)

Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption

J Bone Miner Res.; 20(12):2224-32.

Minne H.W., Pfeifer M., (2003)

Aus dem Blick der evidenzbasierten Medizin

Diagnostik und Therapie der postmenopausalen Osteoporose

Klinikerzt; 32 (5): 151-56

Mirzaei S., Krotla S., Knoll P., Korsika K., Kohn H. (1999)

Possible effect of calcitonin deficiency on bone mass after subtotal thyroidectomy

Acta Med Austriaca; 26(1): 29-31

Moos D.W. (1992)

Perspectives in alkaline phosphatase research

Clin Chem 38: 2486-92

Morales A. (2004)

Andropause (or symptomatic late onset hypogonadism):facts, fiction and controversies.

Aging Male; 7: 297– 303.

Mosekilde L., Kragstrup J., Richards A., (1987)

Compressive strength, ash weight, and volume of vertebral trabecular bone in experimental fluorosis in pigs.

Calcif Tissue Int 40: 318-22

Mosekilde L., Weisbrode S E., Safron J A, Stills H F., Jankowsky M L., Ebert D C.,
Danielsen C C., Sogaard C H., Franks A F., Stevens M L (1993)

Calcium-restricted ovariectomized Sinclair S-1 minipigs: an animal model of
osteopenia and trabecular plate perforation.

Bone. 14(3): 379-82

Moverare S., Venken K., Eriksson AL., Andersson N., Skrtic S., Wergedal J., Mohan
S., Salmon P., Bouillon R., Gusatfsson JA., Vanderschueren D., Ohlsson C. (2006)

Differential effects on bone of oestrogen receptor alpha and androgen receptor
activation in orchidectomized adult male mice

Proc Natl Acad Sci USA; 103(21):8298

Mueck AO., Seeger H. (2006)

Hormontherapie und Hypertonie

Journal für Hypertonie; 10 (1), 14-22

Neer R.M. , Arnaud C.D., Zanchetta J.R., Prince R, Gaich G.A., Reginster J.Y.,
Hodsman A.B., Eriksen E.F., Ish-Shalom S., Genant H.K., Wang O., Mitlak B.H.
(2001)

Effect of parathyroid hormone on fractures and bone mineral density in
postmenopausal women with osteoporosis.

N Engl J Med; 344: 1434–41

Newman E., Turner A.S., Wark J.D. (1995)

The potential of sheep for the study of osteopenia: Current status and comparison
with other animal models.

Bone 16 (suppl 4) 227-84

Nielsen HK., (1994)

Circadian and circatrigintan changes in osteoblastic activity assessed by serum
osteocalcin. Physiological and methodological aspects

Dan Med Bull; 41 (2): 216-27

Nielsen HK, Brixen K, Bouillon R, Mosekilde L, (1990)
Changes in biochemical markers of osteoblastic activity during the menstrual cycle
J Clin Endocrinol Metab.; 70 (5): 1431-7

Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson OG., Lindahl A., Isgaard J. (1994)
Hormonal regulation of longitudinal bone growth
Eur J Clin Nutr.; 48 Suppl !: S 150-8; discussion S158-60

Notelovitz M. (2002)
Androgen effects on bone and muscle
Fertil Steril; 77 Suppl 4: 34-41

Notelovitz M., (2002)
Overview of bone mineral density in postmenopausal women
J Reprod Med; 47(1 Suppl): 71-81

Oberbauer AM., Peng R. (1995)
Growth hormone and IGF-1 stimulate cell function in distinct zones of the rat
epiphyseal growth plate
Connect Tissue Res; 31(3): 189-95

Ohlsson C., Bengtsson BA., Isaksson OG., Andreassen TT., Sloopweg MC. (1998)
Growth hormone and bone
Endocr Rev ; 19 (1): 55-79

Oliver WT., McCauley I., Harrell RJ., Suster D., Kerton DJ., Dunshea FR, (2003)
A gonadotroin – releasing factor vaccine (Improvac) and porcine somatotropin have
synergistic and additive effects on growth performance in group – house boars and
gilts
Journal Animal Science; 81 (8): 1959-66

Pedrazzoni M, Alfano FS, Girasole G (1996)

Clinical observations with a new specific assay for bone alkaline phosphatase: a cross-sectional study in osteoporotic and pagetic subjects and longitudinal evaluation of the response to ovariectomy, estrogens and bisphosphonates.

