

Aus der Klinik und Poliklinik für Chirurgie
Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungs chirurgie
der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Mittlmeier



**Der Einfluss von Bisphenol A auf die Biomechanik und die Mikro-CT-
morphologische Architektur des Knochens der Wistar-Ratte**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von
Tobias Prasse
aus Köln
Rostock 2020

Universitätsmedizin Rostock

Klinik und Poliklinik für Chirurgie

Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Mittlmeier

Dekan: Professor Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger

Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Mittlmeier, Universitätsmedizin Rostock, Abteilung für Unfall-, Hand- und
Wiederherstellungschirurgie

Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Immunologie

Priv.-Doz. Dr. Carolin Meyer, Schön Klinik Düsseldorf, Fachzentrum für Rücken &
Wirbelsäule

Jahr der Einreichung: 2020

Jahr der Verteidigung: 2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	7
1.1 Bisphenol A.....	8
1.1.1 Die chemischen Eigenschaften von Bisphenol A	8
1.1.2 Vorkommen und Verwendung von Bisphenol A	9
1.1.3 Metabolismus von Bisphenol A	10
1.1.4 Wirkung von Bisphenol A.....	11
1.2 Knochengewebe	16
2. Zielsetzung	21
3. Materialien und Methoden	22
3.1 Experimenteller Aufbau	22
3.1.1 Versuchstiere	23
3.1.2 Osmotische Pumpen.....	24
3.1.3 Implantation und Wechsel der osmotischen Pumpen	25
3.2 Untersuchungsmethoden	27
3.2.1 Mikro-Computertomografie	27
3.2.2 Biomechanische Untersuchungen	30
3.2.3 Statistische Analyse.....	32
4. Ergebnisse	34
4.1 Mikro-CT-Untersuchungen	34
4.2 Dreipunkt-Biegetest	46
4.3 Gewichtsverlauf	55
5. Diskussion	56
5.1 Diskussion der Ergebnisse	56
5.2 Diskussion von Limitationen, Materialien und Methoden.....	61
5.3 Ausblick	65
6. Zusammenfassung.....	69

7. Thesen	71
8. Literatur	72
9. Danksagung	87
10. Eidesstattliche Erklärung	88
11. Lebenslauf	89
12. Anhang	92
12.1 Ergebnistabellen der Mikro-CT-Untersuchung	92
12.2 Ergebnistabellen des Dreipunkt-Biegetests	94
12.3 Ergebnistabellen der statistischen Tests	95

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Die Struktur von Bisphenol A</i>	8
<i>Abbildung 2: Zeitlicher Ablauf der experimentellen Versuchsreihe</i>	22
<i>Abbildung 3: Osmotische Pumpe mit Übersichtsdarstellung des Wirkmechanismus</i>	24
<i>Abbildung 4: Lagerung der Versuchstiere während der Eingriffe.....</i>	25
<i>Abbildung 5: Implantation einer osmotischen Pumpe</i>	26
<i>Abbildung 6: Darstellung von Mikro-CT-Aufnahmen der Rattenknochen.....</i>	29
<i>Abbildung 7: Material-Prüfmaschine und Testung einer Probe.....</i>	31
<i>Abbildung 8: Spannungs-Dehnungskurve</i>	31
<i>Abbildung 9: Kraft-Deformitäts-Kurve</i>	32
<i>Abbildung 10: Länge der Femora der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) in mm</i>	35
<i>Abbildung 11: Anteil Knochengewebe am Gesamtvolumen (VOX BV/TV).....</i>	36
<i>Abbildung 12: Querschnittsfläche kortikalen Knochens der Femora.....</i>	37
<i>Abbildung 13: Querschnittsfläche des Knochenmarkbereichs der Femora.....</i>	38
<i>Abbildung 14: Querschnittsfläche der Femora</i>	39
<i>Abbildung 15: Konnektivitätsdichte der Femora</i>	40
<i>Abbildung 16: Anteil kortikalen Knochens am Gesamtknochenquerschnitt der Femora</i>	41
<i>Abbildung 17: Anzahl an Trabekeln der Femora.....</i>	42
<i>Abbildung 18: Abstand der Trabekel der Femora</i>	43
<i>Abbildung 19: Dicke der Trabekel der Femora</i>	44
<i>Abbildung 20: Dicke der Kortikalis der Femora</i>	45
<i>Abbildung 21: Elastizitätsmodul in MPa</i>	46
<i>Abbildung 22: Energie in mJ der Femora.....</i>	47
<i>Abbildung 23: Energiedichte in mJ mm⁻³ der Femora</i>	48
<i>Abbildung 24: Maximale Verformung der Femora in mm</i>	49
<i>Abbildung 25: Maximale Kraft der Femora in N</i>	50
<i>Abbildung 26: Maximale Dehnung der Femora</i>	51
<i>Abbildung 27: Maximale Druckbelastung der Femora in MPa.....</i>	52
<i>Abbildung 28: Steifigkeit der Femora in N mm⁻¹</i>	53
<i>Abbildung 29: Flächenträgheitsmoment der Femora in mm⁴</i>	54
<i>Abbildung 30: Verhältnis von End- zu Startgewicht</i>	55

Abkürzungsverzeichnis

ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom
ArbSchG	Arbeitsschutzgesetz
ArbStättV	Arbeitsstättenverordnung
BADGE	Bisphenol-A-Diglycidylether
BetrSichV	Betriebssicherheitsverordnung
BMD	Benchmark Dosis
BMP / BMP-2	Bone Morphogenetic Protein / Bone Morphogenetic Protein 2
BMU	Basic Multicellular Units
BPA	Bisphenol A
BPA-G	Bisphenol A-Glucuronid
CLP	Classification, Labelling and Packaging
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECHA	European Chemicals Agency
EFSA	European Food Safety Authority
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GefStoffV	Gefahrenstoffverordnung
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HbA _{1C}	Glykiertes Hämoglobin A1
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JuSchG	Jugendschutzgesetz
LCSS	Laboratory Chemical Safety Summary
LH	Luteinisierendes Hormons
M-CSF	Makrophage Colony-Stimulating Factor
Mikro-CT / µCT	Mikro-Computertomografie
MuSchG	Mutterschutzgesetz
NIH	National Institutes of Health
OPG	Osteoprotegerin
OSAS	Obstruktives Schlafapnoe-Syndrom
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PTH	Parathormon
PVC	Polyvinylchlorid
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor-κB(-Ligand)
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
SPF	Spezifisch pathogenfrei
SVHC	Substances of Very High Concern
TDI	Tolerable Daily Intake
UDP/UDP-GT	Uridin-Diphosphat/Uridin-Diphosphat-Glukuronyl-Transferase

1. Einleitung

Im Rahmen des demografischen Wandels der westlichen Gesellschaft einschließlich der Bundesrepublik Deutschland und dem damit verbundenen stetig ansteigenden durchschnittlichen Lebensalter gewinnen chronische Einflüsse und Umweltfaktoren an Relevanz für den menschlichen Organismus (1).

Bezogen auf den Aufbau des Knochens kommt es zu einer vermehrten Inzidenz von Osteoporose und einem konsekutiv erhöhten Frakturrisiko, was zusätzlich sozioökonomische Konsequenzen in Form einer Kostenzunahme im Rahmen der Prophylaxe und der Therapie möglicher Folgen der Osteoporose wie Frakturen und deren Versorgung mit sich trägt (2).

Einen Einflussfaktor auf die Knochenarchitektur stellt neben zahlreichen exogenen und endogenen Faktoren die Chemikalie Bisphenol A („BPA“) dar. BPA ist eine ubiquitär in Polymeren vorkommende chemische Verbindung, die indirekt als Weichmacher fungiert (3). Durch den stetigen und unvermeidbaren Kontakt aller Komponenten des Ökosystems Erde einschließlich des Menschen mit Kunststoffen beziehungsweise Objekten aus Plastik und somit auch mit BPA auf der gesamten Welt ist es von besonderem Interesse die Einflüsse dieses Stoffes auf den tierischen und menschlichen Organismus zu untersuchen. Es besteht ein globales Interesse daran, dass die Gesundheit gefährdende chemische Verbindungen wie BPA identifiziert werden und die Verarbeitung, sofern nötig, auf politischer Ebene eingeschränkt wird.

Zum Zeitpunkt der Verfassung dieser Arbeit ist die Verwendung von BPA in der Europäischen Union nicht verboten, jedoch nur mit Einschränkungen zugelassen und die Studienlage für das Ausmaß einer schädigenden Beeinflussung des Menschen nicht abschließend geklärt. Das Bundesamt für Risikobewertung sieht unter Einhaltung aktueller Vorgaben zur Verwendung von BPA kein Risiko für den Menschen (4), die European Food Safety Authority („EFSA“) plant 2020 eine Re-Evaluation neuer Studienergebnisse und eine damit verbundene mögliche Neubewertung der Gefährdung des menschlichen Organismus durch BPA (5).

Diese wissenschaftliche Arbeit untersucht am Tiermodell, ob und inwieweit BPA sich in verschiedenen Dosierungen auf den Aufbau sowie die Mikroarchitektur des Knochens der männlichen und weiblichen Wistar-Ratte auswirkt. Diesen Punkt galt es mit der Mikro-Computertomografie zu bewerten. Zudem wurde die Belastbarkeit, die Stabilität und Verformbarkeit der Knochen mittels Dreipunkt-Biegetest untersucht.

1.1 Bisphenol A

Bisphenol A ist mit einer weltweiten Produktionsmenge von 3,8 Millionen Tonnen pro Jahr (circa 1,15 Millionen Tonnen davon in der Europäischen Union und 410.000 Tonnen in Deutschland) eine der am häufigsten produzierten chemischen Verbindungen (5).

Aus dem Jahr 1905 existiert eine Publikation des Professors Theodor Zincke der Universität Marburg über die Herstellung von BPA (6). Zuvor war Alexander Dianin im Jahre 1891 erstmalig die Synthese des Stoffes gelungen (7). Der Nachweis einer östrogenen Wirkung des Stoffes gelang 1936 durch die britischen Wissenschaftler Edward Charles Dodds und Wilfrid Lawson. BPA konnte sich jedoch aufgrund seiner vergleichsweise schwachen Wirkung als künstlich hergestelltes Östrogen in der pharmazeutischen Nutzung nicht durchsetzen (8, 9).

1.1.1 Die chemischen Eigenschaften von Bisphenol A

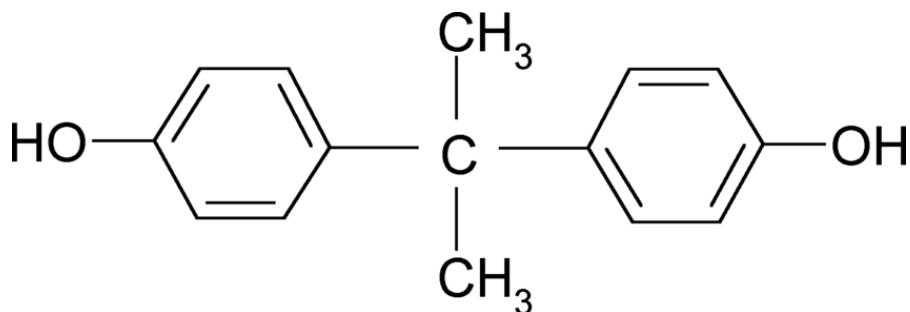


Abbildung 1: Die Struktur von Bisphenol A (10)

Die chemische Struktur von Bisphenol A (siehe Abbildung 1) setzt sich nach Synthese aus zwei Phenolringen in Anwesenheit von Aceton im Rahmen einer säurekatalysierten elektrophilen aromatischen Substitution in zwei Schritten unter Abspaltung von Wasser („H₂O“) zusammen. Diese Art der Reaktion bezeichnet man auch als Kondensation. Das „A“ in der Bezeichnung von BPA steht für ebendieses Aceton. Die Bezeichnung der International Union of Pure and Applied Chemistry („IUPAC“) lautet 4-[2-(4-Hydroxyphenyl)propan-2-yl]phenol, die chemische Summenformel lautet C₁₅H₁₂O₂. Es ist gut löslich in Ethanol, Äthern, alkalischen Lösungen und Benzenen sowie Acetsäuren, die Löslichkeit in Wasser ist deutlich schlechter. Laut der Laboratory Chemical Safety Summary („LCSS“) ist BPA ätzend, reizend und stellt als reiner Stoff eine Gesundheitsgefahr dar. Das Molekulargewicht beträgt 228,29 g mol⁻¹. Bei einer Raumtemperatur von 20 °C und einem Luftdruck von 1013,25 hPa (Normaldruck) hat es einen festen Aggregatzustand und liegt als weißes Pulver oder als weiße Flocken vor. Der Schmelzpunkt liegt bei 153 bis 157 °C, der Siedepunkt bei 227 °C (11).

1.1.2 Vorkommen und Verwendung von Bisphenol A

BPA dient in der Industrie und Umwelt unter anderem als Ausgangsstoff zur Synthese polymerer Kunststoffe wie Polykarbonaten und Epoxidharzen, als Flammenschutzmittel, als Ausgangsstoff in Zahnfüllungen und -versiegelungen. Außerdem wird es auch zum Verhindern der Polymerisation in Polyvinylchlorid („PVC“) und als Antioxidans in Weichmachern verwendet, welche wiederum dazu führen, dass Plastik nicht brüchig wird und es letztlich somit länger zur Verwendung geeignet ist. BPA ist demnach selbst chemisch nicht als Weichmacher einzustufen, verlängert bzw. verstärkt aber durch seine antioxidativen Eigenschaften den Wirkmechanismus und die Funktionsweise von Weichmachern (12). Durch ebendiese Funktion ist BPA in vielen Kunststoffen enthalten, die unter anderem auch direkten Kontakt zu Lebensmitteln und Getränken haben. Dazu gehören als Anwendungsbereich von Epoxidharzen Beschichtungen für Konserven- oder Getränkedosen (12). Diese werden zudem in Lacken, Bodenbelägen, Verbundwerkstoffen oder Klebstoffen verwendet. Aus Polykarbonat-Kunststoffen hingegen bestehen mikrowellenfeste Gefäße und Behältnisse aus Plastik, Kunstglas, Plastikkummantelungen elektronischer Gebrauchsgegenstände wie von Handys oder Küchengeräten, Rohlinge und Medizingeräte. Aber auch in Schnullern und Trinkflaschen von Babys ist BPA enthalten. Zudem ist es in relevanter Menge in Thermopapier, aus dem zahlreiche Kassenbons, Parktickets und Kontoauszüge bestehen, als Farbbildner enthalten (13). Polykarbonate erweisen sich als vielfältig einsetzbare Kunststoffe, die gegenüber Witterung, UV-Strahlung und mechanischer Beanspruchung eine hohe Widerstandsfähigkeit besitzen und zusätzlich im Anwendungsbereich von Kabelbeschichtungen eine sehr gute Isolierung darstellen (12).

Hoch ist darüber hinaus auch, wie bereits angedeutet, der Gehalt von BPA in Thermopapier. Am Beispiel von Kassenzetteln liegt er bei etwa $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (14), das Bundesamt für Risikobewertung der Bundesrepublik Deutschland gibt Werte für den Gehalt an BPA in Thermopapier zwischen 0,5 und 3,2 % an (15).

Durch Erhitzen der reaktionsträgen polymeren Verbindungen, in denen BPA enthalten ist, oder durch die Einwirkung von Säuren, Laugen oder UV-Strahlung kann die Freisetzung von BPA aus dem jeweiligen Material beschleunigt und so eine Aufnahme im Rahmen einer Speisen- oder Trinkwasserzubereitung möglich werden (16). Bei in BPA-beschichteten Konservendosen gelagerten Lebensmitteln konnten Konzentrationen zwischen 5 und $38 \mu\text{g}$ BPA pro kg enthaltender Ware gemessen werden, wobei diese Werte abhängig von der jeweiligen Studie deutlich schwanken (17). Sakhi et al. ermittelten in Norwegen eine BPA-Exposition durch

Lebensmitteln im Mittel von 5 ng pro kg Körpergewicht pro Tag (18). Chen et al. zeigten in einer Studie aus Taiwan Konzentrationen von 419,26 µg pro kg in Fleischprodukten, 262,15 µg pro kg in Hühnchen, 133,79 µg pro kg in Schwein, 9,78 µg pro kg in Eiern, 4,49 g pro kg in Milch, sowie 6,15 µg pro kg und 5,1 µg pro kg Gemüse beziehungsweise Obst (19).

1.1.3 Metabolismus von Bisphenol A

Der Hauptaufnahmeweg des Menschen von BPA ist aufgrund des ubiquitären Vorkommens in Lebensmitteln der transorale Weg über den Gastrointestinaltrakt in Form von Nahrungsmitteln und Wasser (12). Zusätzlich zu diesem Aufnahmeweg beschrieben Martinez et al. 2017, dass 78 % des BPAs, das nicht über die Nahrung aufgenommen wird, über Staub und Luft inhalativ in den Menschen gelangt (20).

Der Durchschnittswert an BPA, gemessen im Urin des Menschen, liegt bei 1,27 µg pro g Urin (21). Konzentrationen von BPA, die weit über dem Durchschnittswert liegen, konnten bei Menschen, die im Bereich der Herstellung oder Verarbeitung von BPA tätig sind, ermittelt werden (17). Aber auch bei Dialysepatienten und Neugeborenen, die sich in intensivmedizinischer Behandlung befinden, konnte ein erhöhter BPA-Spiegel im Urin nachgewiesen werden (22, 23). Entscheidender Faktor hierfür war der intensive Kontakt mit BPA-haltigen Kunststoffen über Medizinprodukte und medizinische Geräte. Durch seine Lipophilie ist neben der peroralen auch eine direkte Aufnahme über die Haut möglich, wie unter anderem von Zalko et al. gezeigt wurde (24), wenngleich die ermittelten Werte noch unterhalb der von der Europäischen Lebensmittelbehörde („EFSA“) festgelegten Referenzwerte beziehungsweise der tolerablen täglichen Aufnahmemenge („tolerable daily intake“, „TDI“) lagen (25). Ähnliche Studien konnten außerdem zeigen, dass es durch Kontakt zu Thermopapier zur signifikanten Erhöhung des BPA-Spiegels im Urin kommt (26-28).

Berechnungen von Lorber et al. kamen zu dem Ergebnis, dass der Median der durch Erwachsene pro kg Körpergewicht aufgenommenen BPA-Menge in µg pro Tag zwischen 0,03 und 0,07 liegt (29). Bei Kindern und Schwangeren ist der Wert zweifach bzw. 1,4fach erhöht (30). Im Falle von Neugeborenen, die ihre Nahrung über BPA-enthaltende Flaschen aufnehmen, zeigten sich Werte von 0,8 µg pro kg Körpergewicht (31). Vandenberg et al. geben die geschätzte Menge der BPA-Aufnahme in westlichen Industrienationen bei Erwachsenen mit 0,01-5 µg pro kg Körpergewicht pro Tag und bei Kindern mit 0,01-13 µg pro kg Körpergewicht pro Tag an. In Asien wird die tägliche Aufnahmemenge höher geschätzt (32-35).

Die Metabolisierung von BPA erfolgt nach gastrointestinaler Aufnahme mittels Glukuronidierung zu BPA-Glukuronid, nach vorausgegangener hepatischer und intestinaler Konjugation mit UDP-Glukuronsäure („UDP“, „Uridin-Diphosphat“). Möglich wird diese Reaktion durch das Enzym Uridin-Diphosphat-Glucuronosyl-Transferase („UDP-GT“) (12). Die Ausscheidung erfolgt über die Nieren und den Darm bei einer Halbwertszeit von weniger als sechs Stunden (36). Snyder et al. stellten 2000 fest, dass die glukuronidierte Form von BPA keine östrogene Wirkung zeigt (37). Eine weitere Studie brachte die Erkenntnis hervor, dass isotopenmarkiertes BPA („BPA-d₁₆“) im Urin 24 Stunden nach oraler Aufnahme nicht mehr nachgewiesen werden konnte, dermal zugeführtes BPA aber noch eine Woche nach Zufuhr bei der Hälfte der Urinproben (38). In Untersuchungen von Toner et al. wurde ebenfalls mit isotopenmarkiertem BPA herausgefunden, dass es eine dermale Absorptionsrate von 1,7-3,6 % besitzt und die Bioverfügbarkeit bei 16-20 % liegt (39).

BPA kann über das Abwasser ins Ökosystem gelangen und in einem sauerstoffreichen Milieu im Wasser durch Mikroorganismen abgebaut werden. Durch Kläranlagen werden 61-98% der BPA-Menge im Wasser entfernt, im Mittel circa 68% (40).

1.1.4 Wirkung von Bisphenol A

Im Fokus steht die Wirkung von BPA als sogenannter „Endokriner Disruptor“ oder als „Xenoöstrogen“ (41). So wirkt es an Hormonrezeptoren ohne selbst ein Hormon darzustellen und es besteht überdies die Möglichkeit der Gesundheit zu schaden (42). Es induziert auf diese Weise über Östrogenrezeptoren unter anderem das Wachstum und die Differenzierung von Adipozyten (43, 44). Valvi et al. sowie auch weitere Arbeitsgruppen (45, 46) stellten darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen der pränatalen BPA-Exposition und späterem Übergewicht her (47). Des Weiteren konnte auch im Rahmen einer Querschnittsstudie der National Institutes of Health („NIH“) in den USA ein signifikanter Zusammenhang mit erhöhten BPA-Spiegeln und Übergewicht hergestellt werden (48). Zudem hat BPA im Mausmodell die Fähigkeit zu einer Intoleranz gegenüber Glukose und einer Insulinresistenz zu führen (49). In einer koreanischen Studie mit Kassiererinnen war ein erhöhter BPA-Urinspiegel mit einem erhöhten Nüchtern-Insulinwert und Insulinresistenz assoziiert (50). Weitere metabolische Auswirkungen verbunden mit einem erhöhten BPA-Gehalt im Urin sind ein höherer Nüchternglukose-Wert sowie HbA_{1C}-Wert und eine konsekutiv steigende Inzidenz höherer BPA-Urinspiegel bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus (51, 52). Außerdem zeigen zusätzliche Studien, dass BPA durch seine Wirkweise als Xenoöstrogen über Steroidrezeptoren

wie beispielsweise Androgen- oder Östrogenrezeptoren mit der Karzinogenese von Brust- und Prostatakrebs in Verbindung steht (53, 54). Durch Bindung an die jeweiligen Androgen- oder Östrogenrezeptoren resultiert eine vermehrte Proliferation von Prostatazellen sowie auch eine epigenetische Beeinflussung der Karzinogenese und des Verlaufs von Mammakarzinomen (55). In einer Studie von Pollock et al. zeigte sich im Tiermodell an weiblichen Ratten nach oraler Gabe von niedrig dosiertem radioaktiv markierten BPA eine vermehrte Anreicherung vor allem im Bereich des Uterus. Vorherige Gabe des Östrogenrezeptorantagonisten Fulvestrant führte zu einer signifikant geringeren gemessenen Radioaktivität in ebendiesem Organ. In einem Versuch mit weiblichen Mäusen, in denen diese 1, 7 oder 28 Gaben von 50 µg BPA pro kg Körpergewicht erhielten, wurden als Folge der höheren Gesamtdosis und repetitiven Gabe signifikant erhöhte Radioaktivitätswerte im Bereich des Uterus, der Leber und Nieren mittels Gaschromatografie und Massenspektroskopie gemessen (56). Darüber hinaus wird, wie oben bereits angedeutet, BPA unter anderem ein Einfluss auf zahlreiche Wirkmechanismen im Rahmen der Entstehung von Brust-, Eierstock-, Prostata-, Gebärmutterhals- und Lungenkrebs zugesprochen (57, 58).

Dass die gut fettlösliche Form von BPA plazentagängig ist, sowohl in Richtung von Mutter zum Ungeborenen hin als auch umgekehrt in Richtung der Mutter, zeigte sich in einer wissenschaftlichen Arbeit von Corbel et al. Es wurde zudem festgestellt, dass der Metabolit BPA-Glucuronid („BPA-G“) eine eingeschränkt plazentare Permeabilität besitzt, was wiederum dazu führt, dass der Fetus diesem Stoff durch eingeschränkte Möglichkeiten der Abgabe vermehrt ausgesetzt ist (59). Aus pneumonologischer Sicht ist ein erhöhter BPA-Spiegel im Urin signifikant mit einer schlechten Lungenfunktion assoziiert (60). Außerdem ist ein hoher BPA-Spiegel im Serum mit dem obstruktiven Schlafapnoe-Syndrom („OSAS“) zu verknüpfen (61). Kinder mit Asthma bronchiale wiesen in einer Studie von Youssef et al. ebenfalls erhöhte BPA-Spiegel im Urin im Vergleich zur nicht an einer obstruktiven Lungenerkrankungen leidenden Kontrollgruppe auf (62).

Es bestehen überdies Assoziationen zwischen erhöhten BPA-Spiegeln im Urin und im Serum erhöhten Leberenzymen (63, 64). Nierenfunktionseinschränkung und Albuminurie konnten auch mit erhöhten Urin-BPA-Spiegel in Verbindung gebracht werden (65).

Neben nicht-genomischen Effekten von BPA zeigten Sheng et al. im Jahr 2018 auf, dass BPA über G-Protein gekoppelte Östrogenrezeptoren 1 und Integrin avß3 Einfluss auf die männliche Keimzellproliferation und Transkription im Bereich der Schilddrüse nimmt (66). Darüber hinaus gehen erhöhte Serumspiegel von BPA mit Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse assoziiert einher (67). Auf molekularbiologischer Ebene blockiert BPA außerdem

spannungsabhängige Calciumkanäle, ermittelt anhand von elektrophysiologischen Messungen durch L-, N-, P/Q- und T-Typ-Calciumkanälen in neuroendokrinen GH(3)-Zellen von Ratten, murinen Nervenwurzelzellen und Neuronen sowie auch Kardiomyozyten. Aber auch in humanen, embryonalen Nierenzellen interagierte BPA im Bereich der R-Typ Calciumkanäle auf molekularer Ebene (68). Eine molekularbiologische Studie konnte nachweisen, dass BPA an Ras- und schwächer auch an Rhab-Proteine bindet und im Rahmen des G-Protein-Signalwegs der Zelle um eine Bindung konkurriert und diesen sowie den K-Ras-Signalweg dadurch beeinflusst (69). Außerdem stehen hohe BPA-Spiegel in signifikantem Zusammenhang zur peripheren arteriellen Verschlusskrankheit („pAVK“) und Gefäßsklerosierungen im Bereich der Herzkrankgefäß (70-72).

