

## 6. Zusammenfassung / Summary

Gegenstand dieser Arbeit war die Hypothese, daß die Anwendung von Depotgestagenen und niedrig dosierten hormonalen Kontrazeptiva (Ethinylöstradiol  $\leq 20 \mu\text{g}$ ) den Knochenstoffwechsel über einen erniedrigten Östradiolserumspiegel negativ beeinflusst und sich langfristig auf die sogenannte „peak bone mass“ und die premenopausale Knochendichte auswirkt. Damit wäre ein erhöhtes Risiko verbunden, postmenopausal an Osteoporose zu erkranken.

Die vorliegende Arbeit liefert einen Beitrag zur Klärung dieser Hypothese, indem hier der Einfluß von Gestagenen unterschiedlicher Partialwirkung auf die Knochendichte am Tiermodell Ratte untersucht wurde.

Erstmals konnte im ersten Versuch der vorliegenden Arbeit die Beziehung zwischen Östradiol-Substitutionsmenge, Östradiolserumspiegel und Knochendichteverlust in ovariectomierten Ratten ermittelt werden. Dazu wurden 52 drei Monate alte Ratten auf sechs Gruppen verteilt. Die erste Gruppe wurde scheinoperiert, die restlichen Gruppen ovariectomiert und die Tiere der Gruppen 2-5 anschließend mit vier verschiedenen Östradiol-Dosierungen (0,05; 0,1; 0,3 und 0,5  $\mu\text{g}$ / Tier und Tag) über einen Zeitraum von vier Wochen substituiert.

Verglichen mit den scheinoperierten Kontrolltieren zeigten die ovariectomierten Ratten ohne Substitution einen deutlichen Abfall des Östradiolserumspiegels (23 pmol/l) und eine Reduktion der Knochendichte um 30 %. Die unterschiedliche Östradiolbehandlung beeinflusste dagegen den Östradiolserumspiegel und die Knochendichte dosisabhängig. In den Substitutionsdosen 0,5 und 0,3  $\mu\text{g}$ /Tier und Tag veränderte sich die Knochendichte über vier Wochen nicht. Über den Behandlungszeitraum lag die Östradiolserumkonzentration in der erst genannten Gruppe relativ konstant um 140 pmol/l, in der letztgenannten Gruppe durchschnittlich um etwa 60 pmol/l. Im Gegensatz dazu verringerte sich die Knochendichte in der Gruppe mit einer Substitutionsdosis von 0,1  $\mu\text{g}$ / Tier und Tag um etwa 10 % (nicht signifikant) und in der 0,05  $\mu\text{g}$ /Tier und Tag-Gruppe um 14 %. Die durchschnittlichen Östradiolserumkonzentrationen lagen dabei um 50 pmol/l und 32 pmol/l. Dieser Versuch zeigte, daß eine Östradiolserumkonzentration von 50 pmol ein kritischer Grenzwert in Beziehung zur Knochendichte ist. Fällt die Östradiolserumkonzentration unter diesen Wert, wird eine Reduktion der Knochendichte beobachtet. Östradiolserumkonzentrationen über 50 pmol sind knochenprotektiv.

Im zweiten Experiment wurde an adulten, intakten Ratten eine ovulationhemmende Dosis der eingesetzten Gestagene Levonorgestrel, Medroxyprogesteronacetat und Promegeston

ermittelt. Hierbei wurden in einzelnen Versuchen jeweils drei Dosierungen pro Gestagen geprüft. Folgende Dosierungen wurden für den Einsatz im dritten Versuch festgelegt: Levonorgestrel – 50 µg/ Ratte und Tag, Medroxyprogesteronactat – 500 µg/ Ratte und Tag und Promegeston – 50 µg/ Ratte und Tag. Diese Wahl erfolgte unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Versuch II sowie früherer Schering-interner Versuche.

Im dritten Versuch wurde, bisher einmalig, der Einfluß einer siebenwöchigen, ovulationshemmenden Gestagenbehandlung auf die Knochendichte untersucht. siebenundvierzig drei Monate alte, intakte Ratten wurden auf fünf Gruppen verteilt. Jeweils acht Ratten erhielten eines der ausgewählten Gestagene in ovulationshemmender Dosis. Die 16 Ratten der intakten Kontrollgruppe erhielten Vehikel, ebenso wie die sieben Tiere, die ovariectomiert wurden.

Über den Behandlungszeitraum zeigte sich keine Veränderung der Knochendichte in allen Gestagen-behandelten Gruppen im Vergleich zur intakten Kontrollgruppe. In der ovariectomierten Kontrollgruppe wurde, wie zu erwarten, ein Knochendichteverlust von 30 % festgestellt. Die Östradiolserumkonzentration in allen Gestagen-behandelten Gruppen lag bei durchschnittlich 80 pmol/l, die der ovariectomierten Kontrollgruppe bei 30 pmol/l.

Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde des ersten Versuchs. Wieder wurde festgestellt, daß ein Östradiolserumspiegel über 50 pmol/l knochenprotektiv wirkt. Weiterhin zeigt sich, daß der Einsatz der Gestagene in den verabreichten Dosierungen zu keinem Abfall der Östradiolserumkonzentration unter 50 pmol/l führte und deshalb eine negative Wirkung auf die Knochendichte auszuschließen ist. Es wurde kein Einfluß einer androgenen Partialwirkung auf die Knochendichte festgestellt.

## Summary

### **The effect of continuous application of gestagens on bone density in adult intact rats**

The aim of the study was to investigate the hypothesis that women using depogestagens and low-dose oral contraceptives (Ethinylöstradiol  $\leq 20\mu\text{g}$ ) carry a higher risk of postmenopausal osteoporosis. The use of these hormonal contraceptives results in marked decrease of estradiol serum level, which suggest a negative impact on bone metabolism with long-term effects on peak bone mass and premenopausale bone density.

The present study contributed to clarifying this hypothesis since the influence of progestins of different partial effects on bone density in adult female rats were investigated.

The first experiment detected for the first time the relationship between 17- $\beta$ -estradiol substitution doses, 17- $\beta$ -estradiol-serum level and the decrease of bone density in adult ovariectomised rats.

52 three month old female rats were randomised into six groups. Five groups were ovariectomised and one group SHAM-operated. Four groups received 17- $\beta$ -estradiol-substitution over 28 days as follows:

0,5  $\mu\text{g}$ / rat \* day

0,3  $\mu\text{g}$ / rat \* day

0,1  $\mu\text{g}$ / rat \* day

0,05  $\mu\text{g}$ / rat \* day.

Along with rapid decrease of 17- $\beta$ -estradiol serum level, the OVX-control rats showed a 30 % reduction of bone density. Osteocalcin was significantly increased. The oestrogen treatment of the ovariectomised groups influenced the bone density and 17- $\beta$ -estradiol-serum levels in a dose-dependent manner. In the substitution groups of 0,5  $\mu\text{g}$  and 0,3  $\mu\text{g}$ /rat\*day the bone density was not changed. The 17- $\beta$ -estradiol -serum concentration reached nearly constant levels for the first group at 140 pmol/l and for the last at 60 pmol/l. Contrary to these findings, bone resorption increased in the 0,1  $\mu\text{g}$  and 0,05  $\mu\text{g}$ /rat\*day treated groups at about 10 % and 14 %. The average 17- $\beta$ -estradiol -serum levels ranged between 50 and 32 pmol/l.

From this experiment it is suggested that the serum estradiol level of 50 pmol/l is a crucial threshold value for bone density in female rats. As the 17- $\beta$ -estradiol -serum levels fell below this level, negative effects on bone density were observed. On the other hand, serum estradiol levels above 50 pmol/l suppress bone resorption and work bone protective.

In a second experiment, the minimal ovulation inhibition dose for the applied progestins (Levonorgestrel, Medroxyprogesteronacetat und Promegeston) were determined.

Three doses for each progestin were tested. According to this experiment and internally performed trials at the Schering AG the following doses for application in the third experiment were scheduled:

Levonorgestrel – 50 µg/ rat and day

Medroxyprogesteronactat – 500 µg/ rat and day

Promegeston – 50 µg/ rat and day

In the third experiment, the influence of progestin treatment in an ovulation inhibiting dose over a period of seven weeks on bone density was investigated.

47 three-month-old female rats were randomised into five groups. Three groups, each with eight rats, received the three mentioned progestins in ovulation inhibiting dose. One group with 16 rats received vehicle and served as an intact control group. One group with seven rats was ovariectomised.

At the end of the experiment none of the progestin treated groups showed a significant change of bone density compared to the intact control group. However, the bone density decreased by 30 % in the ovariectomised group, as had been expected.

The 17-β-estradiol -serum level of the progestin treated groups reached 80 pmol/l. In the ovariectomised group 30 pmol/l was determined.

These results confirm the findings of the first experiment where a crucial threshold value for bone density preservation at 50 pmol/l was found.

17-β-estradiol serum levels higher than 50 pmol/l are bone protective. None of the investigated progestins leads to a decrease of the 17-β-estradiol serum levels below this limit. These findings suggest that negative effects on the bone density of the investigated progestins given in an ovulation inhibiting dose to adult rats can be excluded. In this context, no influence of an androgen partial effect on bone density and bone structure could be observed.