Calcif Tissue Int 59: 334-38

Pepene CE., Seck T., Pfeilschifter J., Gozariu L., Ziegler R., Kasperk CH. (2003)

The effects of triiodothyronine on human osteoblast-like cells metabolism and interactions with growth hormone

Exp Clin Endocrinol Diabetes; 111(2): 66-72

Pietschmann P., Kudlacek S., Peterlik M., (2004)

Pathogenese und Therapie der Osteoporose beim Mann

Journal für Mineralstoffwechsel; 11 (Sonderheft 2): 12-4

Popp AWE, Lippuner K., (2005)

Osteoporoseprävention bei der Frau heute

Journal für Menopause; 12 (1): 5-14

Prakasam G., Yeh JK., Chen MM., Castro-Magana M., Liang CT., Aloia JF

Effects of growth hormone and testosterone on cortical bone formation and bone density in aged orchietomized rats (1999)

Bone; 24 (5):491-7

Professor Waehner

Endokrinologie der Fortpflanzung

Abgerufen am 14.07.08, unter: [www.kolleg.loel.hs-](http://www.kolleg.loel.hs-anhalt.de/professoren/waehner/anatomie/endokrinologie.pdf)

[anhalt.de/professoren/waehner/anatomie/endokrinologie.pdf](http://www.kolleg.loel.hs-anhalt.de/professoren/waehner/anatomie/endokrinologie.pdf)

Ou Q., Perala-Heape M., Kapanen A., Dahllund J., Salo J., Vaananen HK., Harkonen P. (1998)

Estrogen enhance differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture

Bone.; 22(3): 201-9

Rabe T., Geisthövel F., Hadji P., Kiesel L., Mueck AO.,(2006)

Hormonersatztherapie – Nutzen und Risiken

J. Reproduktionsmed. Endokrinol; 3 (3), 155 – 65

Reif K. (2007)

Untersuchung des Knochenstoffwechsels anhand der Knochenmarker
knochenspezifische alkalische Phosphatase und Pyridinolin am intakten und
ovariohysterektomierten Osteoporosemodell Minipig

Vet Med Diss, München

Resch H., Bernecker P., (2004)

Parameter für Knochenneubildung und Knochenabbau

Rheuma Plus, 3. Jahrgang Nr. 4: 1-9

Ricci TA., Heymsfield SB., Pierson RN Jr., Stahl T., Chowdhury HA., Shapses SA
(2001)

Moderate energy restriction increases bone resorption in obese postmenopausal
woman

Am J Clin Nutr 73 (2): 347-52

Riggs B.L., Khosla S., Melton J., (1998)

A Unitary Model for Involutional Osteoporosis: Estrogen Deficiency Causes Both
Type 1 and Type 2 Osteoporosis in Postmenopausal Woman and Contributes to
Bone Loss in Aging Men

J Bone Miner Res, (5) : 763-73

Riggs B.L., Melton L.J. (1986)

Involutional osteoporosis

New Engl J Med 314: 1676-86

Riggs B.L., Spelsberg T.C. (1996)

Mechanisms of estrogen action and bone cells

In: Osteoporosis 1996: Proceedings of the World Congress on Osteoporosis, (ed.:
Papapoulos, S. E. Er al.), Elsevier Science B. V., Amsterdam 241-50