Im Rahmen der Wirkweise als endokriner Disruptor wird die reproduktionstoxische Wirkung von BPA häufig in den Mittelpunkt der wissenschaftlichen sowie politischen Debatte gestellt. Im Mausversuch ist es Karmakar et al. 2017 gelungen zu zeigen, dass BPA die Keimzellproliferation im Hoden hemmt, Apoptose-induzierend auf Spermatogonien wirkt und die Meiose dieser dementsprechend negativ beeinflusst (73).

Eine weitere Wirkung von BPA bezüglich der Beeinflussung der Fertilität ist die auf das Hormonprofil und die Geschlechtsorgane der männlichen Wistar-Ratte. Es führte bei dieser im Rahmen von experimentellen Studien abhängig vom Alter und vom Entwicklungsstadium zu einem verzögerten Wachstum der Gonaden, Unterbrechung der Blut-Hoden-Schranke und erhöhtem Gewicht der Prostata. Beobachtet wurde darüber hinaus ein verringertes Gewicht der Hoden, geringere Serum- und Hodentestosteronspiegel sowie eine verminderte Samenzellqualität, -motilität und -anzahl (74-76).

Übertragen auf die Spermienqualität und -anzahl sowie das Hormonprofil des Menschen zeigte sich, dass bei Männern, die BPA ausgesetzt waren, ein erhöhtes Risiko für eine reduzierte Spermienqualität im Vergleich zu Männern, die BPA nicht in diesem hohen Maße ausgesetzt waren, bestand. Es wurde zudem eine signifikant geringere Spermienanzahl, -motilität und -konzentration bei erhöhtem BPA-Gehalt im Urin ermittelt (77). Lassen et al. konnten in ihrer Untersuchung von 308 BPA-Urinkonzentrationen ähnliche Ergebnisse bezüglich des Hormonhaushalts und der Spermienmotilität ermitteln, nicht jedoch der weiteren Parameter für Spermienqualität (78). In einer Studie von Den Hond et al. aus dem Jahr 2015 korrelierten hohe BPA-Spiegel im männlichen Samen und Plasma ferner mit einem erhöhten Risiko für Unfruchtbarkeit (79). Wisniewski et al. zeigten 2017 in einer Studie bezüglich des Einflusses von BPA auf die Spermienqualität der Wistar-Ratte zusätzlich, dass BPA die Spermienproduktion reduziert und darüber hinaus die gespeicherte Spermienzahl und den

Spermienumsatz vermindert (42). Die Studie beschreibt einen signifikanten Akrosomen- und Plasmamembranschaden der Spermatozoen mit konsekutiv reduzierter mitochondrialer Aktivität und herabgesetzter Spermienfunktion. Außerdem wird dargelegt, dass eine BPA-Exposition zu niedrigeren Serum-Testosteronspiegeln, sowie zu erhöhten Spiegeln von LH, FSH und Östradiol im Vergleich zur Kontrollgruppe führte. Die Hormonachse von Hypothalamus, Hypophyse und Hoden ist in der Studie durch Beeinflussung der Genexpression durch BPA im Sinne eines Anstiegs der Expression des Gonadotropin Releasing Hormone-Rezeptors („GnRH“), des Luteinisierenden Hormons Beta („LH“), des Follikel-stimulierenden Hormons Beta („FSHb“), des Östrogen-Rezeptors Beta („Esr2“) und des Androgen-Rezeptors („Ar“) in der Hypophyse beobachtet worden. Zusätzlich wurde eine Verminderung der Transkription der Östrogenrezeptoren vom Typ „Alpha“ („Esr1“) im Hypothalamus beobachtet (42).

Metwally et al. publizierten 2018 eine Studie, welche postuliert, dass BPA bei Kindern mit tiefgreifender Entwicklungsstörung im Sinne einer autistischen Störung durch oxidativen Stress zu einer Einschränkung der mitochondrialen Funktion führt, welche sich dann wiederum auf das Verhalten der Kinder auswirken könnte (80). Bei Kindern mit einem Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom („ADHS“) stellten Li et al. in einer 2018 veröffentlichten Arbeit dar, dass BPA-Urinspiegel in diesem Kollektiv höher waren als in der Kontrollgruppe (81).

Wie bereits zuvor erwähnt, ist BPA auch in Zahnfüllungen und -versiegelungen enthalten. Eine experimentelle Studie zeigte, dass bei Umspülung dieser mit Speichel der Gehalt an BPA in diesem signifikant ansteigt (82), der Einfluss auf die menschliche Gesundheit wird von den Autoren hingegen als gering eingestuft (83).

Hinblickend auf die Wirkung von BPA auf die Struktur und die Stabilität des Knochens bestehen verschiedene und teils gegensätzliche Studien. In einer 2018 publizierten Studie von Chin et al. betonen die Autoren die östrogene, antiandrogene und oxidative Wirkung von BPA. Sie zeigen die Heterogenität der aktuellen Studienergebnisse auf und beschreiben, dass im Rattenmodell BPA *in vitro* die Osteoklastenanordnung hemmen und die Apoptose von Osteoblasten und -klasten induziert. Dies findet molekularbiologisch über die Hemmung der Differenzierung von Proosteoblasten und Proosteoklasten in reife Osteoblasten und Osteoklasten statt. *In vivo* führte BPA dazu, dass die Knochendichte männlicher Rattenfemora prä- und postnatal zunahm und bei weiblichen Ratten die mechanische Festigkeit abnahm. Zudem hat BPA zum Verlust von trabekulären Strukturen der ovariekтомierten Ratten geführt. Bei Aromatase-Knockout-Mäusen kam es zu einer Zunahme der Knochendichte sowie auch

trabekulärer Knochenstrukturen. Bisphenol-A-Diglycidylether („BADGE“), ein Derivat von BPA, führte dagegen bei weiblichen und männlichen Ratten zu einer Zunahme der trabekulären Mikroarchitektur des Knochens und zu einer erhöhten Knochendichte bei weiblichen Ratten (84). Eine Studie von Li et al. kam zu dem Ergebnis, dass BADGE die Knochenqualität am Tiermodell der Ratte verbessert und bei nicht ovariekтомierten Ratten osteoinduktiv wirkt. Bei ovariekтомierten Ratten war kein signifikanter Knochenaufbau zu verzeichnen (85).

Der molekulare Wirkmechanismus für die Abnahme der Knochendichte tritt laut einer 2018 publizierten Studie von Thent et al. über die Bindung von BPA an die Östrogen-abhängigen Rezeptoren vom Typ Gamma in Kraft. Durch diese Bindung wird die Bildung von Bone Morphogenic Protein 2 („BMP-2“) sowie die Alkalische Phosphatase-Aktivität reduziert. Zudem unterbricht BPA den Knochenstoffwechsel über den Rezeptor Activator of NF-κB-Ligand („RANKL“), die Apoptose und den Wnt/Beta-Catenin Signalweg (86). Die Autoren beschreiben zudem einen Verlust an Knochenmasse sowie verminderte Calcium-Plasmaspiegel und eine Inhibition der Calcitoninsekretion durch BPA.

In einer 2016 von Lejonklou publizierten Studie konnte im Rahmen eines in vitro-Experiments mit Osteoblasten- und Osteoklastenkultursystemen ebenfalls gezeigt werden, dass BPA die Apoptose der beiden Zellgruppen stimuliert und darüber hinaus auch die Differenzierung dieser hemmt (87).

In einer koreanischen Studie, in der der BPA-Gehalt sowie die Knochendichte postmenopausaler Frauen mit Osteoporose zwischen 50 und 82 Jahren ermittelt wurde und das mittlere Alter bei 64,5 Jahren lag, zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen Knochendichte und BPA-Gehalt (88). In diese Studie sind 51 Frauen einbezogen worden. Eine weitere Studie mit 246 prä- und postmenopausalen chinesischen Frauen mit einem Durchschnittsalter von 35,2 Jahren konnten ebenfalls keine Zusammenhänge zwischen BPA-Gehalt im Urin sowie Knochendichte, Serumöstrogenspiegel, Körperfettanteil und Leptinspiegel nach Hinzunahme und Anpassung hinsichtlich des Body Mass Indexes („BMI“) hergestellt werden. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass, obgleich erhöhte BPA-Werte im Urin mit einem höheren Körperfettanteil und Leptinwerten einhergehen, dies keinen Effekt auf die Knochendichte prämenopausaler gesunder Frauen ohne Risikofaktoren für Osteoporose hat (89). Ein statistisch signifikanter Zusammenhang bezüglich des Serum-BPA-Spiegels und dem Knochenstoffwechsel, gemessen anhand von unter anderem Osteokalzin, Alkalischer Phosphatase und Kollagen-Crosslinks postmenopausaler Frauen, konnten Kim et al. in ihrer klinischen Studie nicht herstellen (88). Zhao et al. legten in einer 2012 publizierten Studie

zusätzlich dar, dass BPA keinen Einfluss auf die Knochendichte prämenopausaler und normalgewichtiger Frauen hat (89).

1.2 Knochengewebe

Das Körpergewicht des normalgewichtigen Menschen ist zu circa 10 % durch Knochengewebe bedingt (90). Das knöcherne Skelett des Menschen übernimmt wichtige Stütz- und Haltefunktionen, zudem schützt es sensible Gewebe wie das Rückenmark, Blutgefäße, neurologische Strukturen und Organe wie unter anderem das Gehirn oder das Herz. Es stellt zusammen mit weiteren bindegewebigen Strukturen wie Knorpel, Bändern und Sehnen den sogenannten passiven Bewegungsapparat dar, dem der aktive Bewegungsapparat, bestehend aus Muskeln, gegenübersteht. Letzterer sorgt für eine Bewegung in den Gelenken oder gelenkartigen Verbindungen, die aus mindestens zwei verschiedenen miteinander kommunizierenden Knochen bestehen. Darüber hinaus übernimmt das rote Knochenmark der langen Röhrenknochen beim Erwachsenen die Funktion der Blutbildung. Das Knochengewebe selbst dient zudem als größtes Calciumreservoir des Körpers und speichert zusätzlich auch Phosphat. Makroskopisch setzt sich der Knochen aus der außen befindlichen Knochenhaut, dem Periost, sowie den darunter liegenden Schichten gebildet durch Substantia compacta, Substantia spongiosa und Endost zusammen. Das Endost umschließt bei langen Röhrenknochen den Markraum, also die innere Knochenoberfläche, der wiederum das rote blutbildende und das gelbe fettspeichernde Knochenmark enthält. Es repräsentiert eine feine von Knochenzellen umgebene Schicht aus Kollagen.

Das Periost besteht aus zwei Schichten. Auf der einen Seite liegt das äußere aus Bindegewebe bestehende Stratum fibrosum, welches durch sogenannte Sharpey-Fasern mit dem Knochen in Verbindung steht, und auf der anderen Seite das Stratum osteogenicum. Letzteres liegt innen und enthält Nervenfasern und Gefäße sowie verschiedene zelluläre Knochenstrukturen.

Untergliedert werden lange Röhrenknochen im Bereich der proximalen und distalen Enden in die Epiphysen, an welche sich jeweils zur Mitte des Knochens hin die Metaphysen anlagern. Der mittig gelegene Schaft wird als Diaphyse bezeichnet. Außen angelagerte Apophysen stellen Knochenvorsprünge dar, die als Ursprung und Ansatz von Muskeln beziehungsweise Sehnen und Bändern dienen. Bei noch wachsendem Skelett befindet sich zusätzlich im Epiphysenbereich die Epiphysen- oder Wachstumsfuge, dem Ort des enchondralen Längenwachstums.

Mikroskopisch und molekularbiologisch besteht der Knochen aus einer organischen und anorganischen extrazellulären Matrix. Der organische Anteil besteht vorrangig aus Typ I Kollagen, Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen. Dieser Anteil wird außerdem als Osteoid bezeichnet und stellt zu circa einem Drittel den organischen Anteil dar.

Die zwei Drittel der anorganischen Grundsubstanz bestehen zu 95 % aus Hydroxylapatit, welches wiederum aus Calciumphosphatsalzen aufgebaut ist und sich an die durch das Kollagen gebildeten Fibrillen anlagert und der Knochensubstanz die Stabilität verleiht. Darüber hinaus enthält die extrazelluläre Matrix Ionen wie Magnesium und Fluorid.

Die zelluläre Matrix des Knochens kann neben mesenchymalen Stammzellen durch vier unterschiedliche Zelltypen beschrieben werden. Zum einen kommen zeitlebens in Peri- und Endost die sogenannten Osteoprogenitorzellen vor, die die Fähigkeit besitzen sich bei noch nicht bestehender Differenzierung zu Osteoblasten zu entwickeln. Embryologisch gehen diese Zellen aus dem Mesenchym hervor.

Osteoblasten, welche im Bereich der freien äußeren und inneren Knochenoberfläche des Peri- und Endosts angesiedelt sind, sind in der Lage Osteoid zu synthetisieren und fügen dies schon produzierter mineralisierter organischer Grundsubstanz schichtweise hinzu. Dieser Mineralisationsprozess wird zusätzlich durch sie neben der Regulation des Umbaus von Knochengewebe und der Kommunikation mit Osteoklasten reguliert. Der genaue Entstehungsprozess der Osteoidsynthese und Mineralisation ist noch nicht in Gänze nachvollzogen. Fest steht bislang, dass durch die Osteoblasten enzymgefüllte Vesikel, welche unter anderem Alkalische Phosphatase beinhalten, im Bereich der extrazellulären Matrix durch ihren Inhalt vor Ort den Phosphat- und Pyrophosphatanteil erhöhen. Zudem enthalten diese Vesikel Moleküle, die Calcium binden und der Kristallisation dienen. So entstehen innerhalb der Vesikel aus Hydroxylapatit bestehende Kristallformationen, welche bei zunehmender Größe die Vesikelmembran perforieren, wodurch es wiederum zu einer Freisetzung in den extrazellulären Raum kommt. Dort findet dann die Anlagerung der Hydroxylapatit-Kristalle an bestehende Kollagenfibrillen statt, auf die zuvor bereits Bezug genommen wurde.

Ist ein Osteoblast umringt von Osteoidstrukturen und nicht mehr im Bereich der freien Knochenoberfläche gilt er per definitionem als Osteozyt. Diese Osteozyten interagieren mit umliegender Knochensubstanz. Bei Abwesenheit der Osteozyten wird die um diese angeordnete aus Knochengewebe bestehende Matrix durch Osteoklasten abgebaut. Daraus wird der Schluss gezogen, dass sie eine zentrale Aufgabe im Rahmen von Umbauprozessen im Knochen besitzen. Eine Interaktion, sowie ein Stoffaustausch unter anderem mit Ionen wird

zwischen Osteoblasten und -zyten über sie verbindende Gap junctions in Canaliculi osseae im Bereich der Lacunae osseae bewerkstelligt.

Als vierte Zellgruppe sind die Osteoklasten aufzuführen. Sie sind mehrkernige Riesenzellen und entstehen im Knochenmark durch Verschmelzung mehrerer mononukleärer Zellen. Ihre Hauptaufgabe stellt der Abbau und Umbau von Knochen dar. Sie liegen disseminiert im Knochen in sogenannten Howship-Lakunen und Bone Multicellular Units vor.

Der Knochen durchläuft im Rahmen der Heilung von Frakturen und der embryonalen Entstehung in Bezug auf die Struktur zwei verschiedene Differenzierungsgrade: den primären Knochen oder auch Geflecktknochen und den sekundären Knochen oder auch Lamellenknochen. Der Geflecktknochen ist lockerer und weniger organisiert angeordnet, besitzt ein niedrigeres Reifestadium mit einem höheren Wasseranteil und geringerem Anteil mineralisierten Knochens. Der Faserverlauf der Kollagenfasern folgt keinem geordneten Schema. Er beinhaltet zahlreiche Zellen und entsteht im Rahmen der desmalen und enchondralen Ossifikation sowie bei der Embryogenese. Es erfolgt nach und nach der Umbau zu Lamellenknochen zugunsten seiner Stabilität. Diese Stabilität ist bei gleicher Grundsubstanz wie der des Geflecktknochens vor allem durch die Organisation dieser bedingt. Nach Umbau des Geflecktknochens entsteht der Lamellenknochen und liegt zum einen als Substantia spongiosa und zum anderen als Substantia compacta vor. Erstere Bestandsform ist eine Formation mit schwammartiger Anordnung dünner Bälkchen des Knochens, den sogenannten Trabekeln. Die Ausrichtung dieser erfolgt abhängig von der jeweiligen Zug- und Druckbelastung (trajektorielle Ausrichtung) und die einzelnen Lamellen des Knochens sind parallel zur Oberfläche dieser Trabekel angeordnet. Zwischen der spongiösen Knochenstruktur liegt im Inneren des Knochens das rote und gelbe Knochenmark. Die Lamellen der Substantia compacta sind konzentrisch um einen mittig gelegenen und Blutgefäße enthaltenden Havers-Kanal als sogenannte Osteone angeordnet, nach außen schließt sich die Linea cementalis als Begrenzung an.

Neben den Osteonen unterscheidet man die Schaltlamellen, die die Osteone separieren und die Rückstände von zum Teil abgebauten Osteonen darstellen, und Generallamellen, welche durch eine singuläre oder mehrere Schichten an Lamellen die Grenze der Substantia compacta nach innen und außen repräsentieren. Über Foramina nutricia erfolgt die Blutversorgung über die Vasa nutricia. Im Bereich des Knocheninneren liegen die Blutgefäße in den bereits beschriebenen Havers- oder aber in den orthogonal zu diesen verlaufenden sogenannten Volkmann-Kanälen („Canales perforantes“).

Vitaler Knochen unterliegt einem ständigen Gleich- oder Ungleichgewicht des Abbaus und des Aufbaus, der Ossifikation. Diese Ossifikation findet einerseits bei der bereits erwähnten Transformation von Geflecht- zu Lamellenknochen statt und andererseits bei der initialen Synthese von primärem Geflechtknochen. Hierbei entsteht Knochengewebe entweder durch desmale oder chondrale Ossifikation.

Durch oben genannte Mechanismen der Ossifikation ist es dem Knochen möglich sich stets an ändernde Belastungen ideal anzupassen. Im Rahmen dieses Remodelingprozesses sorgen Osteoklasten für den Ab- und Osteoblasten für den Aufbau der Knochensubstanz. Umbauprozesse nehmen zumeist mehrere Monate in Anspruch, dieser Zeitraum überschreitet die Lebensdauer der einzelnen beteiligten Zellen deutlich.

Die Basic Multicellular Units („BMU“), welche eine Osteoklastenformation darstellen, bauen im Bereich der Substantia compacta Knochen ab. In dem von ihnen geschaffenen Hohlraum sorgen im Anschluss Osteoblasten für den Wiederaufbau an Knochenmasse. Nach Einwachsen von Gefäß-Nerven-Bündeln in diesen Hohlraum folgt eine schichtweise Ablagerung von Osteoid als innere Auskleidung. Osteoblasten stehen dem Synzytium nach Einmauerung wie oben beschrieben als Osteozyten zur Verfügung. Nach kompletter Auffüllung des Spalts resultiert schlussendlich ein zentral liegender Havers-Kanal. Die letzte Schicht von sich nun nicht mehr im aktiven Zustand befindlichen Osteoblasten verkörpert das Endost.

Im Bereich der Substantia spongiosa erfolgt wie zuvor bereits angedeutet der Abbau des Knochens durch oberflächlich aufsitzende und diese Lakune abschließende Osteoklasten, die eine sogenannte Resorptionszone im Bereich der Howship-Lakune bildet und den Abbau durch osteolytische Enzyme ermöglicht. Es entsteht an diesem Ort durch aus Kohlensäure („ H_2CO_3 “) mittels einer Carboanhydrase abgespaltenen Protonen ein saures Milieu mit einem pH-Wert von etwa 4,5. Erst dadurch kommt es zur Lyse der anorganischen Matrix. Die weitere Aufspaltung erfolgt unter anderem über Cathepsin K und Matrix-Metallo-Proteinasen. Die einzelnen durch Zersetzung entstandenen Komponenten werden durch Endo- oder Transzytose abtransportiert. Der weitere Prozess verläuft wie im Bereich der Substantia compacta. Osteoblasten sorgen durch Bildung von Osteoid für die Neuentstehung der Knochenmatrix und stellen auch hier, wenn nicht als Osteozyten vollständig durch weitere Zellen umgeben, das Endost dar.

Diese Prozesse werden mechanisch und molekularbiologisch über verschiedene Mediatoren reguliert, da sich vitaler Knochen in einem steten Anpassungsprozess an aktuell durch Aktivität oder Inaktivität gegebene Anforderungen befindet. Eine wichtige Säule der Regulation stellt die mechanische Belastung des Knochens durch Druck-, Zug- und Torsionskräfte dar.

Diesbezüglich wird zurzeit davon ausgegangen, dass die Osteozyten als Sensoren für mechanische Beanspruchung dienen und so bei Mehrbeanspruchung als Mediator zur Induktion eines Knochenaufbaus dienen. Fehlt dieser Trigger, kommt es zum Ungleichgewicht des Knochenstoffwechsels zugunsten des Abbaus von Knochengewebe.

Weitere Säulen der Regulation des Knochenaufbaus und -abbaus stellen die Faktoren und Proteine Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B („RANK“), Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B-Ligand („RANKL“), Osteoprotegerin („OPG“) sowie der Makrophage Colony-Stimulating Factor („M-CSF“) dar. Aber auch Hormone wie das Parathormon („PTH“), Calcitriol und Sexualhormone regulieren endogen den Knochenmetabolismus. Bei den Sexualhormonen sind vor allem die Östrogene hervorzuheben. Sie beeinflussen den Knochen des menschlichen Organismus dahingehend, dass sie sowohl die Synthese der Osteoklasten als auch deren Induktion inhibieren. Zudem steigern sie die OPG-Synthese.

Ein weiterer Regulationsmechanismus ist die negative Rückkopplung über die Osteoklasten. RANKL ist auf den Osteoblastenmembranen lokalisiert und ermöglicht eine Interaktion mit RANK im Bereich der Zellmembran der Osteoklasten und deren Primordien. RANKL inhibiert den programmierten Zelltod von Osteoklasten und bewirkt eine Verschmelzung und Differenzierung zu aktivierte Osteoklasten. RANKL ist zudem im Bereich von Osteozyten lokalisiert und ist dort am ehesten Mediator im Rahmen des Umbaus und der Regulation von ebendiesem im Knochengewebe. Osteoblasten produzieren darüber hinaus das Protein Osteoprotegerin, das nach Abgabe aus diesen die Fähigkeit besitzt an RANKL zu binden und dessen vermittelte Wirkung zu inhibieren. Der Makrophage Colony-Stimulating Factor wird ebenfalls von Osteoblasten produziert und induziert das Wachstum von Vorläuferzellen der Osteoklasten. Im Rahmen des Abbauprozesses durch die Osteoklasten werden Wachstumsfaktoren freigesetzt, die zuvor in der Matrix des Knochens eingelagert waren und bei Freisetzung so durch negative Rückkopplung wiederum zur Aktivierung der Osteoblastenfunktion beitragen (90-92).

2. Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Dissertation war es herauszufinden, inwiefern BPA sich auf die Struktur, den Aufbau und die Belastbarkeit der Knochen der männlichen und weiblichen Wistar-Ratte auswirkt.

Dabei standen vor allem die Folgen eines chronischen Einflusses über Wochen und Monate sowie eine damit einhergehende Veränderung der Architektur und Belastbarkeit des Knochens im Mittelpunkt. Dies wurde zum einen durch bildgebende Diagnostik in Form von Mikro-Computertomografie-Untersuchungen und zum anderen durch biomechanische Untersuchungen der Femora der Ratten quantifiziert.

Durch die Wirkung von BPA als Xenoöstrogen lautete die Arbeitshypothese, dass es zu einer Modulation im Sinne einer Zunahme der Knochendichte und der trabekulären Knochenstruktur kommt. Dabei würde sich damit das Verhältnis von Knochengewebe zum Gesamtvolumen zugunsten des Knochengewebes verlagern. Der Abstand zwischen den einzelnen Trabekeln, die das Knochengerüst darstellen, würde dadurch geringer. Dies wäre bedingt durch eine höhere Anzahl an Trabekeln auf der einen Seite und eine höhere Dicke der Trabekel auf der anderen Seite.

Darüber hinaus war die Annahme, dass es durch diese Zunahme zu einem positiven Einfluss auf die Biomechanik des Knochens im Sinne einer höheren Stabilität kommen würde. Damit verbunden wäre unter anderem eine größere Kraft, die benötigt wird den Knochen im Rahmen der biomechanischen Testung zu Bruch zu bringen.

In den Kontrollgruppen erhielten die männlichen und weiblichen Ratten keinerlei BPA, sondern ausschließlich eine Kontrolllösung. Diese Lösung war Dimethylsulfoxid („DMSO“) und stellte zeitgleich in den Gruppen, denen BPA zugeführt wurde das Lösungsmittel für ebendieses BPA dar.

3. Materialien und Methoden

Im folgenden Abschnitt wird Bezug auf den experimentellen Aufbau dieser Arbeit sowie die statistische und experimentelle Methodik genommen.

3.1 Experimenteller Aufbau

Der experimentelle Aufbau dieser Arbeit bestand aus einem Tiermodell mit insgesamt 36 Ratten. Um eine gleiche und kontinuierliche Zufuhr des zu untersuchenden Agens BPA sowie der Kontrolllösung zu ermöglichen, wurde dieses mittels subkutan implantiert osmotischer Pumpen verabreicht. Der Nachuntersuchungszeitraum lag bei 12 Wochen. In diesem Zeitraum wurden die Versuchstiere zweimalig jeweils nach 4 und nach 8 Wochen zur Pumpenexplantation und erneuten -implantation operiert, um eine stetige Gabe zu gewährleisten. Mit dem dritten und letzten Eingriff 12 Wochen nach erstmaliger Implantation ging die Gewinnung der später untersuchten Femora einher. In diesem Rahmen erfolgte außerdem die ordnungsgemäße Euthanasie durch Vertiefung der Narkose und Genickbruch. Der Ablauf des Experiments wird durch Abbildung 2 verbildlicht. Die Gewebeproben der Knochen wurden in achtprozentiger Formaldehydlösung bei -18 °C tiefgefroren eingelagert. Es schlossen sich die Untersuchungen des Knochens durch µCT-Untersuchungen und Dreipunkt-Biegetest an.

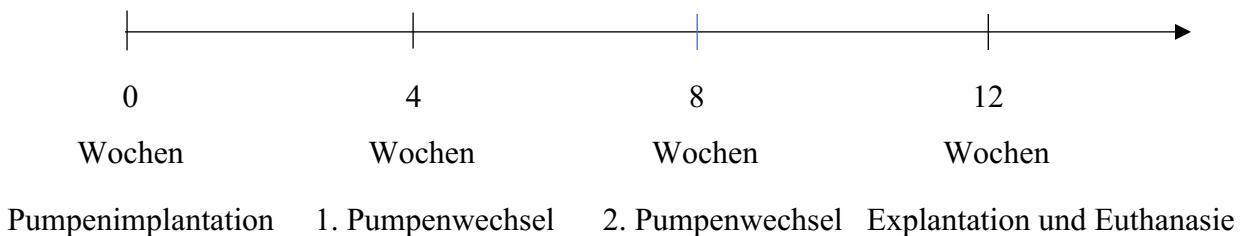


Abbildung 2: Zeitlicher Ablauf der experimentellen Versuchsreihe

3.1.1 Versuchstiere

Die im Tiermodell verwendeten Ratten gehörten allesamt der Rasse Wistar an. Es handelte sich dabei um männliche und weibliche Nagetiere, die bei Versuchsbeginn ein Alter von 10 bis 12 Wochen besaßen. Das Gewicht betrug zu diesem Zeitpunkt 250 bis 280 g. Die Ratten wurden von der „Charles River Laboratories Research Models and Services GmbH“ mit Niederlassung in Sulzfeld bezogen. Nach Versand und Entgegennahme der Tiere wurden sie zunächst für etwa 7 Tage mit einem Tag-Nachtrhythmus von jeweils 12 h im Wechsel bei einer konstanten Raumtemperatur von 22 °C und Luftfeuchtigkeit von 51 % in Einzellaborkäfigen in einem klimatisierten Raum gehalten.

Die insgesamt 36 Ratten wurden in ein männliches und ein weibliches Kollektiv unterteilt. In diesen Gruppen wurde dann die Gruppierung in Niedrigdosis-, Hochdosis- und Kontrollgruppe vorgenommen. Somit entstanden bei drei Gruppen pro Geschlecht sechs Gruppen insgesamt. Entsprechend der Gruppeneinteilung in Niedrigdosis, Hochdosis und Kontrollgruppen wurden der Niedrigdosisgruppe pro Ratte und Tag 2,55 µg BPA verabreicht. Die Hochdosisgruppe erhielt 39 µg BPA pro Ratte und Tag. Gelöst wurde das BPA im ubiquitär als Lösungsmittel verwendeten Dimethylsulfoxid („DMSO“). Der Kontrollgruppe wurde ausschließlich DMSO mittels osmotischer Pumpen verabreicht. Es erfolgte demnach keine Exposition gegenüber BPA.

Bei dem Versuchsvorhaben handelte es sich um eine spezifische pathogenfreie (SPF) Haltung. Den Ratten standen Trockenfutter und Wasser stets uneingeschränkt zur Verfügung, der Raum schützte vor Lärm und die Haltung wurde für die Tiere so stressfrei wie möglich umgesetzt. Die Haltung erfolgte in der Zentralen Versuchstierhaltung des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock. Die Vorgaben zur Versuchstierhaltung gemäß des Tierschutzgesetzes wurden eingehalten. Ein von der Genehmigungsbehörde des Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamtes Mecklenburg-Vorpommern genehmigter Tierschutzantrag (Aktenzeichen: 7221.3-1-055/16) war zum Zeitpunkt des Versuchsstarts vorliegend.

Die Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes war stets oberstes Gebot jeglichen Vorgehens bei der Arbeit mit den Tieren und es wurde sich prä-, peri- und postoperativ strikt an die Vorgaben gehalten.

Sämtliche Arbeiten im Institut für experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock fanden unter Berücksichtigung und Anwendung der rechtlichen Anforderungen (ArbSchG, JuSchG, MuSchG, ArbStättV, BetrSichV, GefStoffV) inklusive der geltenden Laborrichtlinien

sowie der innerbetrieblichen Vorschriften (Hausordnung, Brandschutzordnung, Information zur Brandschutzordnung, interner Alarmierungsplan und Betriebsanweisungen) statt.

3.1.2 Osmotische Pumpen

Im oben genannten experimentellen Versuchsaufbau wurden osmotische Pumpen der Marke ALZET® (MODEL 2ML4; DURECT Corporation; Cupertino Kalifornien; USA) verwendet. Das äußere Erscheinungsbild der Pumpe ist in Abbildung 3 (93) auf der linken Seite zu erkennen. Rechts in der Abbildung ist ein grafisches Modell der Pumpe im Längsschnitt zu sehen.

Das zu verabreichende Agens wird nach Entfernung der weißen Kappe, die durch eine Hohlnadel mit dem restlichen Teil der osmotischen Pumpe verbunden ist, in die osmotische Pumpe injiziert. Nach Implantation in tierischem Gewebe entsteht ein osmotischer Druck auf die Pumpe durch Gewebsflüssigkeit, die von außen durch eine semipermeable Membran in das Innere der Pumpe dringt. Diese Flüssigkeit ist in Abbildung 3 durch eine blaue Färbung im äußeren Bereich der Pumpe gekennzeichnet. Der osmotische Druck führt dazu, dass das zuvor injizierte Agens durch die Hohlnadel Richtung der weißen Kappe der Pumpe nach außen, also in das Gewebe des Versuchstiers, gelangt. Das Agens ist in der Abbildung durch eine orangene Färbung markiert.

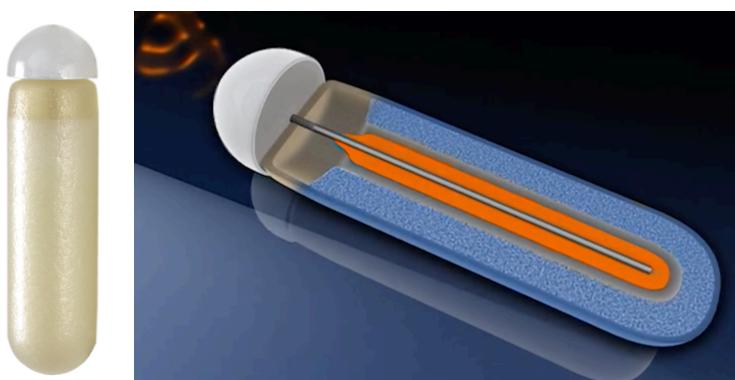


Abbildung 3: Osmotische Pumpe mit Übersichtsdarstellung des Wirkmechanismus; Quelle: DURECT Corporation

Die Pumpen hatten bei einer Länge von 5,1 cm und einem Durchmesser von 1,4 cm eine Pumprate von 2,5 µl/h mit einer Standardabweichung von ± 0,05 µl/h und konnten laut Herstellerangaben für 28 Tage am Stück mit zuverlässiger Pumprate belassen werden. Daraus ergab sich bei einem Reservoirvolumen von insgesamt 2000 µl ein Füllzustand bei Wechsel der Pumpen von circa 320 µl. Die äußere Membran des Implantats bestand aus einem

Zelluloseester, das Agens enthaltende Reservoir aus einem thermoplastischen Hydrocarbon-Polymer.

Die Pumpen waren durch den Hersteller vor Versand einer sterilisierenden Bestrahlung mittels Cobalt-60 ausgesetzt. Vor Implantation wurden diese bei Raumtemperatur gelagert und gemäß Anwendungshinweis bei 37°C in steriler und isotoner Kochsalzlösung eingelegt. Ein seitens des Herstellers der Pumpen empfohlenes Mindestgewicht der Ratten von 150 g pro Tier wurde eingehalten.

3.1.3 Implantation und Wechsel der osmotischen Pumpen

Die osmotischen Pumpen dienten, wie bereits oben beschrieben, der kontinuierlichen Applikation von BPA beziehungsweise der Kontrolllösung DMSO. DMSO wirkt sich auch in hohen Dosen laut aktueller Studienlage nicht auf den Knochen der Ratte und findet aufgrund der generell guten Verträglichkeit häufig Anwendung in experimentellen Studien mit Ratten (94, 95).



Abbildung 4: Lagerung der Versuchstiere während der Eingriffe; Bauchlagerung mit Rasur (links), Schnitt am zervikothorakalen Übergang (Mitte) und Verschluss des operativen Zugangs nach Implantation/Wechsel der Pumpe (rechts)

Der Ablauf der Implantation sowie die Lagerung wird in Abbildung 4 verdeutlicht. Die Ratten wurden zur Durchführung des Eingriffs mittels intraperitonealer Injektion von Ketaminhydrochlorid 10% (Ketamin, Bela-Pharm, Vechta; Deutschland) und Xylazinhydrochlorid 2% (Rompun®, Bayer Vital, Leverkusen; Deutschland) suffizient narkotisiert. Dabei wurden 100 mg Ketamin pro kg Körpergewicht und 5 mg Xylazin pro kg Körpergewicht verabreicht. Die Lagerung erfolgte perioperativ mit Zuhilfenahme von weißem

Pflasterstreifen zur Fixierung der Extremitäten (Leukosilk®, BSN medical, Hamburg; Deutschland) auf einer zuvor auf Körpertemperatur der Ratte erwärmten Heizplatte (Klaus Effenberger, Medizinische Geräte, Pfaffing; Deutschland). Für 5 Tage nach Implantation oder Wechsel der Pumpen erhielten die Versuchstiere über das Trinkwasser eine orale Analgesie durch Zusatz Metamizol (Novaminsulfon-ratiopharm®, Ratiopharm, Ulm; Deutschland). Die Dosierung lag hier bei 100 mg Metamizol pro kg Körpergewicht.



Abbildung 5: Implantation einer osmotischen Pumpe

Vor dem Hautschnitt von 2 cm mit Hilfe eines Skalpells (Präzisa plus, P.J. Dahlhausen & Co., Köln; Deutschland) erfolgte die Rasur eines 3x3 cm bemessenden Areals im Bereich zwischen beiden Margo mediales skapulae sowie die sich an die Rasur anschließende Desinfektion mittels Povidon-Iod-Lösung (Betaisodona®, Mundipharma GmbH, Frankfurt am Main; Deutschland). Danach wurde mit Zuhilfenahme einer Präparierschere im subkutanen Gewebe stumpf eine Tasche freipräpariert, in welcher unter sorgsamer Schonung des umliegenden Gewebes die osmotische Pumpe epifaszial gemäß Anwendungshinweis zu liegen kam (siehe Abbildung 5). Es erfolgte ein intrakutaner Wundverschluss (Vicryl® 3-0, Johnson & Johnson, St-Stevens-Woluwe; Belgien) mit erneuter und abschließender Desinfektion der Wundränder mit der oben genannten Povidon-Iod-Lösung. Die Lagerung erfolgte bei allen Eingriffen auf einer Wärmeplatte, die die Körpertemperatur der Ratte konstant hielt. Im Rahmen der Pumpenwechsel war in keinem Fall eine Erweiterung des Hautschnitts vonnöten, da die Entfernung der jeweiligen Pumpe nach Freipräparation dieser stets problemlos über die bestehende Narbe erfolgen konnte. Die Eingriffe erforderten jeweils nur wenige Minuten. Das Erwachen fand unter kontrollierten Bedingungen statt.

Der postoperative Zustand der Tiere wurde am Operationstag mehrfach überprüft und es wurde darauf geachtet, dass es in den darauffolgenden Tagen nicht zu einer Dehiszenz oder anderen Auffälligkeiten im Bereich der Wunde am Rücken der Ratten kam. Nach 12 Wochen erfolgte die letzte Operation, in der nach Euthanasie der Ratte durch Vertiefen der Narkose und iatrogenes Brechen des Genicks das Knochengewebe in Form der Rattenfemora asserviert wurde. Es schlossen sich die Präparation der Femora an, welche daraufhin in unter 3.1 genannten Bedingungen vor den sich anschließenden Untersuchungen gelagert wurden.

3.2 Untersuchungsmethoden

Das durch die letzte Operation der Versuchstiere gewonnene Knochengewebe wurde in Kooperation mit der Deutschen Sporthochschule Köln biomechanisch und mittels Mikro-Computertomografie untersucht.

3.2.1 Mikro-Computertomografie

Zur Evaluation der Beschaffenheit, Dichte und Struktur von Knochen eignen sich zahlreiche bildgebende Verfahren mit unterschiedlich starker Aussagekraft.

Für die Beurteilung der kortikalen und trabekulären Knochenstruktur waren vor wenigen Jahren noch histologische Untersuchungen von Knochengewebe die Methode mit der meisten Aussagekraft vor allem in Bezug auf die Mikroarchitektur des Knochens. Im Bereich der Untersuchung und Beurteilung von Nagerknochen, insbesondere von Mäusen und Ratten, hat sich mittlerweile die Mikro-Computertomografie (Mikro-CT oder μ CT) durchgesetzt. Layton (1988) sowie Feldkamp et al. (1989), beschrieben erstmals in den 1980er Jahren den Einsatz der Mikro-CT-Untersuchungen, wobei Layton die Anwendung im tierexperimentellen Modell mit der Beurteilung der subchondralen Knochenstrukturen von Meerschweinchen mit Arthritis beschreibt (96, 97). Durch sie gelang es, Aussagen über die Morphologie des Knochens, abhängig vom jeweiligen Gerät, im einstelligen Mikrometerbereich zu treffen. Es gelang dabei die Visualisierung kortikaler und spongiöser Knochenanteile.

Als sogenannte Schnittbildgebung war es dann möglich aus zuvor mit Hilfe von Röntgenstrahlen planaren 2D-Bildern ein 3D-Modell herauszurechnen. Das zu untersuchende Objekt wird im Rahmen der Tomografie durch Rotation in zahlreichen Winkeln abgebildet und die so gewonnenen Daten werden dann zur 3D-Rekonstruktion herangezogen. Dabei ist der physikalische Aufbau mit einem Generator, von dem die Röntgenstrahlen ausgehen, und einem

Detektor, auf den diese ausgesandten Strahlen treffen, dem der in der Humanmedizin eingesetzten Computertomografen sehr ähnlich. Ein Unterschied jedoch ist, bedingt durch die isotrope Voxelgröße von wenigen Mikrometern beim Mikro-CT, die um eine Vielfaches höhere Auflösung.

Damit stellt die Mikro-Computertomografie eine elegante Methode dar Knochenstrukturen in hoher Auflösung darzustellen, wobei die Methode das Untersuchungsobjekt nicht beschädigt und beliebig oft wiederholt werden kann.

Um die Struktur der Rattenfemora bestmöglich zu bewerten und einen möglichen Einfluss von BPA auf den Knochen zu ermitteln, wurden diese bildmorphologisch mittels Mikro-CT-Untersuchungen bewertet. Die Darstellung erfolgt wie zuvor beschrieben durch Röntgenstrahlung als Schnittbildgebung und 3D-Rekonstruktion.

Dafür wurde ein hochauflösendes Mikro-CT-Gerät (μ CT 35, Scanco Medical AG, Brüttisellen; Schweiz) verwendet. Nach initial sorgfältiger Entfernung der den Knochen umgebenden Weichteile erfolgte die Untersuchung in vorgefertigten Röhren gefüllt mit 70% Ethanol. Das Gerät bot die Möglichkeit der hohen Auflösung der knöchernen Strukturen und es war möglich bis zu 8 Proben gleichzeitig pro Untersuchungseinheit zu untersuchen.

Die isolierten Knochen wurden mit einer isotropen Voxelgröße von 12x12x12 μm (Weibchen) bzw. 20x20x20 μm (Männchen) unter Verwendung einer Röhrenspannung von 70 kVp, eines Röhrenstroms von 114 μA und einer Integrationszeit von 400 ms gescannt. Das Bildrauschen wurde reduziert, indem die Graustufen-Daten der gemessenen CT-Bilder unter Verwendung eines 3D-Gauß-Filters beziehungsweise eines Algorithmus bearbeitet und durch Abtrennung des mineralisierten Gewebes vom Weichtalgewebe durch ein globales Schwellenwertverfahren entfernt wurden. Die Segmentierungsschritte wurden mit den Einstellungen „support = 1“, „sigma = 0,8“ angewendet. Dabei handelt es sich bei „sigma“ definitionsgemäß um ein Maß für die Breite der Gaußglocke, die für den 3D-Filter verwendet wird. Der Parameter „support“ gibt an, wieviele benachbarte Voxel in die Berechnung mit einbezogen werden (98). Die strukturellen Parameter des trabekulären Knochens wurden 2,5 mm unterhalb der Wachstumsfuge im Bereich der Metaphyse bestimmt. Hier wurden 1,5 mm (125 Schichten Threshold: 26 %) für die weiblichen Tiere und 1,5 mm (75 Schichten, Threshold: 26 %) für die männlichen Tiere ausgewertet. Die Struktur des kortikalen Knochens wurde an der Middiaphyse analysiert (weibliche Tiere: 0,76 mm = 63 Schichten, Threshold: 30 %; männliche Tiere: 0,76 mm = 38 Schichten, Threshold: 30 %). Die Middiaphyse verstand sich dabei als Mitte des untersuchten Knochens, von der nach proximal und distal jeweils 50% der Gesamtlänge des Knochens ausgingen.

Für den trabekulären Knochen wurden die folgenden Parameter bestimmt: Knochenvolumen im Verhältnis zum Weichteilgewebeanteil (Bone volume / Tissue volume, BV/TV, %); Anzahl der Trabekel (Trabecular Number, Tb.N, 1/mm); der Abstand zwischen den einzelnen Trabekel (Trabecular Separation, Tb.Sp, mm); die Trabekeldicke (Trabecular Thickness, Tb.Th, mm).

Für die Diaphyse wurden folgende Parameter analysiert: die Fläche des Gesamtgewebes (Tissue Area, Tt.Area, mm²), die Dicke der Kortikalis (Cortical Thickness, Ct.Th, mm), die Fläche der Kortikalis (Cortical Area, Ct.Area, mm²), die Fläche des Knochenmarks (Bone Marrow Area, mm²) und das Verhältnis von der kortikalen Fläche zur Gesamtgewebefläche (Ct.Ar/Tt.Ar, %).

Sämtliche Untersuchungen wurden auf dem Boden und unter Berücksichtigung der „Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography“ von Bouxsein et al. aus dem Jahre 2010 durchgeführt (99).

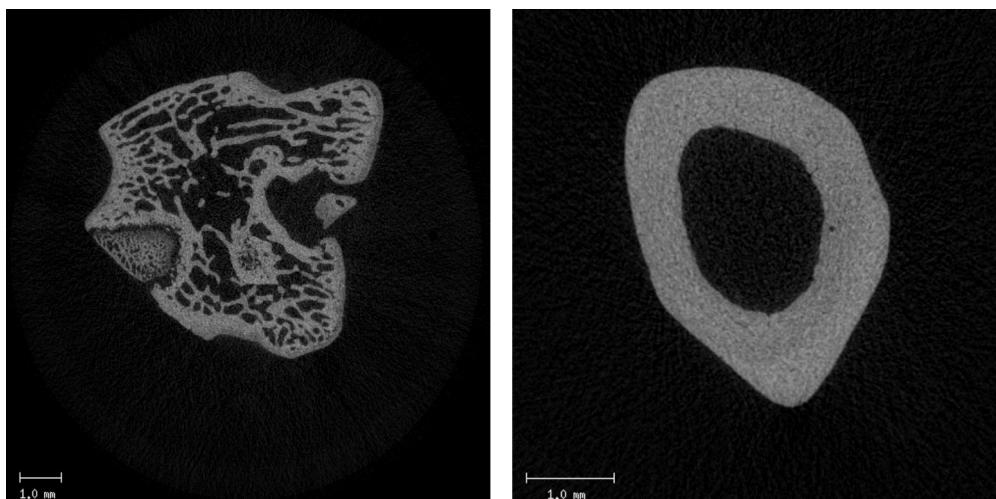


Abbildung 6: Darstellung von Mikro-CT-Aufnahmen der Rattenfemora

Die Abbildung Nummer 6 zeigt exemplarisch Schnitte aus der Untersuchung mittels Mikro-CT. Links im Bereich der Abbildung ist ein transversaler bzw. axialer Schnitt im Bereich der Metaphyse eines weiblichen Rattenfemurs zu erkennen. Die trabekuläre Struktur wird anhand dieser Grafik deutlich. Rechts zeigt die Abbildung ebenfalls das Femur einer weiblichen Ratte in einer transversalen Schicht, aber im Gegensatz zu dem linken Bild aus dem Bereich der Diaphyse des Röhrenknochens. Die Substantia compacta, die die äußere Rindenschicht des Knochens darstellt, ist gut vom zentral liegenden, schwarzen Markraum zu differenzieren. Bei der Ratte ist im Speziellen bei der Mikro-CT-Diagnostik auf die bei der Ratte für lange Zeit von 11 Monaten oder gar nicht schließende und im Vergleich zum menschlichen Körper stets

bestehende Wachstumsfuge zu beachten (100). Sie dienen als Referenzpunkt in der Analytik der Mikro-CT-Aufnahmen (101).

3.2.2 Biomechanische Untersuchungen

Zur Ermittlung der biomechanischen Eigenschaften wurde ein Dreipunkt-Biegetest mit Hilfe der Material-Prüfmaschine Z2.5/TN1S der Firma ZwickRoell (Ulm, Deutschland) durchgeführt (Abbildung 7, linkes Bild). Es wurde ein 2,5 kN Kraftsensor verwendet. Der Abstand der Auflagepunkte betrug 15 mm (weibliche Tiere) bzw. 20 mm (männliche Tiere). Der Durchmesser der Auflagepunkte bzw. des Stempels betrug 4 mm. Nach Aufbringen einer Vorkraft (1 mm/min) wurde die Probe in anterio-posteriorer Richtung mit 10 mm/min bis zum Bruch belastet (siehe Abbildung 7, rechtes Bild).

Folgende Parameter wurden aus der Kraft-Deformationskurve ermittelt: die maximale Kraft bei Bruch (Ultimate Force, N); die maximale Verformung (Ultimate Displacement, mm) sowie die Energieaufnahme bis zum Versagen (Energy, mJ) des Knochens und die Steifigkeit (Stiffness, N/mm). Die Steifigkeit wurde als Steigung im linearen Anteil der Kraft-Deformationskurve bestimmt. Um eine Spannungs-Dehnungs-Kurve zu berechnen, wurde mittels peripherer quantitativer Computertomografie (pQCT, XCT Research SA, Stratec Medizintechnik, Pforzheim; Deutschland) das Flächenmoment zweiten Grades (mm^4) ermittelt. Anschließend konnten folgende Parameter berechnet werden. Zum einen zählen dazu die Bruchspannung (Ultimate Stress, MPa) und zum anderen die Bruchdehnung (Ultimate Strain, %) sowie die Energiedichte (Energy Density, J/mm³). Der Elastizitätsmodul (Elastic Modulus, MPa) wurde als Steigung des linearen Anteils der Spannungs-Dehnungs-Kurve analysiert.

Die Auswertung des Dreipunkt-Biegetests erfolgte auf den Grundlagen Turner und Burr „Basic Biomechanical Measurement of Bone: A Tutorial“ aus dem Jahre 1993 (102).

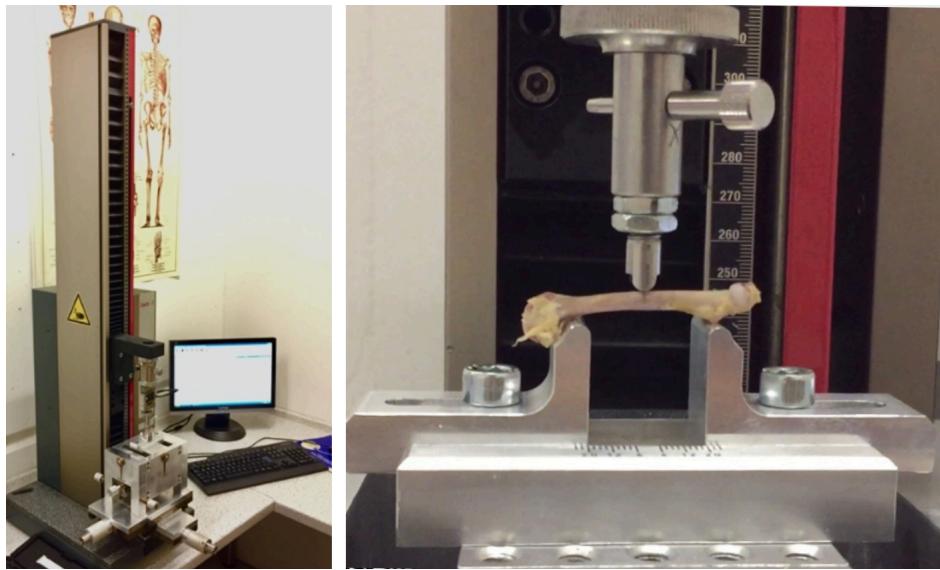


Abbildung 7: Material-Prüfmaschine und Testung einer Probe

Die Abbildung mit der Nummer 8 zeigt exemplarisch eine Spannungs-Dehnungskurve des durchgeführten Dreipunkt-Biegetests. Auf der Ordinate ist die Dehnung („Stress“) in Megapascal („MPa“) und auf der Abszisse die Dehnung („Strain“) in Prozent angegeben. Es zeigt sich eine zunehmende Dehnung des Knochens bei Steigerung der Spannung. Dann folgt bei 154,47 MPa keine weitere Zunahme der Dehnung, da es bei dieser Spannung zu einem Bruch des Knochens gekommen ist.