Robson H., Siebler T., Stevens DA., Shalet SM., Williams GR (2000)
Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes hypertrophic
differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation
Endocrinology, 141(10): 3887-97

Rodgers J.B., Faugere M.C., Malluche H. (1993)
Bone loss after cessation of ovarian function.
Bone 14: 369-77

Rousselle AV., Damiens C., Guicheux J., Pilet P., Padrines M., Heymann D. (2000)
In vitro effects of growth hormone on osteoclastic activity: clinical applications
Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot; 86(3): 256-64

Samuels HH., Stanley F., Casanova J. (1979)
Relationship of receptor affinity to the modulation of thyroid hormone nuclearreceptor
levels and growth hormone synthesis by L-triiodothyronine analogues in cultured
GH1 cells
J Clin Invest; 63(6): 1229-40

Schindler A.E., (2003)
Schilddrüse, Klimakterium und Hormontherapie
Journal für Menopause; 10 (4) 28-31

Scholz-Ahrens K., Barth C.A., Drescher K., Goralczyk R., Rambeck W.A., Wehr U.,
Schrezenmeir J. (1996)
Modulation of bone markers by dietary calcium in ovariectomized minipigs.
Osteoporosis 6, Suppl. 1, PTu 639

Schwyster C. (2007)
Improvac hat Zulassung erhalten, Schweinehaltung
Aus der Bauern Zeitung, 2. Februar 2007, S.5

Sebastian A, Harris ST, Ottaway JH, Todd KM and Morris RC, Jr. (1994)
Improved mineral balance and skeletal metabolism in postmenopausal women
treated with potassium bicarbonate.
N Engl J Med 330: 1776-81

Seibel M.J., Zipf A., Ziegler R. (1994)
Pyridinium cross-links in urine
Dtsch- Med- Wochenschr 119: 923-29

Siebler T., Robson., Shalet SM., Williams Gr. (2001)
Glucocorticoids, thyroid hormone and growth hormone interactions: implications for
the growth plate
Horm Res; 56 Suppl 1: 7-12

Simpson ER., (2003)
Sources of estrogen and their importance
J Steroid Biochem Mol Biol. 2003 Sep; 86(83-5): 225-30

Slootweg MC., Salles JP., Ohlsson C., de Vries CP., Engelbregt MJ., Netelenbos JC.
(1996)
Growth hormone binds to a single high affinity receptor site on mouse osteoblasts:
modulation by retinoic acid and cell differentiation
J Endocrinol; 150(3): 465-72

Spelsberg T.C., Subramaniam M., Riggs B.L, Khosla S. (1999)
The actions and interactions of sex steroids and growth factors / cytokines on the
skeleton
Mol Endocrinol 13: 819-28

Seibel M.J., Cosman F., Shen V., Gordon S., Dempster D.W., Ratcliffe A., Lindsay
R. (1993)
Urinary hydroxypyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption and
estrogen efficacy in postmenopausal osteoporosis
J Bone Miner Res 8. 881-9

Stein B., Yang MX. (1995)

Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and c/EBP beta

Mol. Cell. Biol. Vol 15 No.9: 4971-9

Stepan J, Lachmann M, Zverina J, Pacovsky V, Baylink D. (1989)

Castrated men exhibited bone loss. Effect of calcitonin treatment on biochemical indices of bone remodelling. J Clin Endocr; 69: 523-7.

Swaminathan R (2001)

Biochemical markers of bone turnover.