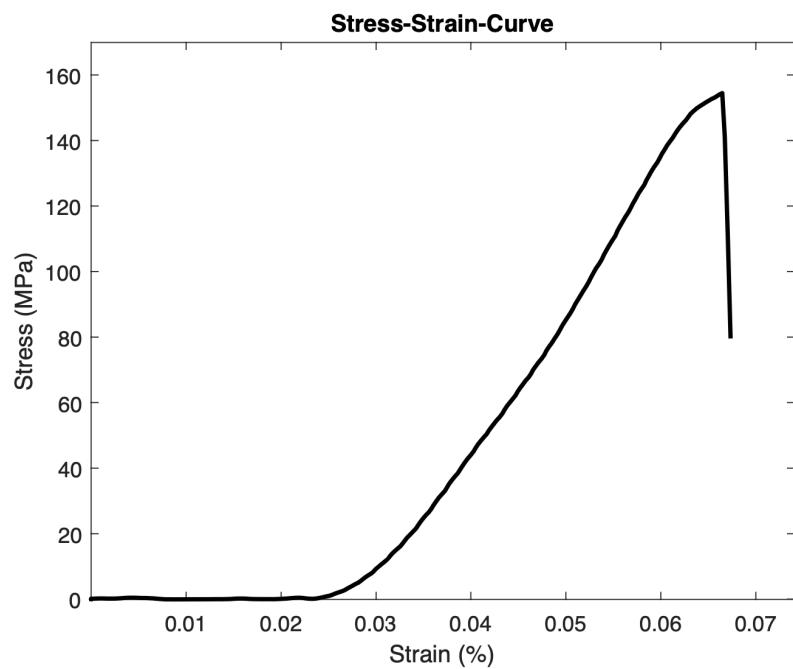


Abbildung 8: Spannungs-Dehnungskurve

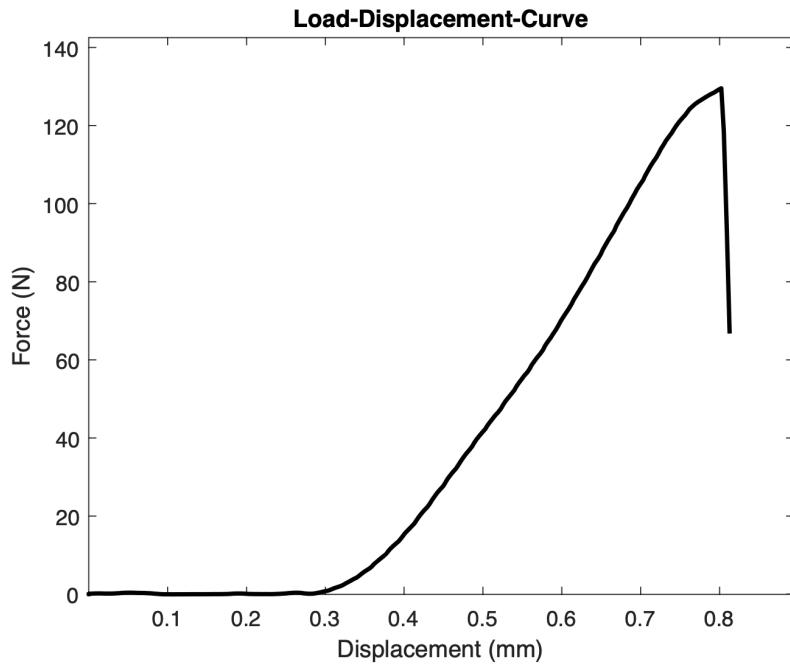


Abbildung 9: Kraft-Deformitäts-Kurve

In Abbildung 9 ist exemplarisch eine Kraft-Deformitäts-Kurve des durchgeführten Dreipunkt-Biegetests dargestellt. Dabei ist die Kraft („Force“) in Newton (N) auf der Ordinate und die Deformation bzw. Verformung des Knochens in Millimeter (mm) auf der Abszisse abgebildet. Es zeigt sich eine immer weiter zunehmender Verformung bei Erhöhung der auf den Knochen ausgeübten Kraft. Bei 129,54 Newton kommt es zu keiner weiteren Zunahme der Verformung des untersuchten Knochens, da dieser unter dieser Kraft gebrochen ist.

3.2.3 Statistische Analyse

Im Rahmen der statistischen Analyse wurden sämtliche Ergebnisse mit Zuhilfenahme des Programms „SPSS Statistics“ (Version 25; IBM, Armonk, New York; USA) ausgewertet. Es zeigte sich bei kleinem Untersuchungskollektiv keine Normalverteilung, weshalb auf unten beschriebene Tests zurückgegriffen wurde. Die statistische Auswertung erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Medizinische Bioinformatik und Statistik der Universität zu Köln.

Vor der Testung wurden die akquirierten Daten mit Zuhilfenahme des Programms „Excel“ (Version 16.33; Microsoft Corporation, Redmond, Washington; USA) zur Ermittlung von Standardabweichung, Minimalwerten, Maximalwerten, Perzentilen und Mittelwert sowie des jeweiligen Medians zusammengefasst.

Um signifikante Unterschiede in den Bereichen der oben genannten Messwerte der Mikro-CT-Untersuchungen und Dreipunkt-Biegetests zu eruieren, wurde zunächst mit dem Programm „SPSS Statistics“ der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test („H-Test“) durchgeführt. Dieser ermittelt mittels Varianzanalyse, ob die Werte, die als voneinander unabhängige Stichproben gelten, sich bezogen auf eine zentrale Tendenz unterscheiden. Der Vorteil des Tests ist, dass dazu die Daten nicht normalverteilt sein müssen (103).

Als signifikant wird ein Parameter eingestuft, wenn bei der asymptotischen Signifikanz ein p-Wert von kleiner als 0,05 vorliegt. Ein Trend wird durch einen p-Wert der asymptotischen Signifikanz, der kleiner 0,1 ist, definiert.

Danach wurde zwischen jeder der einzelnen Gruppe zusätzlich ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Dabei handelt es sich ebenfalls um einen nicht-parametrischen Test, der so zum Beispiel wie der T-Test zwei voneinander unabhängige Proben miteinander vergleicht. Jedoch ist der Mann-Whitney-U-Test auch valide, wenn die untersuchten Proben nicht normalverteilt sind (103).

Die oben genannten statistischen Analysen der Mikro-CT-Untersuchungen und des Dreipunkt-Biegetests sind allesamt zwischen der jeweiligen Kontroll- und Hoch- beziehungsweise Niedrigdosisgruppe angefertigt worden.

Zur grafischen Darstellung der erhobenen Werte wurden Box-Whiskers-Grafiken herangezogen (103).

Bei bereits bestehenden signifikanten Unterschieden zwischen den Geschlechtern in den Kontrollgruppen wurde auf eine weitere statistische Analyse hinsichtlich des Vergleichs der Geschlechter der Niedrigdosis- und Hochdosisgruppen verzichtet.

Die einzelnen p-Werte sowie die weiteren Parameter der statistischen Tests einschließlich der Tabellen, die zeigen, dass keine Normalverteilung besteht, sind dem Anhang (Kapitel 11) zu entnehmen.

4. Ergebnisse

In diesem Abschnitt wird auf die Ergebnisse der Knochenanalysen durch das Mikro-CT und den Dreipunkt-Biegetest eingegangen. Sämtliche Daten sind durch Box-Whiskers-Grafiken beziehungsweise Boxplots veranschaulicht und werden im sich anschließenden Text näher erläutert.

Der Boxplot dient zur Verdeutlichung der Verteilung der einzelnen Werte und Beziehung zueinander.

Bezüglich der Ratten kam es bis auf die beiden weiblichen Ratten aus der Hochdosisgruppe, die im Rahmen der ersten Narkose verstarben, peri- oder postoperativ zu keinerlei Komplikationen. Sie zeigten sich stets kontaktfreudig in einem guten Allgemein- und Ernährungszustand mit kontinuierlicher Zunahme des Gewichts. Zu keinem Zeitpunkt gab es einen Anhalt für ein lokales oder systemisches Infektgeschehen. Die Wundheilung erfolgte bei allen Tieren per primam.

4.1 Mikro-CT-Untersuchungen

Wie im Abschnitt 3.2.1 beschrieben sind im Rahmen der durchgeführten Mikro-CT-Untersuchungen zahlreiche Werte gemessen worden, die eine Aussage über die Morphologie der untersuchten knöchernen Struktur erlauben. Diese Untersuchung erfolgte ex vivo und vor biomechanischer Testung am freipräparierten Rattenfemur ohne Schädigung der Knochenbinnenstruktur.

Die erhobenen Daten beziehen sich abhängig vom jeweiligen Wert auf die Metabeziehungsweise Diaphyse des untersuchten Rattenknochens. Die Ordinate gibt stets den jeweils erhobenen Parameter und die Abszisse die Gruppenzugehörigkeit an.

Die Anzahl der Gruppen sowie die Erläuterung der Abkürzungen sind den Beschreibungen der Abbildungen zu entnehmen.

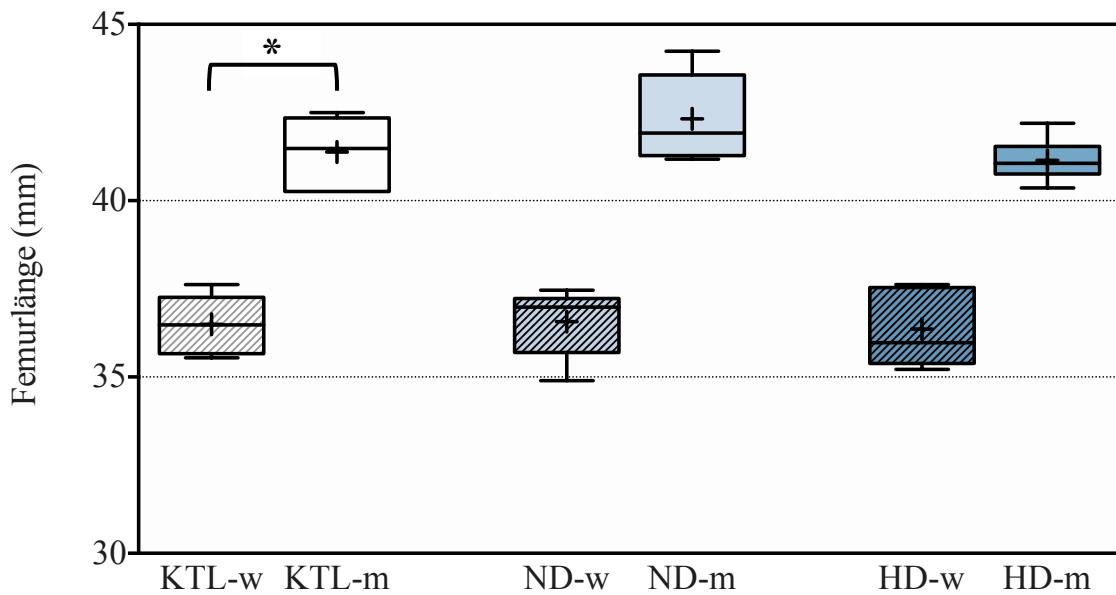


Abbildung 10: Länge der Femora der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) in mm nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots. Der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+), Signifikanzen sind mit einem Stern () gekennzeichnet.*

In der obigen Abbildung 10 sind die Femurlängen der weiblichen und männlichen Ratten in Millimetern (mm) mittels Boxplot-Grafiken dargestellt.

Die Länge ist dabei in Millimetern (mm) auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Zwischen den beiden Kontrollgruppen ließ sich bei einem p-Wert von 0,004 ein signifikanter Unterschied im Sinne von längeren Femora der männlichen Kontrollgruppe nachweisen.

Darüber hinaus gab es keine signifikanten Unterschiede, es zeigte sich aber ein Trend mit einem p-Wert von 0,062 im Vergleich der männlichen Niedrigdosis- mit der männlichen Hochdosisgruppe im Sinne von längeren Femora in der Niedrigdosisgruppe.

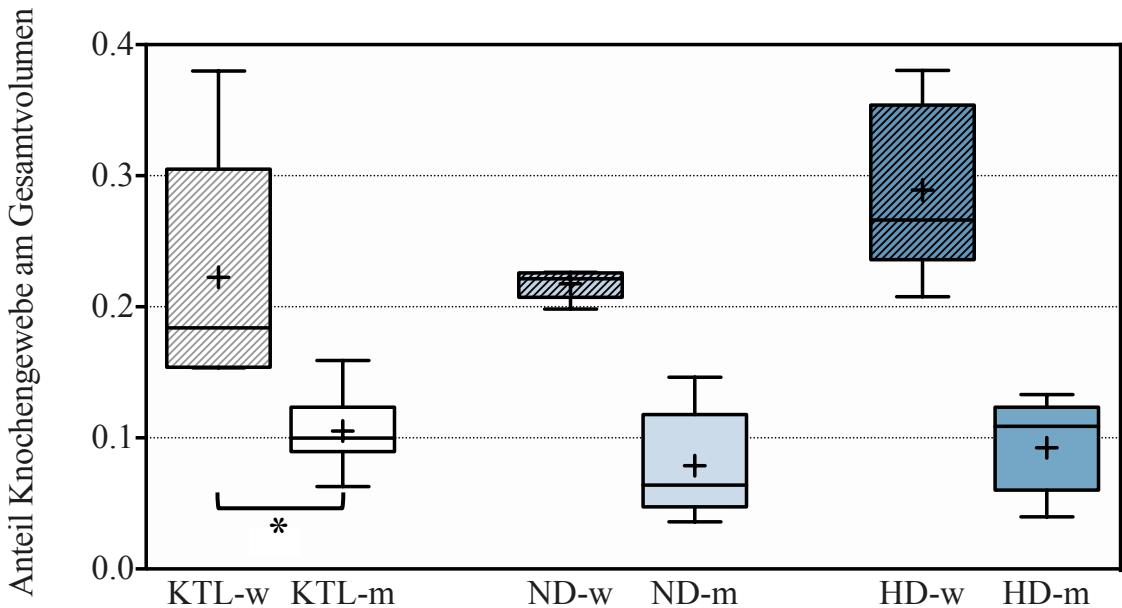


Abbildung 11: Anteil Knochengewebe am Gesamtvolume (VOX BV/TV) der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) in mm nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots. Der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+) gekennzeichnet.

In Abbildung 11 ist das Verhältnis von Knochengewebe zum Gesamtvolume der untersuchten Proben der weiblichen und männlichen Ratten mittels Boxplot-Grafiken dargestellt.

Das Verhältnis ist dabei ohne Einheit auf der Ordinate und die jeweilige Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Dabei steht „BV“ für „Bone Volume“, also dem Anteil trabekulären Knochenvolumen in Kubikmillimetern (mm^3) und „TV“ für „Total Volume of interest“, also der Gesamtzahl aller Voxel in mm^3 im Bereich der ermittelten Schnittbilder. Bei „VOX BV/TV“ handelt es sich demzufolge um den Anteil trabekulären Knochens in Prozent des gesamten mittels Mikro-CT-Untersuchung gemessenen Volumens, ergo dem Knochenvolumenanteil.

Die statistischen Testungen waren bis auf den Vergleich der beiden Kontrollgruppen mit einem p-Wert von 0,01 im Sinne eines höheren Anteils an Knochengewebe am Gesamtvolume in der weiblichen Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant verschieden. Mit p-Werten von jeweils 0,076 bei statistischem Vergleich der weiblichen Niedrigdosis- mit der weiblichen Hochdosisgruppe sowie der weiblichen Kontroll- und Hochdosisgruppe zeichneten sich jedoch Trends im Sinne eines höheren Knochenanteils am Gesamtvolume der Proben der Hochdosisgruppe ab.

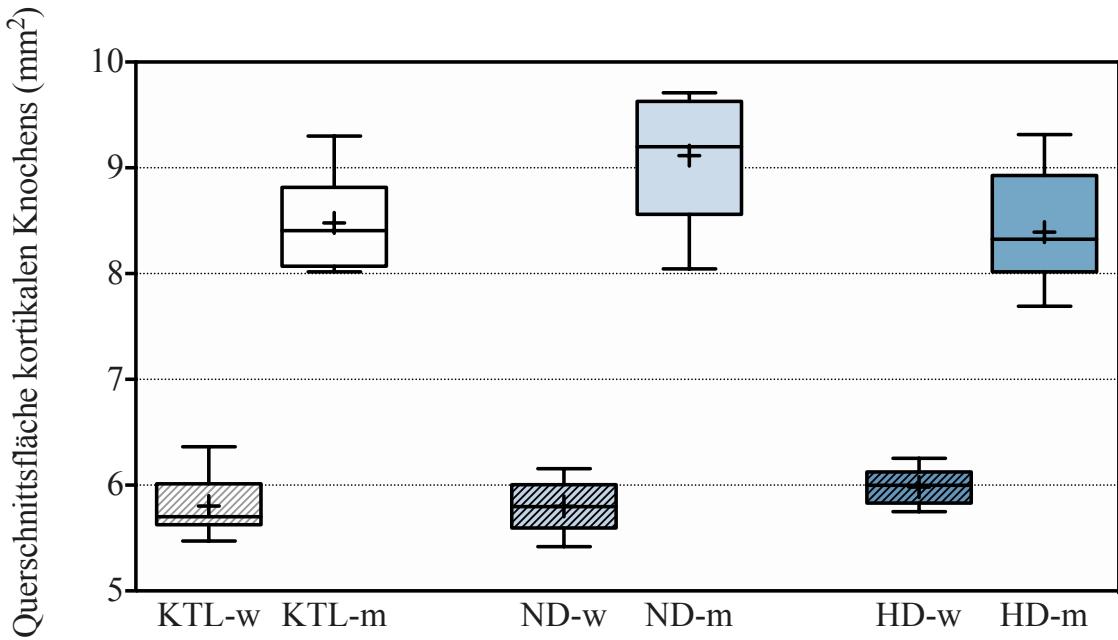


Abbildung 12: Querschnittsfläche des kortikalen Knochens der Femora („Cortical Area“) der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) in mm² nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots. Der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+) gekennzeichnet.

In Abbildung 12 sind die im Querschnitt der Diaphysen ermittelte Fläche des kortikalen Knochens („Cortical Area“) der untersuchten Proben der weiblichen und männlichen Ratten Quadratmillimetern (mm²) mittels Boxplot-Grafiken dargestellt. Diese ergibt sich aus dem Volumen der Kortikalis (Ct.V) dividiert durch die Anzahl an Schichten, welche zuvor mit der Schichtdicke multipliziert worden ist (Cortical bone area = cortical volume ÷ (number of slices x slice thickness)).

Diese Einheit ist in Quadratmillimetern (mm²) auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Zwischen den beiden Kontrollgruppen ließ sich bei einem p-Wert von 0,004 ein signifikanter Unterschied im Sinne einer höheren Querschnittsfläche bei der männlichen Kontrollgruppe nachweisen.

Darüber hinaus gab es keinerlei statistisch signifikante Unterschiede. Es zeigte sich aber ein Trend im Vergleich der männlichen Niedrigdosis- mit der Hochdosisgruppe mit einem p-Wert von 0,088 im Sinne einer höheren Querschnittsfläche in der Hochdosisgruppe der männlichen Ratten.

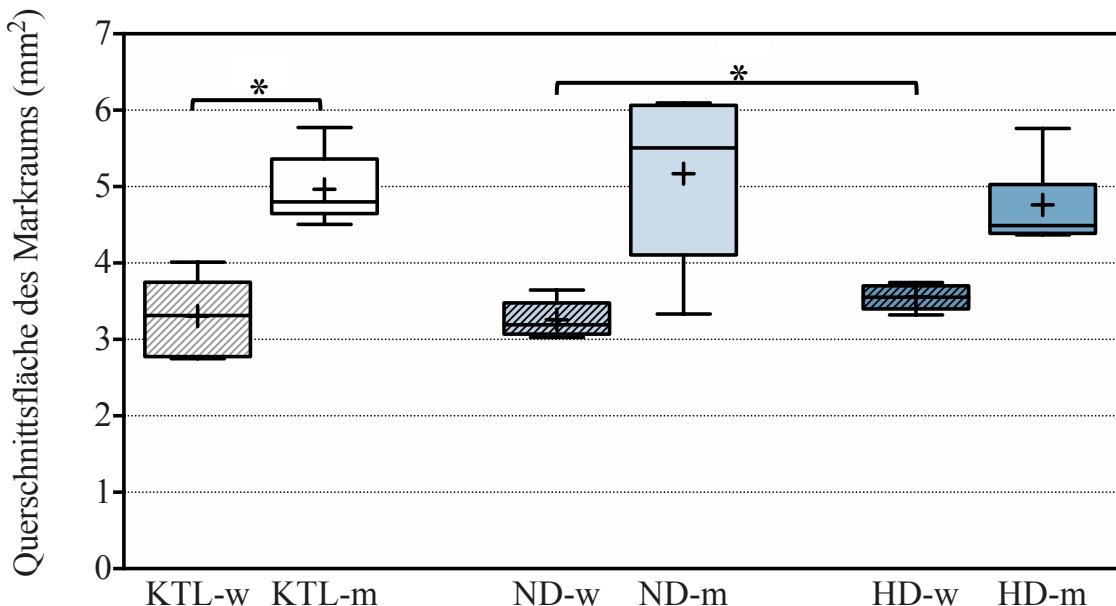


Abbildung 13: Querschnittsfläche des Knochenmarkbereichs der Femora („Marrow Area“) der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) in mm² nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots. Der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+), Signifikanzen sind mit einem Stern () gekennzeichnet.*

In Abbildung 13 ist die Fläche des Knochenmarkbereichs („Marrow Area“) der untersuchten Proben der weiblichen und männlichen Ratten gemessen im Bereich der Diaphyse in Quadratmillimetern (mm²) mittels Boxplot-Grafiken dargestellt.

Die Einheit ist in Quadratmillimetern (mm²) auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Zwischen den beiden Kontrollgruppen ließ sich bei einem p-Wert von 0,004 ein signifikanter Unterschied nachweisen. Die Fläche des Markraums der Männchen ist demnach signifikant größer im Vergleich zur Markraumfläche der Tiere der weiblichen Kontrollgruppe. Darüber hinaus brachten die Gegenüberstellung der weiblichen Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe mit einem p-Wert von 0,047 einen signifikanten Unterschied mit einer größeren Fläche des Markraums in der weiblichen Hochdosisgruppe hervor.

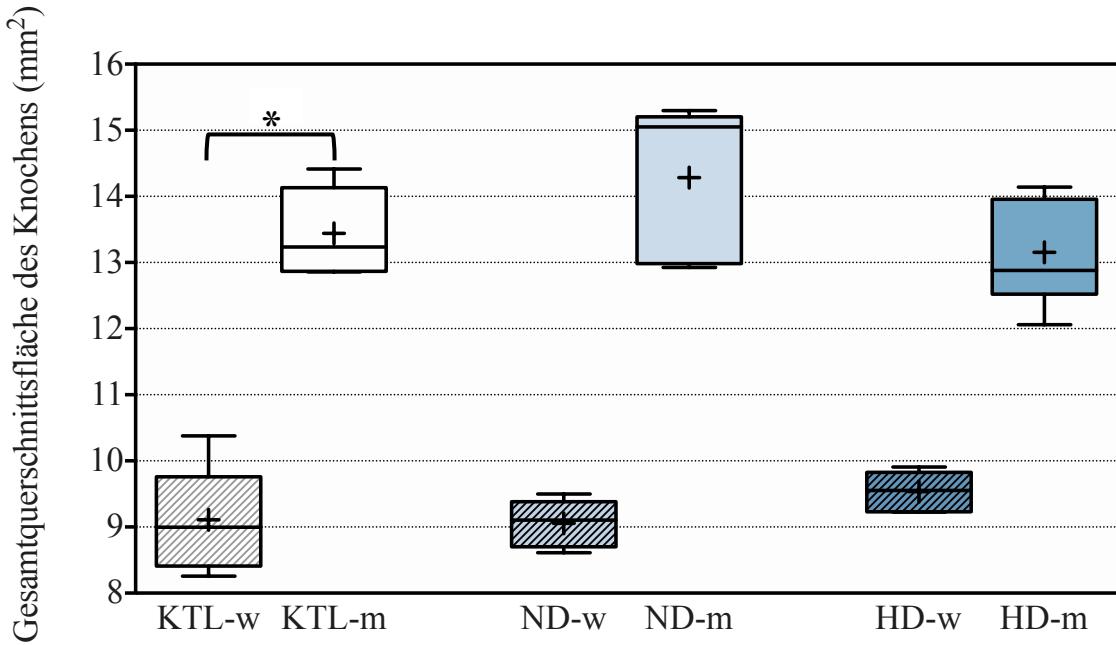


Abbildung 14: Querschnittsfläche der Femora („Total cross-sectional area inside the periosteal envelope“) der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) in mm² nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots. Der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+), Signifikanzen sind mit einem Stern () gekennzeichnet.*

In Abbildung 14 ist die Gesamtquerschnittsfläche innerhalb der diaphysären, periostalen Hülle („Tt.Ar“ oder „Total cross-sectional area inside the periosteal envelope“) der untersuchten Proben der weiblichen und der männlichen Ratten gemessen im Bereich der Diaphyse in Quadratmillimetern (mm²) mittels Boxplot-Grafiken dargestellt.