Clinical Chimica Acta 313: 95-105

Syed F., Khosla S. (2005)

Mechanisms of sex steroids effects on bone

Biochem Biophys Res Commun; 328(3): 688-96

Trachsler H. (2003)

Hormone

Gefunden unter: <http://ntbiouser.unibe.ch/Trachsel/teaching/Hormone/Hormone.htm>

Abgerufen am 12. 2006

Tsutsumi H., Katagiri K., Morimoto M., Nasu T., Tanigawaa M., Mamba K, (2004)

Diurnal variation and age – related changes of bone markers in female göttinger minipigs

Lab Anim 38 (4): 439-46

Turner R.T., Riggs B.L., Spelsberg T.C (1994)

Skeletal effects of estrogen

Endocrine Rev 16: 275-300

Vancata R.,(2002)

Knochen – Abbauprodukte und ihr Einsatz im Disease Management der

Osteoporose: Crosslaps in der Osteoporose – Diagnostik

Journal für Mineralstoffwechsel; 9 (1)

Vanderschueren D., Vandenput L., Boonen S., Lindberg MK., Bouillon R., Ohlsson C. (2004)

Androgens and bone

Endocr Rev.; 25(3): 389-425

Venken K., De Gendt K., Boonen S., Ophoff J., Bouillon R., Swinnen JV., Verhoeven G., Vanderschueren D. (2006)

Relative impact of androgen and estrogen receptor activation in the effects of androgens on trabecular and cortical bone in growing male mice: a study in the androgen receptor knockout mouse model

J Bone Miner Res; 21(4): 576-85

Vervuert I., Winkelsett S., Christmann L., Bruns E., Hoppen HO., Distl E., Hertsch B., Coenen M (2007)

Evaluation of the influence of exercise, birth date, and osteochondrosis on plasma bone marker concentrations in Hanoverian Warmblood foals

Am J Vet Res; 68 (12): 1319-23

Vogelmann J. (2009)

Untersuchungen zur Knochendichte im Modell des immunkastrierten Minipigs

Diss Med Vet in Vorbereitung

Wang C., Berman N., Cunningham G., Dobs A., Iranmanesh A., Matsumoto AM., Snyder PJ., Swerdloff RS., Weber T., (2003)

Auswirkung von transdermalem Testosterongel auf Marker des Knochenumsatzes und die Knochendichte bei hypogonadalen Männern

Journal für Urologie und Urogynäkologie; 10 (Sonderheft 1): 47-59

Weber F., (2007)

Persönliche Mitteilung

Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Zerbe, Klinik für Wiederkäuer München

Windler E., Eidenmüller B., Zyriax BC., (2004)

Hormonersatztherapie und kardiovaskuläre Erkrankungen

Journal für Menopause; 11 (3): 10-3

Wiren KM, (2005)

Androgens and bone growth: it's location, location, location

Curr Opin Pharmacol; 5(6): 626-32.

Wiren KM., Chapman Evans A., Zhang XW, (2002)

Osteoblasten differentiation influences androgen and estrogen receptor-alpha and -beta expression

J Endocrinol.; 175(3). 683-94

Yasui T., Miyatani Y., Tomita J., Yamada M., Uemura H., Miura M., Irahara M.,

(2006)

Effect of vitamin K2 treatment on carboxylation of osteocalcin in early postmenopausal woman

Gynecol Endocrinol; 22(8): 455-9

Zallone A., (2006)

Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts

Ann N Y Acad Sci; 1068: 173-9

Zamaratskaia G., Andersson HK., Chen G., Andersson K., Madej A., Lundström K.,

(2007 a)

Effect of a Gonadotropin – releasing Hormone Vaccine (Improvac (TM)) on Steroid Hormones, Boar Taint Compounds and Performance in Entire Male Pigs

Reprod Domest Anim., Epub ahead of print

Zamaratskaia G., Rydhmer L., Andersson HK., Chen., Lowagie S., Andersson K.,
Lundström K., (2007 b)

Long – term effect of vaccination against gonadotropin – releasing hormone, using
Improvactrade mark, on hormonal profile and behaviour of male pigs

Anim Reprod Sci , Epub ahead of print

Zierold C., Mings J.A. und DeLuca H.F. (2003)

Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin
D3 and parathyroid hormone

J Cell Biochem 88 (2): 234-37

Zitzmann M., Nieschlag E., (2001)