Die Einheit ist in Quadratmillimetern (mm²) auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Zwischen den beiden Kontrollgruppen ließ sich bei einem p-Wert von 0,004 ein signifikanter Unterschied im Sinne einer höheren Gesamtquerschnittsfläche des Knochens der männlichen Kontrollgruppe nachweisen. Darüber hinaus brachten die Testungen keine signifikanten Unterschiede hervor. Mit einem p-Wert von 0,062 ließ sich im statistischen Vergleich von männlicher Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe ein statistischer Trend im Sinne einer höheren Gesamtquerschnittsfläche des Knochens bei der männlichen Niedrigdosisgruppe feststellen.

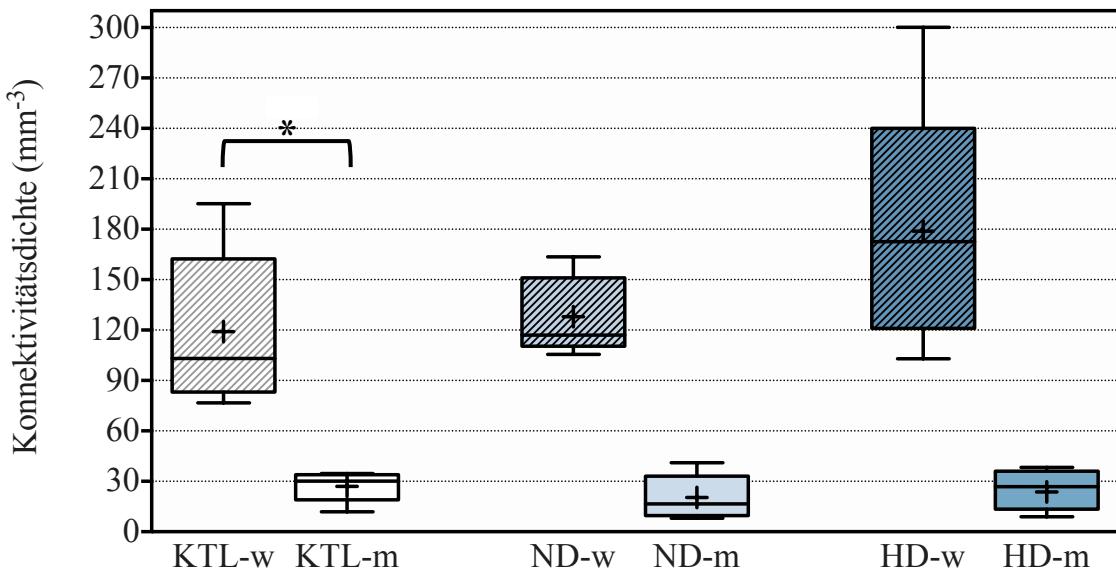


Abbildung 15: Konnektivitätsdichte der Femora der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) in mm^{-3} nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots. Der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+), Signifikanzen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

In Abbildung 15 ist die metaphysäre ermittelte Konnektivitätsdichte („Connectivity Density“ oder „Conn.D“) der untersuchten Proben der weiblichen Ratten und männlichen Ratten in mm^{-3} mittels Boxplot-Grafiken dargestellt.

Sie dient der Veranschaulichung des Grades der Verbundenheit der trabekulären knöchernen Strukturen. Die Konnektivitätsdichte wird hierbei durch das gesamte Volumen („Total Volume“) der untersuchten Region („Region of interest“) genormt.

Die Einheit ist in mm^{-3} auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Zwischen den beiden Kontrollgruppen ließ sich bei einem p-Wert von 0,004 ein signifikanter Unterschied nachweisen. Die Konnektivitätsdichte der weiblichen Rattenfemora lagen gegenüber der männlichen Kontrollgruppe um ein Vielfaches höher.

Darüber hinaus brachten die Testungen keine signifikanten Unterschiede hervor.

Es zeigten sich im Vergleich der männlichen und weiblichen Ratten Unterschiede, die sich um ein Vielfaches unterscheiden. Dabei ist der Maximalwert der männlichen Tiere mit $38,26 \text{ mm}^{-3}$ noch deutlich unter dem Minimalwert von $76,6708 \text{ mm}^{-3}$ des weiblichen Kollektivs der Ratten zu verzeichnen.

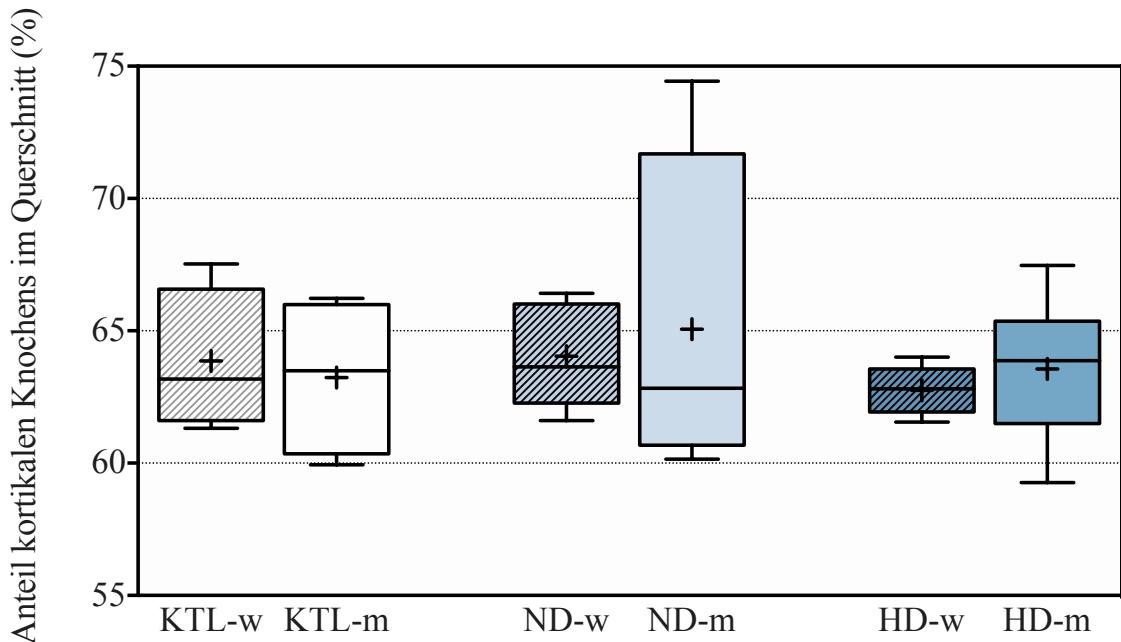


Abbildung 16: Anteil kortikalen Knochens am Gesamtknochenquerschnitt der Femora der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) in % nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots. Der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+) gekennzeichnet.

In Abbildung 16 ist der diaphysär ermittelte Anteil kortikalen Knochens im Querschnitt der untersuchten Proben der weiblichen und männlichen Ratten in Prozent (%) mittels Boxplot-Grafiken dargestellt.

Dieser Parameter ist die oben beschriebene „Cortical bone area“ („Ct.Ar“) dividiert durch die Gesamtquerschnittsfläche innerhalb der periostalen Hülle („Total cross-sectional area inside the periosteal envelope“, Tt.Ar). Er beschreibt den diaphysär gemessenen Anteil der Kortikalisfläche an der gesamten Querschnittsfläche des Knochens.

Die Einheit ist in Prozent (%) auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Die statistischen Testungen brachten keine signifikanten Unterschiede hervor.

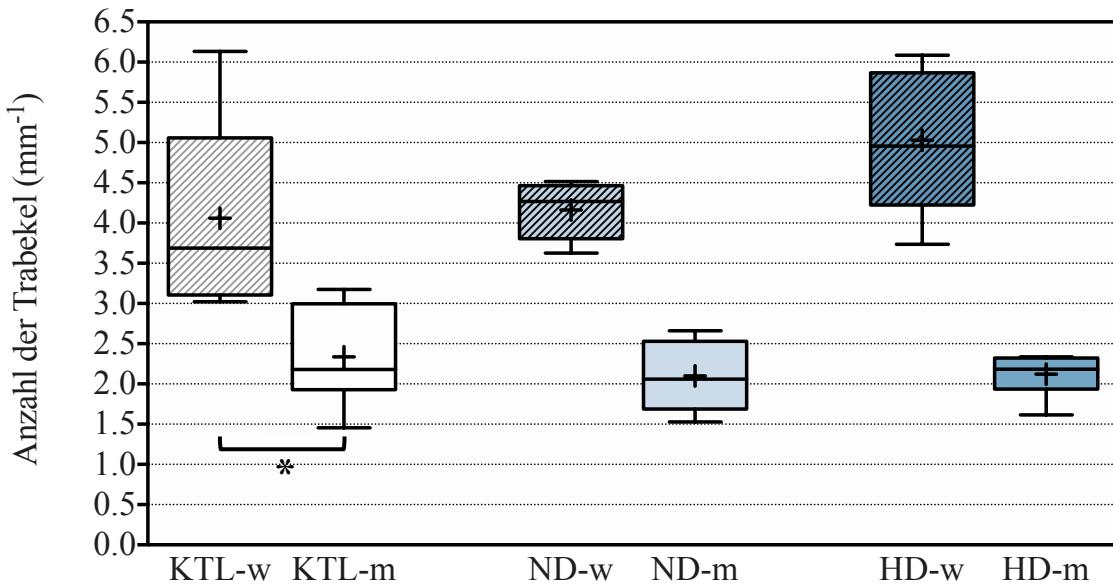


Abbildung 17: Anzahl an Trabekeln der Femora der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) in mm^{-1} nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots. Der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+), Signifikanzen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

In Abbildung 17 ist die metaphysär ermittelte „Trabecular Number“ („Tb.N“), also die Anzahl gemessener Trabekel der untersuchten Proben der weiblichen und männlichen Ratten in mm^{-1} mittels Boxplot-Grafiken dargestellt.

Die Einheit ist in mm^{-1} auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Zwischen den beiden Kontrollgruppen ließ sich bei einem p-Wert von 0,01 ein signifikanter Unterschied im Sinne einer höheren Anzahl an Trabekeln in der Gruppe der weiblichen Tiere nachweisen. Darüber hinaus brachten die statistischen Testungen keine signifikanten Unterschiede hervor. Im Vergleich von weiblicher Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe ließ sich mit einem p-Wert von 0,076 ein Trend im Sinne einer höheren Trabekelanzahl in der weiblichen Hochdosisgruppe ermitteln.

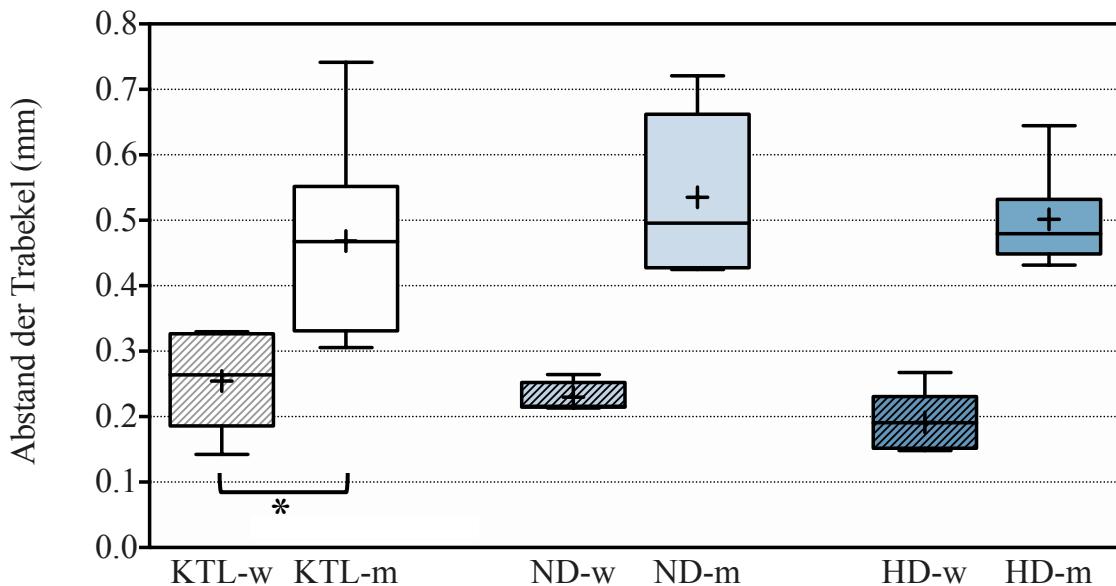


Abbildung 18: Abstand der Trabekel der Femora der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) in mm nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots. Der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+), Signifikanzen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

In Abbildung 18 ist die metaphysär ermittelte „Trabecular Separation“ („Tb.Sp“), die den Abstand zwischen den im Trabekel der untersuchten Proben der weiblichen und männlichen Ratten in Millimeter (mm) beschreibt, mittels Boxplot-Grafiken dargestellt.

Die Einheit ist in Millimetern (mm) auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Zwischen den beiden Kontrollgruppen ließ sich bei einem p-Wert von 0,01 ein signifikanter Unterschied im Sinne eines höheren Trabekelabstands bei der männlichen Kontrollgruppe nachweisen.

Darüber hinaus brachten die statistischen Testungen keine signifikanten Unterschiede hervor.

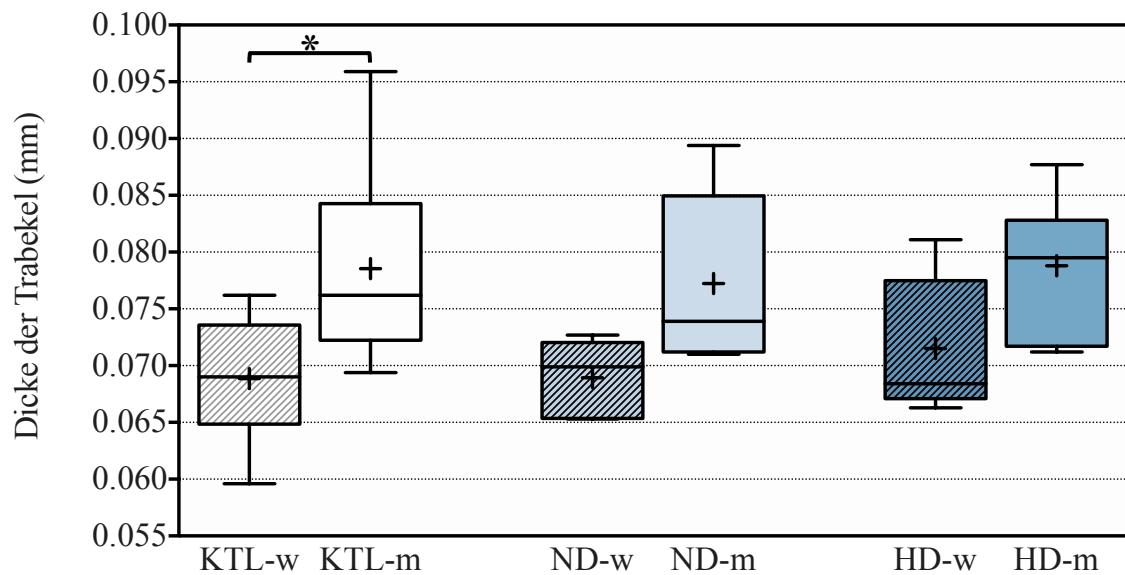


Abbildung 19: Dicke der Trabekel der Femora der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) in mm nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots. Der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+), Signifikanzen sind mit einem Stern () gekennzeichnet.*

In Abbildung 19 ist die metaphysär ermittelte „Trabecular Thickness“, die die Dicke der Trabekel der untersuchten Proben der weiblichen und männlichen Ratten in Millimetern (mm) beschreibt, mittels Boxplot-Grafiken dargestellt.

Die Einheit ist in Millimetern (mm) auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Zwischen den beiden Kontrollgruppen ließ sich bei einem p-Wert von 0,025 ein signifikanter Unterschied im Sinne von dickeren Trabekeln in der männlichen Kontrollgruppe nachweisen. Darüber hinaus brachten die statistischen Testungen keine signifikanten Unterschiede hervor.

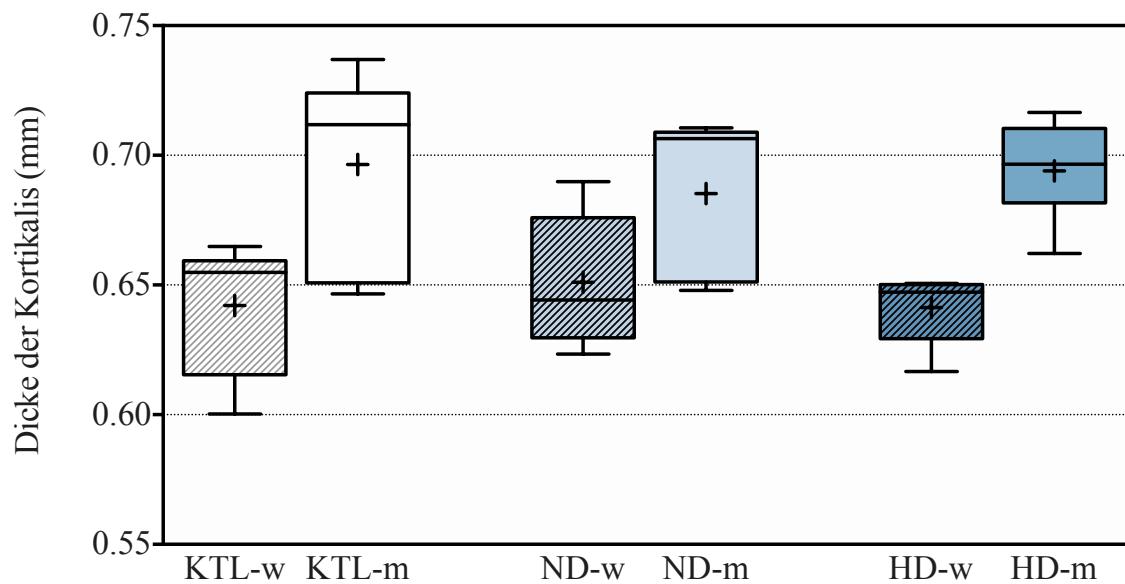


Abbildung 20: Dicke der Kortikalis der Femora der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) in mm nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots, der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+) gekennzeichnet.

In Abbildung 20 ist die diaphysär ermittelte „Cortical Thickness“ („Ct.Th“), die die Dicke des kortikalen Knochens der untersuchten Proben der weiblichen Ratten und männlichen Ratten in Millimetern (mm) beschreibt, mittels Boxplot-Grafiken dargestellt.

Die Einheit ist in Millimetern (mm) auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Die statistischen Testungen brachten keine signifikanten Unterschiede hervor.

4.2 Dreipunkt-Biegetest

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse des Dreipunkt-Biegetests dargestellt und werden anschließend beschrieben. Die grafischen Darstellungen sind allesamt Boxplots beziehungsweise Box-Whiskers-Grafiken in der stets gleichen Unterteilung in Kontroll-, Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe. Auf der Ordinate sind die jeweiligen untersuchten biomechanischen Parameter mitsamt der Angabe der Einheit und auf der Abszisse die entsprechende Gruppenzugehörigkeit verbildlicht.

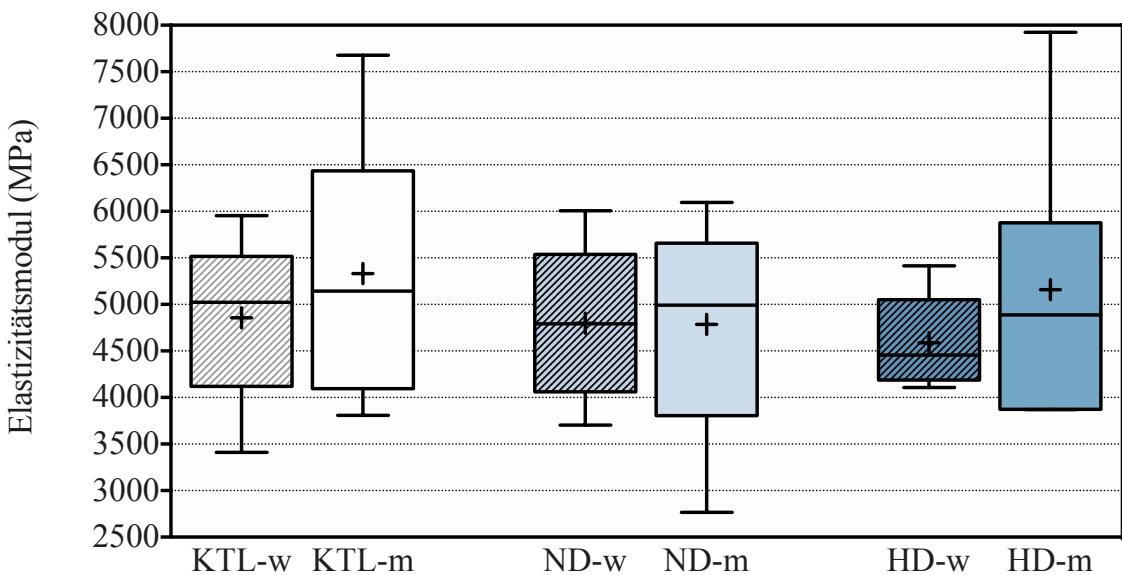


Abbildung 21: Elastizitätsmodul in MPa der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots, der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+) gekennzeichnet.

In Abbildung 21 ist der „Elastic Modulus“, also der Elastizitätsmodul (oder auch „Young’s Modulus“) der weiblichen Ratten und männlichen Ratten in Megapascal (MPa) mittels Boxplots dargestellt.

Die Einheit ist dabei in Megapascal (MPa) auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Der Elastizitätsmodul spiegelt die Widerstandsfähigkeit eines Stoffes wider, die der Knochen im Dreipunkt-Biegetest gegenüber einer durch Druck hervorgerufenen Dehnung aufbringt. Demnach ist der Elastizitätsmodul rigiderer Stoffe höher als der weniger rigider Stoffe.

Die statistischen Testungen brachten keine signifikanten Unterschiede hervor.

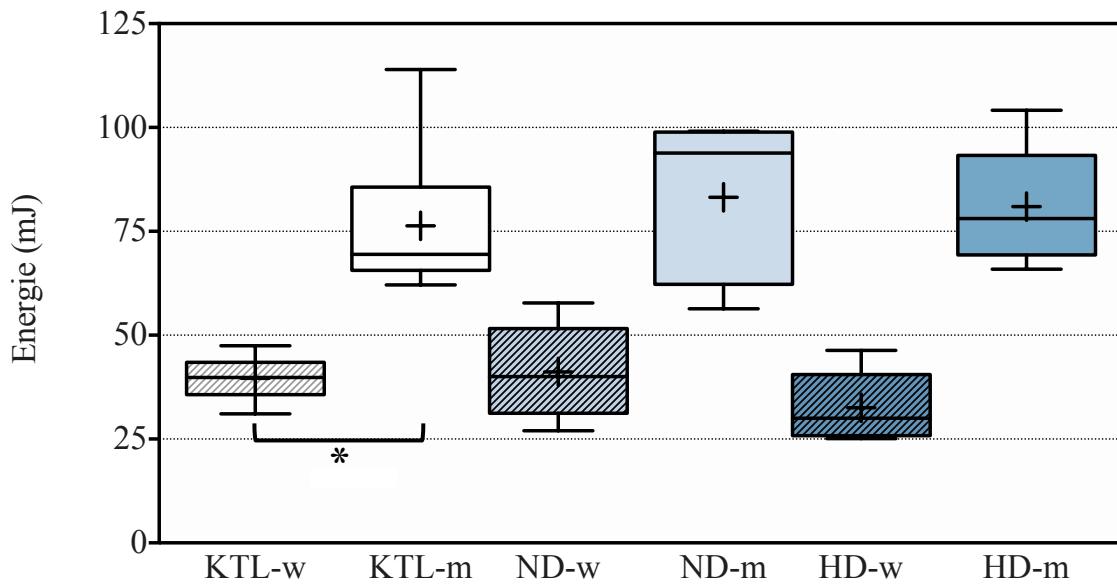


Abbildung 22: Energie in mJ der Femora der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots. Der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+), Signifikanzen sind mit einem Stern () gekennzeichnet.*

In Abbildung 22 ist die Energie („Energy“), die im Rahmen des Dreipunkt-Biegetests auf die Femora der weiblichen und männlichen Ratten bis zum Versagen der Knochen ausgeübt wurde, in Millijoule („mJ“) mittels Boxplots dargestellt.

Die Einheit ist dabei in Millijoule (mJ) auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Zwischen den beiden Kontrollgruppen ließ sich bei einem p-Wert von 0,004 ein signifikanter Unterschied nachweisen. Dies spricht für eine signifikant höhere Energie, die auf die Femora der Ratten der männlichen Kontrollgruppe im Vergleich zur weiblichen Kontrollgruppe bis zum Versagen ausgeübt wurde.

Darüber hinaus brachten die statistischen Testungen keine signifikanten Unterschiede hervor.

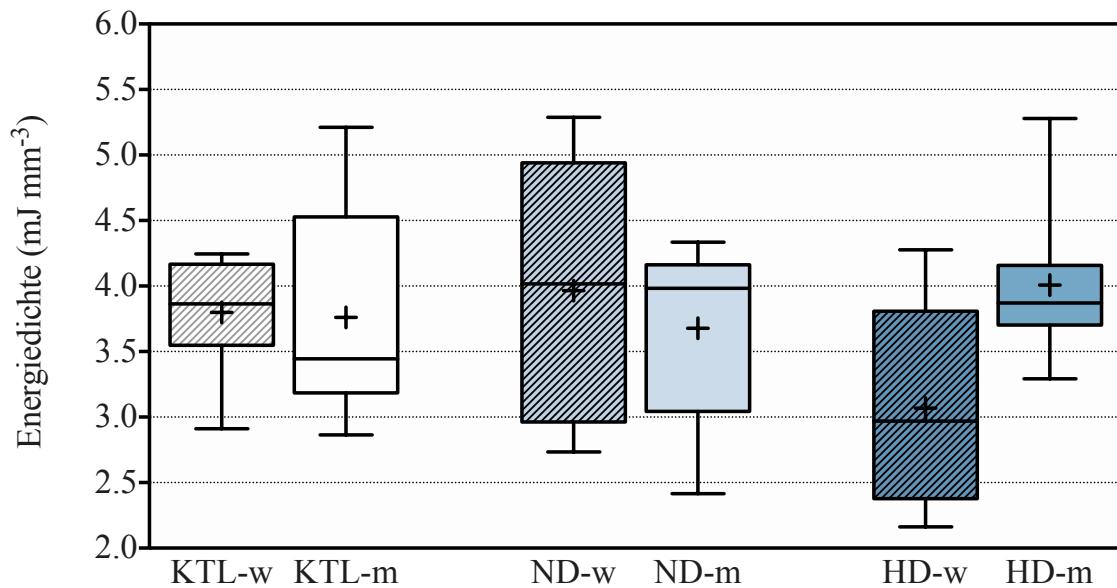


Abbildung 23: Energiedichte in mJ mm^{-3} der Femora weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots, der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+) gekennzeichnet.