Androgensubstitution beim Mann : Hypogonadismus im Alter

Journal für Urologie und Urogynäkologie; 8 (Sonderheft 1): 21-30

Zhou S., Zilberman Y., Wassermann K., Bain SD., Sadovsky Y., Gazit D., (2001)

Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic
activity, and apoptosis an mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice

J Cell biochem Suppl.; Suppl 36: 144-55

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammensetzung des Alleinfutters
Tabelle 2:	Mittlere Gewichte beider Gruppen
Tabelle 3:	17- β -Östradiolkonzentrationen der Einzeltiere
Tabelle 4:	Mittlere 17- β -Östradiolkonzentration beider Gruppen
Tabelle 5:	AUC der 17- β -Östradiolkonzentrationen
Tabelle 6:	Osteocalcinkonzentrationen der Einzeltiere
Tabelle 7:	Mittlere Osteocalcinkonzentration beider Gruppen
Tabelle 8:	AUC der Osteocalcinkonzentrationen
Tabelle 9:	Crosslapkonzentrationen der Einzeltiere
Tabelle 10:	Mittlere Crosslapkonzentrationen beider Gruppen
Tabelle 11:	AUC der Crosslapkonzentrationen
Abb 1:	Verlauf der Östrogenkonzentrationen innerhalb des Sexualzyklus von Rind, Schwein, Schaf und Pferd
Abb 2:	Versuchsaufbau
Abb 3	Verlauf der 17- β -Östradiolkonzentration im Serum der Kontrollgruppe
Abb 4	Verlauf der 17- β Östradiolkonzentration im Serum der Versuchsgruppe
Abb 5:	Verlauf der Osteocalcinkonzentration im Serum der Kontrollgruppe
Abb 6:	Verlauf der Osteocalcinkonzentration im Serum der Versuchsgruppe
Abb 7:	Verlauf der Crosslapkonzentration im Serum der Kontrollgruppe
Abb 8:	Verlauf der Crosslapkonzentration im Serum der Versuchsgruppe
Abb 9:	Verlauf des 17- β -Östradiols im Serum in den zwei Untersuchungsgruppen

- Abb 10: 17- β -Östradiolkonzentrationen nach Ovariectomie und nach Immunisierung
- Abb 11: Verlauf mittleren Crosslaps-Konzentration beider Gruppen über gesamten Versuchszeitraum
- Abb 12: Verlauf mittleren Osteocalcin-Konzentration beider Gruppen über gesamten Versuchszeitraum

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Rambeck für die Überlassung des Themas und seine hilfsbereite Betreuung bedanken.

Ebenso möchte ich ein ganz großes Dankeschön gegenüber Herrn Prof. Dr. Dr. Ammer aussprechen, der sich die Zeit genommen hat, mich auf feine Details hinzuweisen und mir Hilfestellung beim Lösen von Problemen gegeben hat.

Ein herzlicher Dank auch an Dr. Ulrich Wehr, der mich wirklich super betreut hat.

Mein größter Dank gilt an dieser Stelle Britta, Julia und Philip. Vielen Dank für Eure, vor allem Brittas und Julias, Tages- und Nachteinsätze sowie der Motivation und Unterstützung in wirklich jeder Form.

Ein riesiges Dankeschön auch an Johannes, Du bist wirklich immer für mich da und sei es in Form von Telefonaten. Ebenso Gabriel.

Tausend Dank auch an Mischa, meiner persönlichen Lektorin. Danke für Deinen Einsatz.

Auch herzliches Dankeschön an Herrn Hesselbach, der mir Rat und Tat im Labor zur Seite stand.

Und nicht zuletzt ein riesiges Dankeschön an Adrian, Steffen und Nadja für Eure Hilfe und Betreuung bei den Minipigs.

Vor allem auch meiner Mama und meinen Großeltern: Danke für eure Unterstützung, die mich so weit gebracht hat.