In Abbildung 23 ist die Energiedichte („Energy Density“), die im Dreipunkt-Biegetest auf die Femora der weiblichen und männlichen Ratten ausgeübt wurde, in J mm^{-3} mittels Boxplots dargestellt. Sie stellt die auf die Femora der Ratten einwirkende Energie in Joule pro Volumenanteil Knochen in mm^{-3} . Es handelt sich demnach um die volumetrische Energiedichte.

Die Einheit ist dabei in J mm^{-3} auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Die statistischen Testungen brachten keine signifikanten Unterschiede hervor.

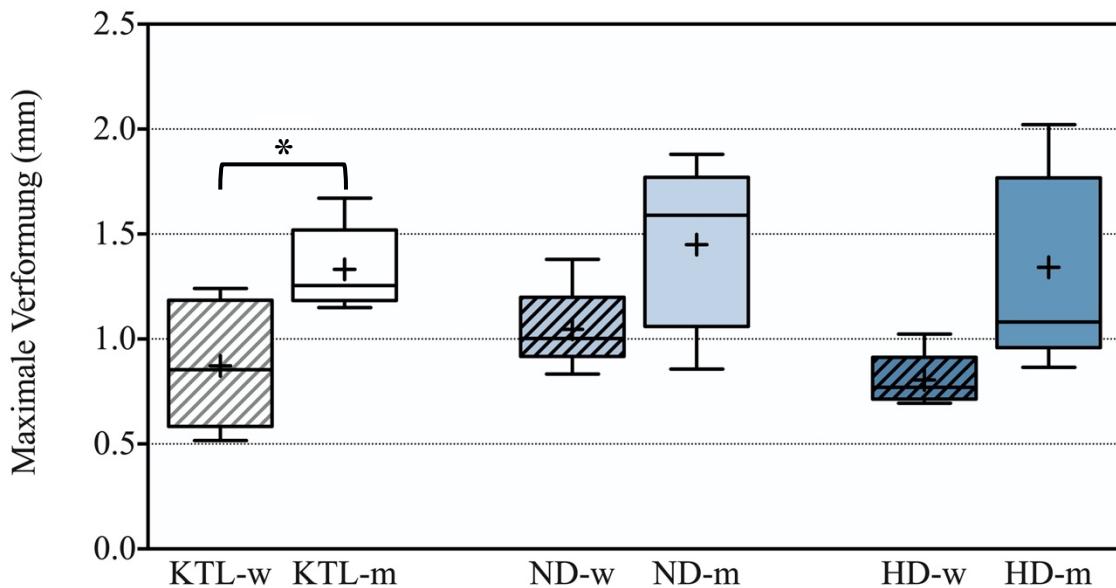


Abbildung 24: Maximale Verformung in mm der Femora der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots. Der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+), Signifikanzen sind mit einem Stern () gekennzeichnet.*

In Abbildung 24 ist die maximale Verformung („Ultimate Displacement“) der Femora im Dreipunkt-Biegetest der weiblichen und männlichen Ratten in Millimetern (mm) mittels Boxplots dargestellt.

Die Einheit ist dabei in Millimetern (mm) auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Zwischen den beiden Kontrollgruppen ließ sich bei einem p-Wert von 0,016 ein signifikanter Unterschied im Sinne einer höheren maximalen Verformung in der männlichen Kontrollgruppe nachweisen. Zudem zeigte sich mit einem p-Wert von 0,076 ein Trend bei Vergleich der weiblichen Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe im Sinne einer höheren maximalen Verformung in der weiblichen Niedrigdosisgruppe.

Darüber hinaus brachten die statistischen Testungen keine signifikanten Unterschiede hervor.

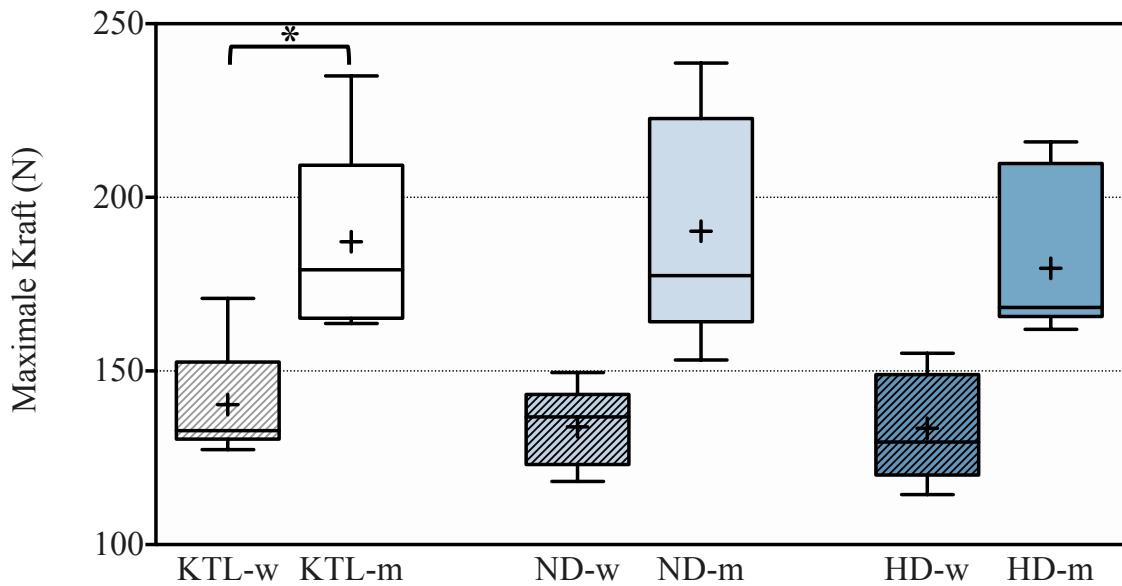


Abbildung 25: Maximale Kraft in N der Femora der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots. Der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+), Signifikanzen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

In Abbildung 25 ist die maximale Kraft („Ultimate Force“), die im Dreipunkt-Biegetest auf die Femora der weiblichen und männlichen Ratten ausgeübt wurde, in Newton (N) mittels Boxplots dargestellt.

Die Einheit ist dabei in Newton (N) auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Zwischen den beiden Kontrollgruppen ließ sich bei einem p-Wert von 0,01 ein signifikanter Unterschied im Sinne einer höheren auf die Femora der Ratten der männlichen Kontrollgruppe ausgeübten maximalen Kraft nachweisen.

Die statistischen Testungen brachten darüber hinaus keine signifikanten Unterschiede hervor.

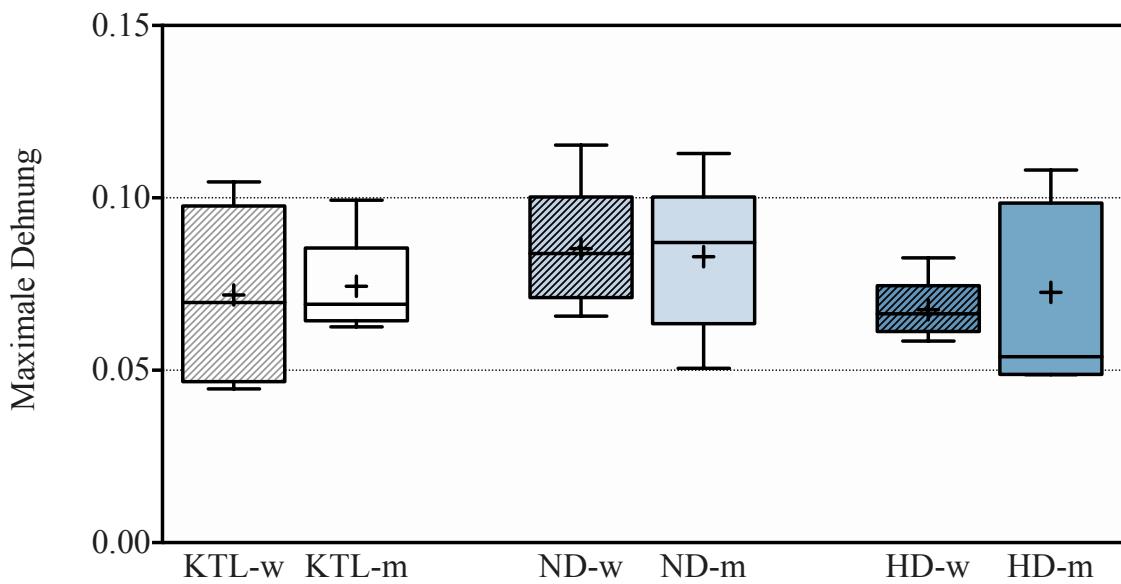


Abbildung 26: Maximale Dehnung der Femora der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots, der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+) gekennzeichnet.

In Abbildung 26 ist die maximale Dehnung („Ultimate Strain“) bzw. Bruchdehnung der Femora der weiblichen und männlichen Ratten, die im Rahmen des Dreipunkt-Biegetests ermittelt wurde, mittels Boxplots dargestellt.

Die maximale Dehnung ist dabei ohne Einheit und anteilig bezogen auf die Ausgangslänge der Femora bezogen auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Es zeigte sich mit einem p-Wert von 0,076 ein Trend bei Vergleich der weiblichen Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe im Sinne einer geringeren Bruchdehnung in der weiblichen Hochdosisgruppe.

Darüber hinaus brachten die statistischen Testungen keine signifikanten Unterschiede hervor.

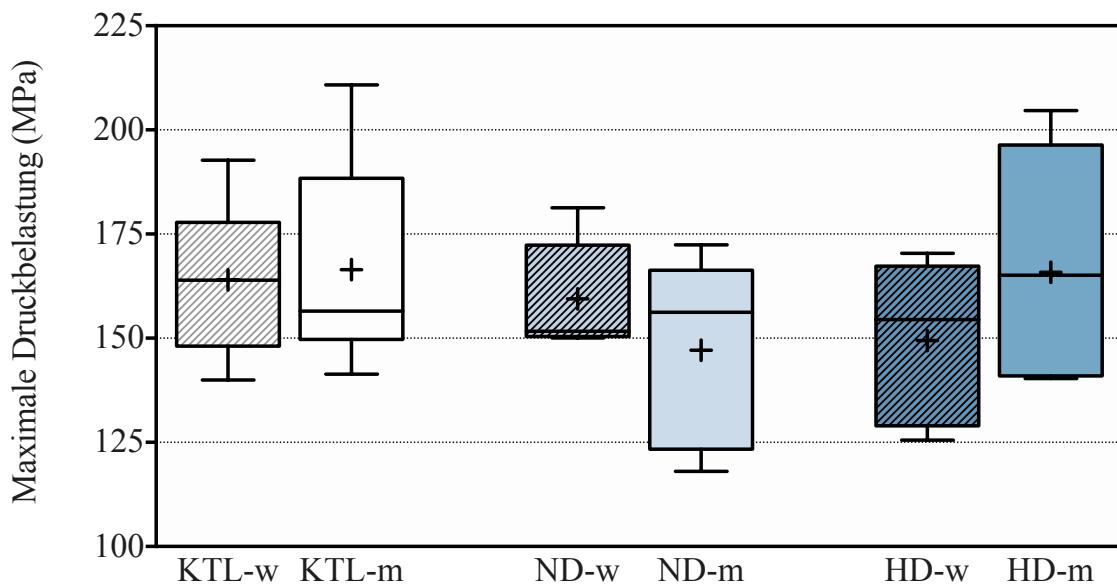


Abbildung 27: Maximale Druckbelastung in MPa der Femora der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots, der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+) gekennzeichnet.

In Abbildung 27 ist die maximale Druckbelastung („Ultimate Stress“), die im Drei-Punkt-Biegetest auf die Femora der weiblichen und männlichen Ratten ausgeübt wurde, in Megapascal (MPa) mittels Boxplots dargestellt.

Die Einheit ist dabei in Megapascal (MPa) auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Die statistischen Testungen brachten keine signifikanten Unterschiede hervor.

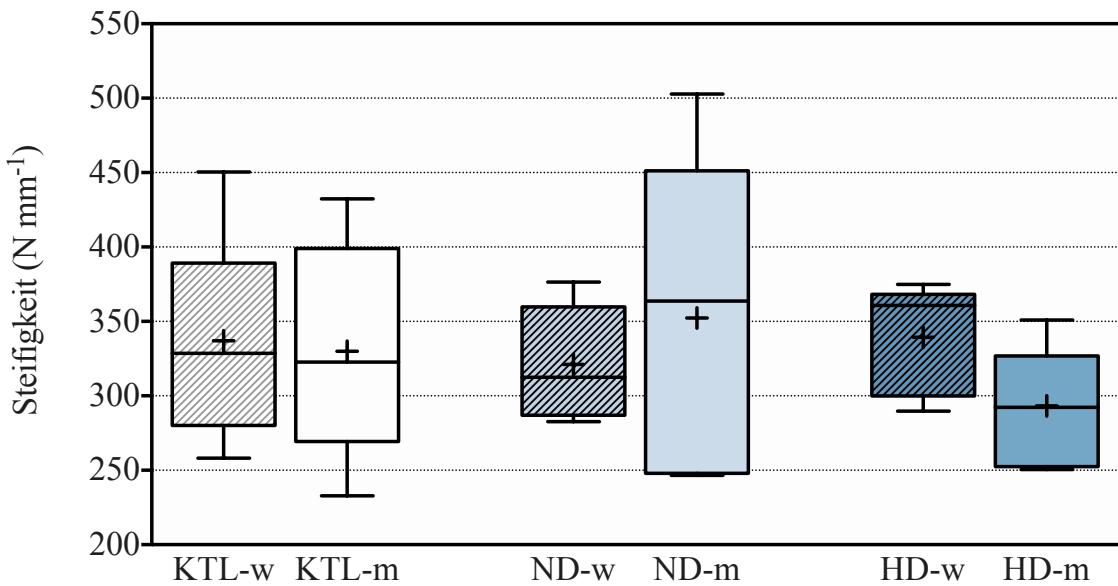


Abbildung 28: Steifigkeit in $N \text{ mm}^{-1}$ der Femora der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots, der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+) gekennzeichnet.

In Abbildung 28 ist Steifigkeit der Femora der weiblichen und männlichen Ratten, die im Dreipunkt-Biegetest ermittelt wurde, in Newton pro Millimeter ($N \text{ mm}^{-1}$) mittels Boxplots dargestellt.

Die Einheit ist dabei in $N \text{ mm}^{-1}$ auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Die statistischen Testungen brachten keine signifikanten Unterschiede hervor.

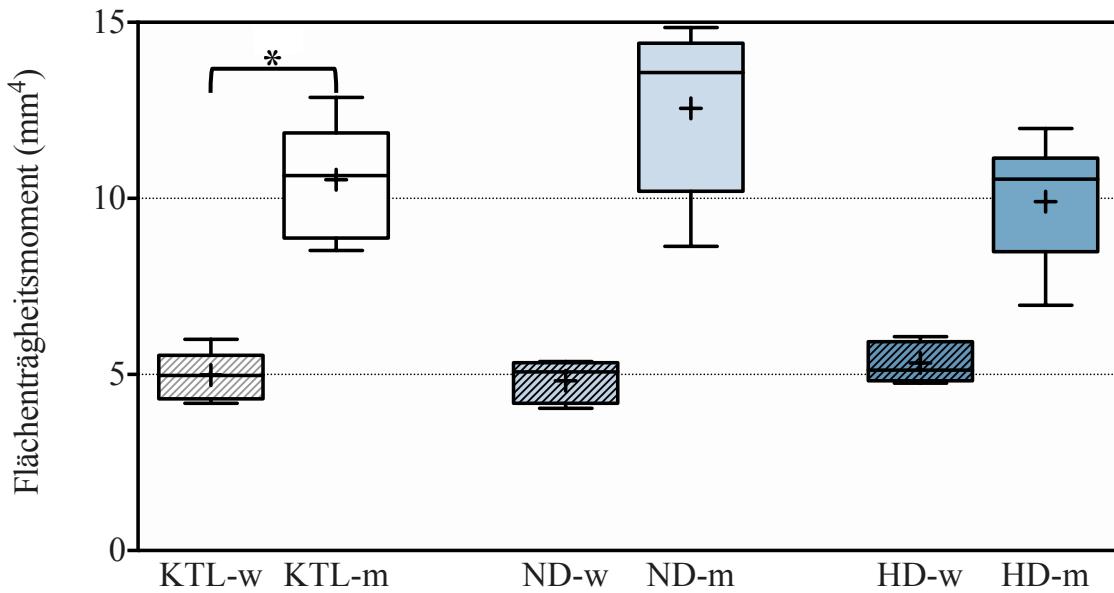


Abbildung 29: Flächenträgheitsmoment in mm^4 der Femora der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; $n=6$ KTL-w, $n=6$ KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; $n=5$ ND-w, $n=5$ ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; $n=5$ HD-w, $n=7$ HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots. Der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+), Signifikanzen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

In Abbildung 29 ist das Flächenträgheitsmoment („Area Moment of Inertia“) der Femora der weiblichen und männlichen Ratten, das im Dreipunkt-Biegetest ermittelt wurde, in mm^4 mittels Boxplots dargestellt. Das Flächenträgheitsmoment oder auch Flächenmoment zweiten Grades ist ein biomechanischer Parameter, der eine Aussage über die Rigidität eines Stoffes erlaubt. Ermittelt wird es im Rahmen der Biegebeanspruchung anhand des auf Basis des Querschnitts des Untersuchungsobjekts beruhenden Verformung durch die äußere Krafteinwirkung. Es ist der quadratische Abstand zur neutralen Achse eines jeden Flächenanteils.

Die Einheit ist dabei in mm^4 auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Es zeigte sich mit einem p-Wert von 0,04 im Vergleich der beiden Kontrollgruppen ein signifikant höheres Flächenträgheitsmoment auf Seiten der männlichen Kontrollgruppe. Zudem fiel mit einem p-Wert von 0,062 ein Trend bei Vergleich der männlichen Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe im Sinne eines höheren Flächenträgheitsmoments in der Hochdosisgruppe auf.

Die statistischen Testungen brachten keine weiteren signifikanten Unterschiede hervor.

4.3 Gewichtsverlauf

In diesem Abschnitt wird auf den Verlauf des Gewichts im Rahmen der experimentellen Studie Bezug genommen. Diese werden ebenfalls mit Boxplot-Grafiken zum Ausdruck gebracht.

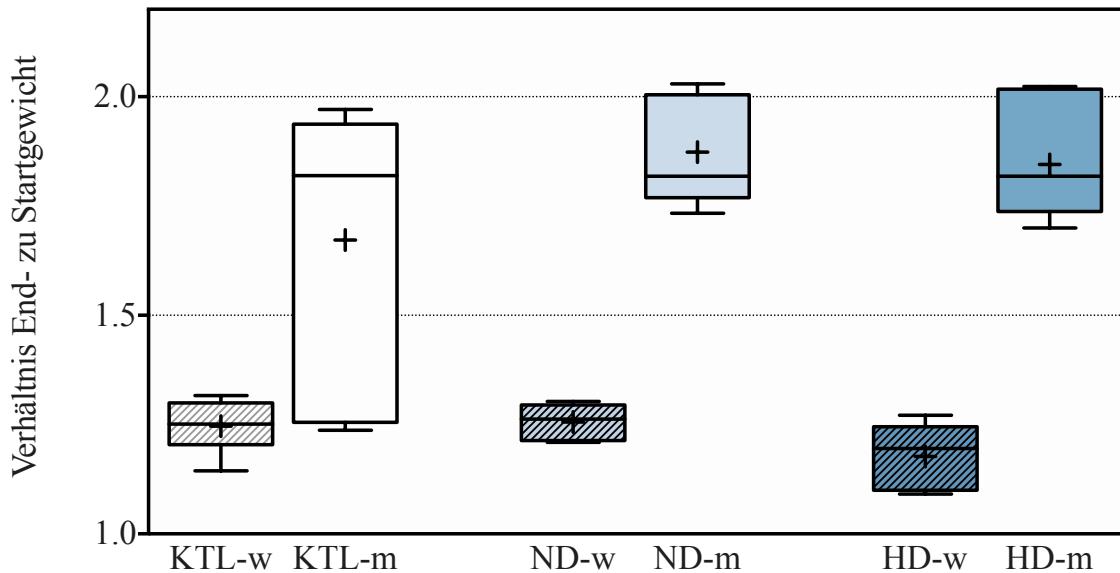


Abbildung 30: Verhältnis von End- zu Startgewicht der weiblichen (-w) und männlichen Ratten (-m) nach 12-wöchiger Gabe der Kontrolllösung (KTL; n=6 KTL-w, n=6 KTL-m), BPA-Niedrigdosis (ND; n=5 ND-w, n=5 ND-m) und BPA-Hochdosis (HD; n=5 HD-w, n=7 HD-m). Dargestellt sind die Daten als Boxplots, der Mittelwert ist mit einem Kreuz (+) gekennzeichnet.

In Abbildung 30 ist das Verhältnis von End- zu Startgewicht der weiblichen Ratten und männlichen Ratten mittels Boxplots dargestellt.

Das Verhältnis ist dabei einheitslos auf der Ordinate und die Gruppenzugehörigkeit auf der Abszisse vermerkt.

Mit einem p-Wert von 0,055 zeigte sich beim Vergleich der beiden Kontrollgruppen ein Trend im Sinne eines höheren Verhältnisses von End- zu Startgewicht bei der männlichen Kontrollgruppe.

Die statistischen Testungen brachten keine signifikanten Unterschiede hervor.

5. Diskussion

Inhalt dieses Teils der Dissertationsschrift war es die zuvor beschriebenen Ergebnisse auf Basis der Grundlagen zu diskutieren und ins kritische Verhältnis zueinander zu setzen. Es wird auf mögliche Gründe für die Ergebnisse und Zusammenhänge zwischen diesen Bezug genommen und es werden die Möglichkeiten und Limitationen dieser experimentellen Versuchsreihe erörtert.

Ziel war es herauszuarbeiten, ob sich experimentell ein statistisch nachweisbarer Einfluss von BPA auf die Knochenmorphologie und das biomechanische Verhalten des Knochens der Wistar-Ratte zeigen lässt.

5.1 Diskussion der Ergebnisse

Es zeigten sich bei der statistischen Analyse Signifikanzen vor allem im Vergleich der männlichen und weiblichen Kontrollgruppe, denen beiden kein BPA, sondern nur die Kontrolllösung DMSO, zugeführt wurde. Sie unterschieden sich bei Betrachtung der mittels Mikro-CT erhobenen Werte signifikant bezüglich der Femurlänge in mm ($p= 0,004$), des Verhältnisses des Anteils von Knochengewebe am Gesamtvolumen der untersuchten Probe ($p=0,018$), der Konnektivitätsdichte in mm^{-3} ($p=0,004$), der Anzahl der Trabekel in mm^{-1} ($p=0,01$), der Dicke der Trabekel in mm ($p=0,025$), des Abstandes der Trabekel in mm ($p=0,01$), der Gesamtquerschnittsfläche in mm^2 ($p=0,004$), der Fläche der Kortikalis im Querschnitt in mm^2 ($0,004$) sowie der Fläche des Knochenmarks im Querschnitt in mm^2 ($p=0,004$).

Hinsichtlich der biomechanisch ermittelten Werte nach Untersuchung der Femora der beiden Kontrollgruppen durch den Dreipunkt-Biegetest zeigten sich signifikante Unterschiede des Flächenträgheitsmoments in mm^4 ($p=0,004$), der maximal ausgeübten Kraft in N ($p=0,01$), der maximalen Deformation in mm ($p=0,016$) sowie der zugeführten Energie in mJ ($p=0,004$).

Diese Unterschiede der beiden Geschlechter kommen, wie bereits beschrieben, durch den geschlechtsspezifischen Größen- und Gewichtsunterschied zustande. Denn durch die größeren Knochen bzw. längeren Femora steigen unter anderem auch die Gesamtquerschnittsfläche der Kortikalis und die Dicke der Trabekel, was wiederum dazu führt, dass der Knochen, gemessen anhand von biomechanischen Parametern, stabiler wird. Diese höhere Stabilität zeichnet sich dann im Dreipunkt-Biegetest ab.

Da sich beim Vergleich der beiden Geschlechter bereits innerhalb der Kontrollgruppen diese deutlichen Unterschiede abzeichnen, ist bei derart unterschiedlichen Vergleichsgruppen der Vergleich zwischen den jeweiligen Niedrig- und Hochdosisgruppen aus statistischer Sicht in seiner Aussagekraft beschränkt und zu vernachlässigen.

Bei Durchführung des Kruskal-Wallis-Tests zur Differenzierung des Zusammenhangs der vom Geschlecht abhängigen Beeinflussung der jeweiligen zusammengefassten Niedrigdosis-, Hochdosis- und Kontrollgruppen zeigte sich innerhalb der weiblichen Gruppe beim Verhältnis von Knochengewebe zum gesamten Gewebe ein Trend ($p=0,075$). Bei weiterer Untersuchung mittels Mann-Whitney-U-Test zwischen jeweils zwei Gruppen zeigte sich dieser Trend bezüglich des genannten Parameters sowohl im Vergleich der weiblichen Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe ($p=0,76$) als auch im Vergleich der weiblichen Hochdosis- und Kontrollgruppe ($p=0,76$). In beiden Fällen war der Wert in der Hochdosisgruppe höher als der jeweilige Vergleichswert.

Weitere statistische Zusammenhänge im Sinne von Trends zeigten sich ebenfalls im weiblichen Kollektiv beim Vergleich von Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe einerseits bezüglich der Anzahl an Trabekeln in mm^{-1} ($p=0,076$) und andererseits in der Gesamtquerschnittsfläche der Femora in mm^2 ($p=0,076$). In diesen Fällen war aber die Anzahl der Trabekel und die Gesamtquerschnittsfläche des Knochens in der Niedrigdosisgruppe der weiblichen Ratten höher.

Bei den männlichen Ratten waren mittels Mann-Whitney-U-Test Trends im Vergleich der Niedrigdosis- mit der Hochdosisgruppe bei der Femurlänge ($p=0,062$), bei der Gesamtquerschnittsfläche des Knochens ($p=0,062$) und der Querschnittsfläche der Kortikalis ($p=0,088$) auszumachen. Die Femora waren in diesem Vergleich in der Hochdosisgruppe länger bei geringeren Werten der Querschnittsfläche der Kortikalis ebendieser Femora.

Die Querschnittsfläche des Knochenmarks war in der weiblichen Hochdosisgruppe signifikant höher als in der weiblichen Niedrigdosisgruppe ($p=0,047$).

Im Rahmen der statistischen Auswertung der biomechanischen Parameter zeigten sich Trends nach Durchführung des Mann-Whitney-U-Test bezüglich der maximalen Deformation in mm ($p=0,076$) und der maximalen Dehnung ($p=0,076$) beim Vergleich von weiblicher Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe. Beim Vergleich von männlicher Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe zeichnete sich ein statistischer Zusammenhang beim

Flächenträgheitsmoment ($p=0,062$) ab. Es wurden dabei höhere Werte in der Niedrigdosisgruppe ermittelt.

In Anbetracht der Ergebnisse und damit verbundenen Trends sowie dem signifikanten Unterschied der Querschnittsfläche des Knochenmarks im Vergleich von weiblicher Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe zeigen sich diese Unterschiede vermehrt auf Seiten der weiblichen Ratten. In diesem Kollektiv liegen die statistischen Trends bis auf die Ausnahme des Verhältnisses von Knochengewebe zum gesamten Gewebe, wo sich im Vergleich der Hochdosis- und Kontrollgruppe Unterschiede zeigen, allesamt im Vergleich der Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe vor.

Bei den männlichen Tieren zeigen sich keine signifikanten Unterschiede und die statistischen Trends sind allesamt im Vergleich von Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe angesiedelt.

Die von Chin et al. beschriebene Zunahme der trabekulären Architektur männlicher und weiblicher Rattenfemora und Abnahme der mechanischen Festigkeit der weiblichen Ratten nach BPA-Exposition konnte in den Versuchen nicht mittels aller Parameter gezeigt werden (84). Es zeigte sich beim Verhältnis von Knochengewebe am Gesamtquerschnitt („VOX BV/TV“) ein Trend in der weiblichen Hochdosisgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie auch im Vergleich der weiblichen Niedrigdosis- zur Hochdosisgruppe. In beiden Fällen war der Knochenanteil am Gesamtgewebe statistisch in Form eines Trends höher in der Gruppe, die BPA in einer höheren Dosis exponiert wurde. Eine statistisch als Trend bezeichnete höhere Anzahl an Trabekeln in mm^{-1} in der weiblichen Hochdosisgruppe verglichen mit der Niedrigdosisgruppe wirkt verstärkend auf die Annahme, dass BPA durch seine xenoöstrogene Wirkung und Interaktion im Knochenmetabolismus zu einer Zunahme der trabekulären Strukturen im Rattenknochen führt. Dem kommt hinzu, dass bei Vergleich der Gesamtquerschnittsfläche der Femora der weiblichen Hochdosis- und Niedrigdosisgruppe diese in der Hochdosisgruppe im Sinne eines Trends höher ist. Zudem ist die Querschnittsfläche des Knochenmarks in mm^2 in der weiblichen Hochdosisgruppe signifikant höher als in der weiblichen Niedrigdosisgruppe.

Im Gegensatz dazu ist ein Trend in der männlichen Hochdosisgruppe im Vergleich zur Niedrigdosisgruppe bezüglich einer in der Niedrigdosisgruppe höheren Gesamtquerschnittsfläche des Knochens in mm^2 auffallend.

Dieser Trend bezüglich der Gesamtquerschnittsfläche in mm^2 im männlichen Rattenkollektiv kann als hinweisend auf einen möglichen Schwellenwert von BPA diskutiert werden, indem

dieses zumindest im weiblichen Kollektiv osteoinduktiv wirkt, bei den männlichen Tieren aber in höherer Dosis zu einer Negativbilanz des Knochenstoffwechsels führt.

Oben genannter statistisch signifikanter Wert, die Querschnittsfläche des Knochenmarks in mm^2 , ist singulär betrachtet nicht eindeutig in den Kontext einzuordnen. Möglich für signifikant höhere Werte der weiblichen Hochdosisgruppe im Vergleich zur Niedrigdosisgruppe ist auf der einen Seite ein durch BPA bedingter größerer Knochen mit konsekutiv größerem Markraum, sowie auch einer dickeren Kortikalis in mm. Die Kortikalis stellte sich in den Untersuchungen aller Gruppen aber weder als Trend noch als statistisch signifikant dicker dar. So verhielt es sich auch mit der Fläche der Kortikalis im Verhältnis zur Gesamtquerschnittsfläche. Bei Betrachtung der kortikalen Querschnittsfläche allein war beim Vergleich der weiblichen Ratten keinerlei statistischer Unterschied auffallend. Bei Vergleich der männlichen Niedrigdosis- und Hochdosisgruppen war hingegen eine größere Fläche in der Niedrigdosisgruppe als Trend zu verzeichnen. Zu diskutieren ist hingegen ebenfalls eine größere Querschnittsfläche des Knochenmarks zu Ungunsten der kortikalen Begrenzung dieser Fläche. Dies würde gegen die Annahme sprechen, dass mit steigender BPA Exposition die Knochenstruktur und Stabilität immer weiter zunimmt.

In der biomechanischen Untersuchung zeigten sich keinerlei signifikante Unterschiede, weder im weiblichen noch im männlichen Rattenkollektiv.

Bei den weiblichen Versuchstieren zeichneten sich in den biomechanischen Untersuchungen jedoch Trends im Vergleich der Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe ab. Sowohl die maximale Deformation in mm als auch die maximale Dehnung waren in der Niedrigdosisgruppe höher. Es wurde also in der weiblichen Hochdosisgruppe eine geringere Dehnung sowie eine geringere Deformation des Knochens bis zum Bruch gemessen. Bei der Betrachtung der Ergebnisse der männlichen Ratten war das Flächenträgheitsmoment in der Niedrigdosisgruppe im Sinne eines Trends höher als in der Hochdosisgruppe, es zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied. Dies wäre hinweisend auf einen durch die Femora der Niedrigdosisgruppe höheren Widerstand im Rahmen des Dreipunkt-Biegetests, was die Annahme einer stabilitätsfördernden Wirkung von BPA im Niedrigdosisbereich bekräftigen würde.

Bei Begutachtung der Femurlänge in mm und der Gesamtquerschnittsfläche der Knochen, sowie der Querschnittsfläche der Kortikalis in mm^2 , zeigten sich diese Parameter als Trend in der Niedrigdosisgruppe im Vergleich zur Hochdosisgruppe allesamt höher. Dies wäre ebenfalls hinweisend auf eine durch BPA vermittelte Wirkung im Sinne einer Induktion des Knochenwachstums bei geringer Dosierung und den Knochenmetabolismus einschränkenden Effekt bei der Zufuhr von hochdosiertem BPA.

Darüber hinaus ließen sich wie oben beschrieben keine weiteren signifikanten Unterschiede oder Trends der Messergebnisse in den durchgeführten statistischen Tests, dem Kruskal-Wallis-Test, sowie dem Mann-Whitney-U-Test eruieren.

Weitere Studien zur Wirkung von BPA auf den Knochen brachten hervor, dass dieses zu oxidativem Stress in Zellen des Knochenmarks, Lymphozyten und Hoden- sowie Nebenhodengewebe führt (104). Außerdem beeinflusst BPA nach einer Studie von Miki et al. über Steroidrezeptoren humane fetale und adulte Osteoblasten den Knochenstoffwechsel (105). Eine Interaktion mit Osteoklasten konnte nicht gezeigt werden. Auffallend war aber darüber hinaus eine Aktivierung der Zellproliferationsrate und die Akkumulation von Kollagen in Osteoblasten, weshalb die Autoren die Hypothese aufstellten, dass BPA den Knochenstoffwechsel des Menschen negativ beeinflusst. In einer Studie von Lind et al. wurde herausgefunden, dass es bei männlichen Nachkommen trächtiger Ratten, denen BPA in geringer Dosis über das Trinkwasser verabreicht wurde, zu einer reduzierten Femurlänge und einer verringerten trabekulären Fläche kommt (106). Dies steht im Kontrast zu dem Trend, der sich in dieser Versuchsreihe im Vergleich der männlichen Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe abzeichnete. Denn nach Re-Evaluation dieser Ergebnisse mit 52 Wochen alten Ratten zeigten sich in der männlichen Kohorte, die pränatal vermehrt BPA ausgesetzt war, eine Normalisierung der erhobenen Parameter zur Bewertung der Knochenstrukturen angeglichen an die Kontrollgruppe. Die Autoren beschreiben bei zwei der weiblichen Ratten aus der BPA-exponierten Gruppe auffallend hohe Dicken der Kortikalis. Dieses Ergebnis konnte in unserer Untersuchung nicht reproduziert werden. Biomechanische Untersuchungen von Lind et al. mittels Dreipunkt-Biegetest zeigten, dass die Steifigkeit der Knochen der weiblichen Gruppen, denen BPA zugeführt wurde, herabgesetzt war. Darauf deuten auch die Trends im Rahmen dieser tierexperimentellen Studie im Vergleich der Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe bezüglich der maximalen Deformation und der Dehnung der weiblichen Rattenfemora hin. Diese Parameter waren in der weiblichen Niedrigdosisgruppe im Vergleich höher als die der Hochdosisgruppe des gleichen Geschlechts. Dies deutet auf eine höhere Dehnbarkeit der Rattenfemora der Niedrigdosisgruppe hin. Eine erhöhte Rigidität ist damit in unserer Studie in der weiblichen Hochdosisgruppe zu beschreiben und kann hinweisend für eine erhöhte Knochenmineralisation bei weitaus höherer BPA-Exposition sein. Zwischen Hochdosis- und Kontrollgruppen waren hingegen bei unserem Versuchsaufbau keine Trends oder Signifikanzen auszumachen. Darüber hinaus beobachteten Lind et al. ein erhöhtes Aufkommen fibrotischer Läsionen im Knochenmark und zudem erhöhte Entzündungsparameter der untersuchten Ratten (107). Eine Studie von Lejonklou et al. zeigte verlängerte Rattenfemora

beim weiblichen Nachwuchs von über Sondenernährung BPA-exponierten Muttertieren sowie eine dickere Kortikalis des männlichen Nachwuchses bei nicht signifikant veränderten biomechanischen Versuchsergebnissen (108). Signifikante Unterschiede bezüglich der biomechanischen Untersuchungen konnten durch diese experimentelle Studie ebenfalls nicht gezeigt werden.

Die deutlichen Unterschiede der ermittelten Konnektivitätsdichte der männlichen und weiblichen Ratten ist in Zusammenschau der Ergebnisse zu vernachlässigen und auf die unterschiedlichen Größen zwischen den Geschlechtern zu beziehen. Dies hat vor allem hinsichtlich des hormonell beeinflussten Knochenstoffwechsels und dem geschlechtsbedingt unterschiedlichen Hormonprofil isoliert betrachtet eine untergeordnete Bedeutung. Es zeigen sich innerhalb der drei Gruppen bei beiden Geschlechtern keine signifikanten Unterschiede.

5.2 Diskussion von Limitationen, Materialien und Methoden

Im Rahmen dieser experimentellen Studie wurden 18 männliche und 18 weibliche Ratten unter kontrollierten Bedingungen für zwölf Wochen in der zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für experimentelle Chirurgie der Universität Rostock gehalten. Aus dem Kollektiv der weiblichen Hochdosisgruppe verstarben zwei Ratten im Rahmen der ersten Narkose, sodass insgesamt 34 statt 36 in die statistische Auswertung miteinbezogen wurden. Im Abstand von vier Wochen erfolgten die operativen Wechsel der zuvor im Bereich des Rückens subkutan implantierten osmotischen Pumpen. Es wurde zuvor eine Einteilung in eine Kontroll-, Niedrig- und Hochdosisgruppe vorgenommen. Dieser Abstand war aufgrund der eingeschränkten Haltbarkeit beziehungsweise Kapazität der osmotischen Pumpen für eine kontinuierliche, zuverlässige und somit vergleichbare Abgabe der BPA enthaltenden Lösung vonnöten (109-111). Damit wurde die Grundlage geschaffen, den Einfluss von BPA dosisabhängig und geschlechtsspezifisch in den einzelnen Gruppen darstellen zu können. Darüber hinaus erfolgte die Dokumentation des Gewichts und dessen Veränderung in vierwöchigen Abständen bis zum Tag der letzten Operation und Euthanasie.

Vorteil dieses experimentellen Versuchsaufbaus ist zum einen, dass mögliche Effekte des untersuchten Stoffes BPA unmittelbar und *in vivo* beobachtet werden können. Außerdem handelte es sich bei den verwendeten Ratten um Jungtiere, somit war es möglich, den Einfluss von BPA auf Organismen mit erhöhter Rate vor allem des Knochenstoffwechsels im Rahmen des Wachstums zu beobachten. Von Vorteil ist ein somit vulnerablerer Organismus mit der Möglichkeit, negative Effekte gegebenenfalls umso deutlicher darstellen zu können. Ein

solcher Versuchsaufbau kann durch kein in vitro-Modell bewerkstelligt werden, da Pathogenese und Wechselwirkungen innerhalb eines Nagetiers wie der Wistar-Ratte nicht durch eine artifiziell geschaffene Untersuchungsbedingung abgebildet werden kann. Der Säugetierorganismus ist zu komplex, um ihn in Gänze in vitro zu rekonstruieren. Es steht die Wirkung auf den gesamten Organismus mitsamt des Metabolismus und schlussendlich möglichen Auswirkungen auf die knöcherne Struktur und das Verhalten im Rahmen von biomechanischen Untersuchungen post mortem bei chronischer Zufuhr der Chemikalie BPA im Mittelpunkt. Diese Fragestellung ließe sich ohne das Tiermodell nicht beantworten.

Die subkutane Applikation mittels Osmose, also der Diffusion durch eine semipermeable Membran, gehört zur gängigen Praxis im Rahmen von tierexperimentellen Studien und wird auch für die Verabreichung von BPA angewandt (112). Prinzipiell wäre auch eine orale Applikation über das Trinkwasser oder die zur Verfügung gestellte Nahrung denkbar gewesen, dabei ist jedoch keine vergleichbare kontinuierliche Applikation wie durch die osmotischen Pumpen zu garantieren, weshalb davon abgesehen wurde. Nachteilig ist bei der operativen Implantation und Wechsel der osmotischen Pumpen gewiss ein stets unbestreitbares perioperatives Risiko im Rahmen der Narkoseeinleitung, -aufrechterhaltung und der Phase nach der Operation. Zudem ist die Gefahr der Wundheilungsstörung und -infektion gegeben, welche ebenso wie eine Narkose zum Tod der Ratte hätte führen können. Zudem ergeben sich durch die den Anschaffungspreis der osmotischen Pumpen höhere Kosten. In Anbetracht der bekannt toxischen Wirkungen von BPA wäre es ethisch nicht zu vertreten die Wirkung der in dieser Arbeit verwendeten Dosierungen auf den menschlichen Körper in oral, subkutan oder intravenös zugeführten Dosen in vivo am Menschen zu untersuchen.

Entsprechend der Gruppeneinteilung in Niedrigdosis-, Hochdosis- und Kontrollgruppen entsprach die Tagesdosis in der Niedrigdosisgruppe 2,55 µg BPA pro Ratte und in der Hochdosisgruppe 39 µg BPA pro Ratte. Umgerechnet auf einen erwachsenen Menschen wären dies 714 µg BPA pro Tag in der Niedrigdosisgruppe und 10920 µg BPA pro Tag in der Hochdosisgruppe.

Diese Werte sind im Niedrigdosisbereich wie oben bereits beschrieben angelehnt an die akzeptable tägliche Einnahmemenge für den menschlichen Organismus, die durch die EFSA für den Menschen bestimmt und wenn notwendig aktualisiert angepasst wird (113). Die Hochdosismenge orientiert sich an der Menge BPA, bei der im Rahmen von oben beschriebenen Studien mit dergleichen oder geringeren Dosierungen schädigende Wirkungen nachgewiesen worden sind (114). Die Hochdosisgruppe mit einer täglichen Aufnahmemenge von 39 µg pro Ratte und Tag resultierte daraus einen Dosisbereich zu bestimmen, in welchem

negative Auswirkungen von BPA bei gleicher oder geringerer Dosierung beobachtet wurde. Zu letztem Punkt zählen unter anderem die reproduktionstoxische Wirkung (73, 76), aber auch die von BPA als endokriner Disruptor vermittelte xenoöstrogene Wirkung (84).

Außerdem erfolgte die Unterteilung in Gruppen geschlechtsbezogen. Dies diente der Möglichkeit geschlechtsspezifische Einflüsse von BPA näher beleuchten zu können.

Die Untersuchungen erfolgten allesamt an Jungtieren. Dies hatte den Vorteil, dass der Organismus noch nicht ausgereift war und potentielle Einflüsse von BPA auf die Entwicklung der knöchernen Struktur so den größtmöglichen Effekt haben könnten. Dies schließt das Längen- und Dickenwachstum der Knochen genauso ein, wie die bildmorphologische Struktur und die biomechanische Stabilität. Es wurde ein Untersuchungszeitraum von 12 Wochen gewählt. Eine Limitation besteht darin, dass damit demnach nicht abzubilden ist, ob und inwieweit BPA sich über einen noch längeren Zeitraum auf den Organismus der Ratte auswirkt. Möglicherweise kommt es erst im Verlauf zur Manifestation von Folgeerscheinungen, die im Zeitraum von 12 Wochen nicht abgebildet werden konnten.

Allgemein ist zu beachten, dass es bei Betrachtung der Ergebnisse und deren Diskussion durch fehlende definierte Referenzwerte ohne Bezug auf das im konkreten Versuchsaufbau betrachtete Kollektiv nicht möglich ist, valide und verbindliche Aussagen hinsichtlich der Interpretation der Ergebnisse aus den biomechanischen Untersuchungen und der Mikro-CT-Untersuchung zu treffen. Demnach gilt die Kontrollgruppe des jeweiligen Geschlechts stets als Referenzwert für die Interpretation der Ergebnisse.

Die mit 34 Ratten begrenzte Anzahl an Versuchstieren und die in diesem Zusammenhang vergleichsweise große Anzahl an Gruppen führen unter anderem dazu, dass sich durch kleine Untersuchungsgruppen wenig Signifikanzen und Trends abzeichnen. Zudem bestehen, mitbedingt durch die geringen Gruppengrößen, zwischen den einzelnen Tieren und Gruppen Varianzen, die dies erschweren, und es besteht wie in Abschnitt 11.3 ersichtlich keine Normalverteilung. Darüber hinaus ist es durch die bestehenden Größenunterschiede zwischen den Geschlechtern und damit verbundenen differierenden Messergebnissen in der biomechanischen Testungen sowie auch der Mikro-CT-Untersuchung nicht möglich, die beiden Geschlechter zusammenfassend zu begutachten. Nichtsdestotrotz würden sich Effekte von BPA auch bei einem Rattenkollektiv von der oben genannten Größe zeigen, sofern die Effektstärke hoch genug wäre. Mit der Effektstärke ist hierbei die Wirkung bzw. die mögliche Wirkung von BPA auf den Knochen der Ratte gemeint. Veränderungen der Knochenarchitektur oder der biomechanischen Beschaffenheit der untersuchten Knochen, die möglicherweise durch die applizierten Dosen BPA hervorgerufen werden, ließen sich im Rahmen dieses Experiments nur

bezüglich der Fläche des Knochenmarks im Querschnitt (Marrow Area) ausmachen. Es ist daher möglich, dass der Einfluss von BPA in diesen Dosen keinen signifikanten Einfluss hat oder aber einen so geringen, dass eine Vergrößerung des Untersuchungskollektivs vornötig wäre, um einen Einfluss nachweisen zu können.

Dazu kommt, dass die Werte anderer Studien bei inhomogenem Aufbau der Versuche über verschiedene Dosierungen des BPAs, unterschiedliche Untersuchungszeiträume und Evaluationsmethoden für konkrete Zahlenwerte nur begrenzt ins Verhältnis zu setzen sind und ein in vivo Monitoring von BPA nicht zuletzt durch eine verhältnismäßig geringe Halbwertszeit schwierig ist.

Bezüglich der Mikro-CT Bildgebung wurde ein hohes Maß an Zielgenauigkeit und Reliabilität im Vergleich zu herkömmlichen Methoden sowohl in Tierstudien (115-119) als auch in Studien im Bereich der Humanmedizin gezeigt (120-124).

Kritikpunkt der Mikro-CT ist, dass die Trabekel verglichen mit der realen Dicke als zu dick dargestellt werden würden. Dass diese im Vergleich zu histomorphologischen Untersuchungen als zu hoch eingestuft wird, begründen Bouxsein et al. 2010 (99) mit mehreren Argumenten beziehungsweise Fehlerquellen. Dazu führen könnte eine zu niedrige Auflösung der Mikro-CT-Bilder, um trabekuläre Strukturen des Knochens realitätsgemäß darzustellen. Außerdem geht die histomorphologische 2D-Untersuchung von einem planaren Gewebe aus und ermittelt die 3D-Rekonstruktion nicht direkt, wie es bei der Mikro-CT-Untersuchung der Fall ist. Des Weiteren könnte ein schlecht ausgewählter Grenzbereich für die Schichten zu einer schlechteren Aussagekraft der Ergebnisse führen. Die Tatsache, dass 3D-Rekonstruktionen der Mikro-CT-Untersuchung zur Ermittlung trabekulärer Strukturen stets trabekuläre Schnittpunkte bzw. Verzweigungsstellen miteinbeziehen, kann die Qualität der Ergebnisse ebenfalls einschränken. Dies führt im Nachgang in den Messergebnissen wiederum zu einer fälschlicherweise zu hoch gemessenen Dicke der Trabekel (99). Zusammenfassend besteht aber trotz der oben genannten Schwächen eine hohe Messgenauigkeit des Mikro-CTs bezüglich der Parameter der kortikalen und trabekulären Dicke, was es zu einer Untersuchungsmethode macht, die für ebendiese adäquat zurate gezogen werden kann.

Einen Vorteil der Messmethode des Mikro-CTs stellt verglichen mit histomorphologischen Vorgehensweisen nicht nur die bereits genannte direkte 3D-Rekonstruktion der trabekulären Knochenstrukturen dar. Dabei wird beim trabekulären Knochen vor allem die Dicke und Unterteilung der Trabekel und des Untersuchungsobjekts begutachtet und nicht eine Ableitung dieser Beschaffenheit von zuvor gewonnenen zweidimensionalen Daten erstellt. Weitere Vorteile bestehen im Vergleich zu histologischen Untersuchungsmethoden, dass ein weitaus

größerer Abschnitt analysiert werden kann, die Untersuchung deutlich schneller durchzuführen ist, da keine Entkalkung des Knochenpräparats vonnöten ist und zuletzt auch, dass das Untersuchungsobjekt keinen Schaden durch dieses bildgebende Verfahren davonträgt. Die Untersuchung kann demzufolge mehrfach ohne schädigende Wirkung zu haben oder in jedweder Hinsicht modifizierende Einflüsse auf die Qualität des Präparats zu besitzen wiederholt werden. Es können sich zusätzliche Untersuchungen beispielsweise biomechanische Testungen, wie auch im Rahmen dieser experimentellen Studie, problemlos anschließen (99). Zusätzlich ist es bis zu einer Größe von ca. 20 cm möglich Objekte abzubilden, was vor allem in Tiermodellen von eindeutigem Vorteil ist. Dabei ist zu beachten, dass die Größe und die Dichte der untersuchten Knochenproben Einfluss auf das Messergebnis der Knochendichthemessung mittels Mikro-CT haben und zu verfälschten Ergebnissen führen können (125).

Zuletzt ist durch den zusätzlich möglichen Einsatz dieses bildgebenden Verfahrens am lebenden Objekt, also *in vivo*, ein hohes Maß an Flexibilität gegeben (117). Dies macht die Mikro-CT-Diagnostik unabhängig von der mit ihr einhergehenden hohen Auflösung und Aussagekraft bezüglich ossärer Strukturen, zu einem häufig eingesetzten diagnostischen Verfahren.

Limitationen bestehen nicht nur in dem begrenzten Untersuchungszeitraum und der geringen Gruppenstärke, sondern auch in einer möglichen Schädigung der Knochen durch die Lagerung bei -18 °C in Formaldehydlösung. Sofern von einer Schädigung ausgegangen wird, sind von dieser aber alle Knochen ungeachtet der Geschlechts- oder Gruppenzugehörigkeit betroffen. Zudem wurde wie bereits angedeutet bei kurzer Halbwertszeit und diagnostisch schwieriger Umsetzung auf eine Messung von BPA im tierischen Gewebe, Blut, Serum oder Urin verzichtet.

Die gewählten Untersuchungsmethoden stellen nur einen selektiven Einblick in bestimmte Aspekte des Knochens der Ratten dar. Es ist denkbar, dass durch die Auswahl der Untersuchungsmethoden Effekte von BPA auf anderer, zum Beispiel molekularer, Ebene bestehen und durch den Versuch nicht erfasst worden sind.

5.3 Ausblick

In der Bundesrepublik Deutschland und in der Europäischen Union („EU“) beziehungsweise Europa wird die Verwendung von BPA viel diskutiert und zunehmend reduziert. So ist seit dem 01. Juni 2011 in der Europäischen Union der Verkauf von Flaschen für Säuglinge, die unter

anderem aus Polycarbonat bestehen und BPA als Bestandteil enthalten, verboten (126). Seit dem 26. November 2018 greift die durch die Europäische Union beschlossene Obergrenze maximal austretender BPA-Menge aus Kunststoffspielzeug von 0,04 mg BPA pro Liter (127). In der Veröffentlichung „Wissenschaftliches Gutachten über die Risiken für die öffentliche Gesundheit im Zusammenhang mit dem Vorkommen von Bisphenol A (BPA) in Lebensmitteln“ von Mitarbeitern des Gremiums für „Materialien, die mit Lebensmitteln in Berührung kommen, Enzyme, Aromastoffe und Verarbeitungsstoffe“ der EFSA („European Food Safety Authority“, „Europäische Lebensmittelbehörde“) aus dem Jahr 2015, neun Jahre nach der vorigen Stellungnahme 2006, wurde das Risiko von BPA erneut eingestuft. Der Wert für die tolerierbare tägliche Aufnahmemenge („tolerable daily intake“, „TDI“) wurde von bislang 50 auf 4 µg BPA pro kg Körpergewicht reduziert (128). Im Rahmen unserer Studie erhielten die Ratten BPA in Dosen von 2,55 µg pro Tag in der Niedrigdosisgruppe und 39 µg pro Tag in der Hochdosisgruppe. Mit der Annahme eines Rattengewichts von circa 250 g ergäben sich hierbei bei Übertragung auf einen 70 kg schweren Menschen Dosierungen von etwa 714 µg BPA pro Tag in der Niedrigdosisgruppe und 10920 µg BPA pro Tag in der Hochdosisgruppe. Dies ergibt eine BPA-Zufuhr von 10,2 µg pro kg pro Tag in der Niedrigdosisgruppe und von 156 µg pro kg pro Tag in der Hochdosisgruppe. Laut des Gutachtens der EFSA gehe von BPA für jedwede Altersklasse kein Risiko für die Gesundheit aus. Die Aufnahme von BPA läge mit einem Fünftel bis zu einem Drittel der oben genannten täglich tolerierbaren Aufnahmemenge noch im zu akzeptierenden Bereich. Grundlage der Berechnung der TDI-Werte war für die zuständigen Mitarbeiter des EFSA die sogenannte „Benchmark-Dosis“ („BMD“), „Benchmark“ bedeutet aus dem Englischen übersetzt Grenz- oder Bezugswert. Die BMD entspricht dem Wert beziehungsweise der Dosis oder Konzentration verabreichten BPAs pro kg pro Tag, die im Tierversuch mit Mäusen zu einer Schädigung der Nieren führte und lag einst bei 8960 µg pro kg pro Tag. Als Schädigung wurde eine Beeinflussung des Gewichts des Organs um 10 % definiert.

Im Jahre 2010 sind bei der Berechnung neue toxikologische Studien mit besserer Verwertbarkeit und Übertragungsmöglichkeiten auf den menschlichen Körper mit eingeflossen. Der Wert für den Menschen wurde auf Basis oben genannter Beobachtungen und Berechnungen als menschliche Äquivalentdosis von 609 µg pro kg pro Tag definiert. Er steht für jedwede Zufuhr von BPA, ob oral, transdermal oder inhalativ. Auf diese oben genannte menschliche Äquivalentdosis ist der Europäischen Lebensmittelbehörde zufolge zudem noch der von der Behörde berechnete Gesamtunsicherheitsfaktor von 150 anzuwenden, der sich aus Unsicherheiten der Übertragbarkeit zwischen den verschiedenen Individuen, Unsicherheiten im

Hinblick auf Metabolismus und Ausscheidung des Stoffes sowie Unsicherheiten bezüglich der Effekte auf die primären und sekundären Geschlechtsorgane, das Immun-, Nerven- und Stoffwechselssystem zusammensetzt (129). Die in den oben genannten Studienergebnissen ermittelten Beeinflussungen von Organfunktionen seien mit Messungenuigkeiten behaftet, die die EFSA in ihrer Begutachtung berücksichtigt habe (128). 2017 beschloss ein Expertenkomitee der EFSA die Erstellung und Führung eines Protokolls bezüglich der möglichen mit BPA verbundenen Gefahren für die Gesundheit (113). Eine Gruppe aus Wissenschaftlern wird gemäß dieses Protokolls und aktueller Studienergebnisse, die nach der Bewertung 2015 veröffentlicht wurden, voraussichtlich noch 2020 eine Neubewertung des Stoffes BPA vornehmen (130).

Das Bundesinstitut für Risikobewertung der Bundesrepublik Deutschland teilt die Meinung mit der Europäischen Lebensmittelbehörde. Mitarbeiter des Bundesinstituts seien aktiv an der Einschätzung von BPA durch die EFSA eingebunden gewesen (15). Außerdem bewertete das Bundesinstitut für Risikobewertung im August 2018 die Annahme als „unwahrscheinlich“, dass zwischen einer BPA-Exposition und einem Auftreten der Molaren-Inzisiven-Hypomineralisation ein Zusammenhang bestehe (131). Es stellt sich außerdem hinter die im Dezember 2015 von der Europäischen Chemikalienagentur (ECHA) gefällte Entscheidung, dass BPA in Thermopapier mit einer Konzentration von 0,02 % oder mehr seit Januar 2020 nicht mehr enthalten sein darf (4). Die ECHA hat BPA darüber hinaus im Juli 2016 als reproduktionstoxisch in der Kategorie 1b nach der EU-Chemikalienverordnung „CLP“ („Classification, Labelling and Packaging“) eingeordnet. Zudem erfolgte zu Beginn des Jahres 2017 die Klassifikation als besonders besorgniserregende Substanz („Substances of Very High Concern“, SVHC) und die Aufführung auf der „REACH“-Kandidatenliste der ECHA (132). Dabei ist „REACH“ ein Akronym für eine EU-Chemikalienverordnung und steht für die englischen Begriffe „Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals“, also einer Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien, die am 01. Juni 2007 in Kraft getreten ist (133). Hinsichtlich der Bezeichnung von BPA als „Endokrinen Disruptor“ sieht die EFSA die Kriterien im Gegensatz zur ECHA (134) und des Bundesinstituts für Risikobewertung als nicht ausreichend erfüllt an (135).

Der Einfluss von BPA auf die bildmorphologische Struktur in der Mikro-CT-Diagnostik sowie auf die Stabilität des Knochens der männlichen und weiblichen Wistar-Ratte wird anhand dieser Studie als gering eingestuft. Es sind weitere Untersuchungen mit unter anderem größerer Anzahl an Versuchstieren notwendig, um dezidiertere Aussagen über den Einfluss von BPA

auf den Knochen der Wistar-Ratte zu tätigen. Anzumerken ist jedoch, dass sich selbst bei Zufuhr von BPA in hoher Dosis bis auf die Fläche des Knochenmarkbereichs lediglich Trends im Vergleich der verschiedenen Behandlungsgruppen zeigten. Bei hohem Einfluss bzw. schädigender Wirkung von BPA auf die Knochenstruktur und -stabilität der Wistar-Ratte würden sich Einflusse jedoch auch schon bei der Gr e eines Kollektivs, wie es in dieser Studie gewählt wurde, zeigen.

6. Zusammenfassung

Bisphenol A stellt weltweit eine der am meisten synthetisierten chemischen Verbindungen dar. Dies ist unter anderem durch das Vorkommen in zahlreichen Kunststoffen begründet (5). Der Mensch steht somit im unweigerlichen Kontakt zu dieser Chemikalie. BPA hat durch seine verschiedenen Wirkungen auf den tierischen und menschlichen Organismus das Potenzial diesen auf mehreren Ebenen mitunter durch die Wirkung als Xenoöstrogen zu beeinflussen. Nicht zuletzt aus diesem Grund ist es von besonderem Interesse diese Einflüsse zu untersuchen. Öffentlich ist BPA vor allem aufgrund seiner spermiziden und reproduktionstoxischen Wirkung auf den Menschen (76-79) in der Kritik.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Wirkung von BPA auf den Knochen der Wistar-Ratte. Dazu wurden in der zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für experimentelle Chirurgie der Universität Rostock 34 Wistar-Ratten gehalten. Ihnen wurde für einen Zeitraum von 12 Wochen BPA osmotische Pumpen verabreicht, die im Bereich des oberen Rückens subkutan implantiert worden waren. Im Anschluss daran wurden die Femora dieser Tiere mit Zuhilfenahme des Mikro-CTs bildmorphologisch analysiert. Zudem erfolgte eine Dreipunktbiegetestung zur Ermittlung des biomechanischen Verhaltens. Dem schloss sich die statistische Auswertung an.

Ein wichtiges Ergebnis im Rahmen der genannten Untersuchungen war die signifikant höhere Fläche des Knochenmarkanteils im Querschnitt in der weiblichen Hochdosisgruppe verglichen mit der weiblichen Niedrigdosisgruppe. Außerdem konnten einige signifikante Unterschiede zwischen der männlichen und weiblichen Kontrollgruppe gezeigt werden. Diese Unterschiede begründen sich durch den geschlechtsbezogenen Größen- und Gewichtsunterschied. Dieser geht mit größeren Femora bei den männlichen Ratten einher, was darüber hinaus zu teilweise signifikanten Unterschieden in der biomechanischen Testung und Mikro-CT-Untersuchung führte.

In der Analyse der Daten, die mit Hilfe der biomechanischen Messungen und des Mikro-CTs erhoben wurden, zeigten sich zahlreiche Trends im Vergleich der Niedrig- und Hochdosisgruppen innerhalb der Geschlechter. Diese waren allesamt im zwischen männlichen und weiblichen Niedrig- und Hochdosisgruppen innerhalb der Geschlechter auszumachen.

Die Trends waren hinweisend auf anteilig mehr Knochengewebe in der Gruppe weiblicher Ratten, die Bisphenol A in hoher Dosis im Vergleich zur Niedrigdosisgruppe erhalten haben („VOX BV/TV“). Dem hinzu kommt ein Trend bezüglich einer erhöhten Anzahl an knöchernen Trabekeln („Tb.N“) in der weiblichen Hochdosisgruppe beim Vergleich mit der weiblichen

Niedrigdosisgruppe. Gegenübergestellt ist dem eine geringere Bruchdehnung („Ultimate Strain“) im Vergleich dieser beiden Gruppen mit einer geringen Bruchdehnung auf Seiten der weiblichen Hochdosisgruppe im Sinne eines Trends. Anhalt für einen Einfluss von BPA auf die Dicke der Kortikalis der Rattenfemora zeigte sich ebenfalls in Form eines Trends in der männlichen Hochdosisgruppe im Vergleich zur männlichen Niedrigdosisgruppe. In der Hochdosisgruppe war die Kortikalis, statistisch als Trend nachgewiesen, dicker.

Im Rahmen der biomechanischen Untersuchung war ein Trend der weiblichen Niedrigdosisgruppe beim Vergleich mit der weiblichen Hochdosisgruppe auffallend, der die höhere maximale Verformung der Femora in der Niedrigdosisgruppe verdeutlichte.

Es waren darüber hinaus jedoch zwischen den jeweiligen Kontrollgruppen und Gruppen, denen BPA in niedriger oder hoher Dosis verabreicht wurden keine Trends oder Signifikanzen auffallend.

In Zusammenschau der Resultate zeigt sich, dass sich die Ergebnisse im Vergleich zur aktuellen Studienlage nur teilweise decken. Es zeigten sich größtenteils Trends, die hinweisend auf eine osteoinduktive Wirkung von BPA bei hoher Dosis im weiblichen Kollektiv sowie auf eine Negativbilanz des Knochenstoffwechsels in der Hochdosisgruppe der männlichen Ratten waren. Dies zeichnete sich aber statistisch, mit Ausnahme der signifikant höheren Querschnittsfläche des Knochenmarks in der weiblichen Hochdosisgruppe verglichen mit der weiblichen Niedrigdosisgruppe, nicht mit signifikanten p-Werten ab.

Die Mikro-CT-Untersuchung und der Dreipunkt-Biegetest sind Methoden, mit denen die Mikroarchitektur sowie die biomechanischen Festigkeit von Knochen zuverlässig begutachtet werden kann. Mit ihnen kann jedoch keine Aussage über die zelluläre Struktur des Knochens oder eine Beeinflussung des Knochenstoffwechsels auf molekularer Ebene getroffen werden. Zukünftige Studien sollten untersuchen, inwiefern sich der Einfluss von BPA auf molekularer Ebene auf den Knochen auswirkt und diese Wirkung übertragbar auf den menschlichen Organismus ist.

7. Thesen

1. Bisphenol A ist eine ubiquitär verwendete Chemikalie mit weitem Anwendungsgebiet. Der menschliche Organismus steht mit Materialien und Produkten, die Bisphenol A enthalten, in ständigem Kontakt.
2. Die Aufnahme von Bisphenol A durch den Menschen erfolgt vor allem transoral, aber auch transdermal und inhalativ.
3. Der Knochenmetabolismus der Ratte und des Menschen wird durch Bisphenol A auf molekularer Ebene beeinflusst.
4. Die Mikro-Computertomografie ist eine etablierte nicht-invasive Methode zur Beurteilung der kortikalen und spongiösen Architektur von Knochengewebe.
5. Biomechanische Untersuchungen wie der Dreipunkt-Biegetest ermitteln Belastbarkeit, Verformbarkeit und Elastizität eines Stoffes.
6. Osmotische Pumpen stellen ein gängiges Mittel zur Applikation von Lösungen in tierexperimentellen Studien dar.
7. Die Querschnittsfläche des Knochenmarks ist im Vergleich der Niedrig- und Hochdosisgruppe der weiblichen Ratten in letzterer Gruppe signifikant höher.
8. Bisphenol A hat keinen Einfluss auf die Belastbarkeit und Elastizität des Knochens der Wistar-Ratte.
9. Der Einfluss von Bisphenol A auf die Struktur und die Stabilität des Knochens der Wistar-Ratte ist als gering einzustufen, sodass von einer schwachen Effektstärke auszugehen ist, die im Rahmen weiterer Studien zu evaluieren ist.
10. Es fehlen Studien, um weitere humanmedizinisch relevante Wirkungen von Bisphenol A zu ermitteln oder auszuschließen.

8. Literatur

1. Statistische Ämter des Bundes und der Länder. Bevölkerungs- und Haushaltsentwicklung im Bund und in den Ländern. Demografischer Wandel in Deutschland. 2011.
2. Svedbom A, Hernlund E, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, et al. Osteoporosis in the European Union: a compendium of country-specific reports. *Arch Osteoporos.* 2013;8(1-2):137-. Epub 2013/10/11. doi: 10.1007/s11657-013-0137-0. PubMed PMID: 24113838.
3. Peretz J, Vrooman L, Ricke WA, Hunt PA, Ehrlich S, Hauser R, et al. Bisphenol a and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007-2013. *Environmental health perspectives.* 2014;122(8):775-86. Epub 2014/06/04. doi: 10.1289/ehp.1307728. PubMed PMID: 24896072.
4. Deutschland BfRdB. Kein Gesundheitsrisiko für Verbraucher durch Bisphenol A-Exposition - BfR unterstützt die Einschätzung der EFSA-Neubewertung. Mitteilung Nr 005/2015 des BfR vom 19 Februar 2015. 2015.
5. Umweltbundesamt. EU erkennt Bisphenol A als besonders besorgniserregend an. Pressemitteilung Nr 02 vom 22012018. 2018.
6. Zincke T. Ueber die Einwirkung von Brom und von Chlor auf Phenole: Substitutionsproducte, Pseudobromide und Pseudochloride. Mittheilungen aus dem chemischen Laboratorium der Universität Marburg. 1905.
7. Dianin AP. Condensation of ketones with phenols. *Zhurnal Russkago Fiziko-Khimicheskago Obshchestva.* 1891.
8. Lawson ECdaW. Molecular Structure in Relation to Oestrogenic Activity. Compounds without a Phenanthrene Nucleus. Royal Society. 1935;125.
9. Dodds EC, Lawson W. Synthetic strogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature.* 1936;137(3476):996-. doi: 10.1038/137996a0.
10. Cousins R. A Multimedia Assessment of the Environmental Fate of Bisphenol A 2020.
11. PubChem, Information NCfB. Bisphenol A. accessed on July 22, 2019. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisphenol-A>
12. Ma Y, Liu H, Wu J, Yuan L, Wang Y, Du X, et al. The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environ Res.* 2019;176:108575. Epub 2019/07/13. doi: 10.1016/j.envres.2019.108575. PubMed PMID: 31299621.
13. European Food Safety Authority - Bisphenol A

14. Eckardt M, Simat TJ. Bisphenol A and alternatives in thermal paper receipts - a German market analysis from 2015 to 2017. *Chemosphere*. 2017;186:1016-25. Epub 2017/08/26. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.037. PubMed PMID: 28838039.
15. Risikobewertung Bf. Fragen und Antworten zu Bisphenol A in verbrauchernahen Produkten - Bisphenol A 2017. Available from: https://www.bfr.bund.de/de/fragen_und_antworten_zu_bisphenol_a_in_verbrauchernahen_produkten-7195.html.
16. Singh SCKYPP. Effect of Bisphenol A on human health and its degradation by microorganisms: a review. *Annals of Microbiology*. 2014;64:13-21. doi: <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0649-2>.
17. Braunrath R, Podlipna D, Padlesak S, Cichna-Markl M. Determination of bisphenol A in canned foods by immunoaffinity chromatography, HPLC, and fluorescence detection. *J Agric Food Chem*. 2005;53(23):8911-7. Epub 2005/11/10. doi: 10.1021/jf051525j. PubMed PMID: 16277382.
18. Sakhi AK, Lillegaard IT, Voorspoels S, Carlsen MH, Loken EB, Brantsaeter AL, et al. Concentrations of phthalates and bisphenol A in Norwegian foods and beverages and estimated dietary exposure in adults. *Environ Int*. 2014;73:259-69. Epub 2014/09/01. doi: 10.1016/j.envint.2014.08.005. PubMed PMID: 25173060.
19. Chen WY, Shen YP, Chen SC. Assessing bisphenol A (BPA) exposure risk from long-term dietary intakes in Taiwan. *Sci Total Environ*. 2016;543(Pt A):140-6. Epub 2015/11/19. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.11.029. PubMed PMID: 26580736.
20. Martinez MA, Rovira J, Prasad Sharma R, Nadal M, Schuhmacher M, Kumar V. Comparing dietary and non-dietary source contribution of BPA and DEHP to prenatal exposure: A Catalonia (Spain) case study. *Environ Res*. 2018;166:25-34. Epub 2018/06/03. doi: 10.1016/j.envres.2018.05.008. PubMed PMID: 29859370.
21. Hines CJ, Jackson MV, Deddens JA, Clark JC, Ye X, Christianson AL, et al. Urinary Bisphenol A (BPA) Concentrations among Workers in Industries that Manufacture and Use BPA in the USA. *Ann Work Expo Health*. 2017;61(2):164-82. Epub 2017/04/11. doi: 10.1093/annweh/wxw021. PubMed PMID: 28395354; PubMed Central PMCID: PMCPMC5577557.
22. Calafat AM, Weuve J, Ye X, Jia LT, Hu H, Ringer S, et al. Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environmental health perspectives*. 2009;117(4):639-44. Epub 2009/05/15. doi: 10.1289/ehp.0800265. PubMed PMID: 19440505; PubMed Central PMCID: PMCPMC2679610.

23. Murakami K, Ohashi A, Hori H, Hibiya M, Shoji Y, Kunisaki M, et al. Accumulation of bisphenol A in hemodialysis patients. *Blood Purif.* 2007;25(3):290-4. Epub 2007/07/12. doi: 10.1159/000104869. PubMed PMID: 17622711.
24. Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S, Perdu E. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere.* 2011;82(3):424-30. Epub 2010/10/30. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.09.058. PubMed PMID: 21030062.
25. Porras SP, Heinala M, Santonen T. Bisphenol A exposure via thermal paper receipts. *Toxicology letters.* 2014;230(3):413-20. Epub 2014/09/02. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.08.020. PubMed PMID: 25175590.
26. Russo G, Barbato F, Grumetto L. Monitoring of bisphenol A and bisphenol S in thermal paper receipts from the Italian market and estimated transdermal human intake: A pilot study. *Sci Total Environ.* 2017;599-600:68-75. Epub 2017/05/04. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.192. PubMed PMID: 28463702.
27. Ndaw S, Remy A, Jargot D, Robert A. Occupational exposure of cashiers to Bisphenol A via thermal paper: urinary biomonitoring study. *Int Arch Occup Environ Health.* 2016;89(6):935-46. Epub 2016/04/30. doi: 10.1007/s00420-016-1132-8. PubMed PMID: 27126703; PubMed Central PMCID: PMCPMC4927604.
28. Lv Y, Lu S, Dai Y, Rui C, Wang Y, Zhou Y, et al. Higher dermal exposure of cashiers to BPA and its association with DNA oxidative damage. *Environ Int.* 2017;98:69-74. Epub 2016/10/13. doi: 10.1016/j.envint.2016.10.001. PubMed PMID: 27729163.
29. Lorber M, Schechter A, Paepke O, Shropshire W, Christensen K, Birnbaum L. Exposure assessment of adult intake of bisphenol A (BPA) with emphasis on canned food dietary exposures. *Environ Int.* 2015;77:55-62. Epub 2015/02/04. doi: 10.1016/j.envint.2015.01.008. PubMed PMID: 25645382; PubMed Central PMCID: PMCPMC4469126.
30. Huang RP, Liu ZH, Yuan SF, Yin H, Dang Z, Wu PX. Worldwide human daily intakes of bisphenol A (BPA) estimated from global urinary concentration data (2000-2016) and its risk analysis. *Environ Pollut.* 2017;230:143-52. Epub 2017/06/27. doi: 10.1016/j.envpol.2017.06.026. PubMed PMID: 28649042.
31. Shelby MD. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. *Ntp cerhr mon.* 2008(22):v, vii-ix, 1-64 passim. Epub 2009/05/02. PubMed PMID: 19407859.

32. Vandenberg LN, Hunt PA, Gore AC. Endocrine disruptors and the future of toxicology testing - lessons from CLARITY-BPA. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(6):366-74. Epub 2019/03/08. doi: 10.1038/s41574-019-0173-y. PubMed PMID: 30842650.
33. Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, et al. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(10):3725-40. Epub 2012/08/15. doi: 10.1016/j.fct.2012.07.059. PubMed PMID: 22889897.
34. Corrales J, Kristofco LA, Steele WB, Yates BS, Breed CS, Williams ES, et al. Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. *Dose Response*. 2015;13(3):1559325815598308. Epub 2015/12/18. doi: 10.1177/1559325815598308. PubMed PMID: 26674671; PubMed Central PMCID: PMCPMC4674187.
35. Covaci A, Den Hond E, Geens T, Govarts E, Koppen G, Frederiksen H, et al. Urinary BPA measurements in children and mothers from six European member states: Overall results and determinants of exposure. *Environ Res*. 2015;141:77-85. Epub 2014/12/03. doi: 10.1016/j.envres.2014.08.008. PubMed PMID: 25440295.
36. Dekant W, Volkel W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;228(1):114-34. Epub 2008/01/22. doi: 10.1016/j.taap.2007.12.008. PubMed PMID: 18207480.
37. Snyder RW, Maness SC, Gaido KW, Welsch F, Sumner SC, Fennell TR. Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000;168(3):225-34. Epub 2000/10/24. doi: 10.1006/taap.2000.9051. PubMed PMID: 11042095.
38. Liu J, Martin JW. Prolonged Exposure to Bisphenol A from Single Dermal Contact Events. *Environ Sci Technol*. 2017;51(17):9940-9. Epub 2017/08/02. doi: 10.1021/acs.est.7b03093. PubMed PMID: 28759207.
39. Toner F, Allan G, Dimond SS, Waechter JM, Jr., Beyer D. In vitro percutaneous absorption and metabolism of Bisphenol A (BPA) through fresh human skin. *Toxicol In Vitro*. 2018;47:147-55. Epub 2017/11/21. doi: 10.1016/j.tiv.2017.11.002. PubMed PMID: 29154941.
40. M. G. Verhalten der endokrin wirksamen Substanz Bisphenol A bei der kommunalen Abwasserentsorgung. 2004.

41. Abraham A, Chakraborty P. A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Rev Environ Health*. 2019. Epub 2019/11/20. doi: 10.1515/reveh-2019-0034. PubMed PMID: 31743105.
42. Wisniewski P, Romano RM, Kizys MM, Oliveira KC, Kasamatsu T, Giannocco G, et al. Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Toxicology*. 2015;329:1-9. Epub 2015/01/13. doi: 10.1016/j.tox.2015.01.002. PubMed PMID: 25575453.
43. Heindel JJ, Blumberg B, Cave M, Machtinger R, Mantovani A, Mendez MA, et al. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reproductive toxicology* (Elmsford, NY). 2017;68:3-33. Epub 2016/10/21. doi: 10.1016/j.reprotox.2016.10.001. PubMed PMID: 27760374; PubMed Central PMCID: PMCPMC5365353.
44. Boucher JG, Boudreau A, Ahmed S, Atlas E. In Vitro Effects of Bisphenol A beta-D-Glucuronide (BPA-G) on Adipogenesis in Human and Murine Preadipocytes. *Environmental health perspectives*. 2015;123(12):1287-93. Epub 2015/05/29. doi: 10.1289/ehp.1409143. PubMed PMID: 26018136; PubMed Central PMCID: PMCPMC4671229.
45. Hao M, Ding L, Xuan L, Wang T, Li M, Zhao Z, et al. Urinary bisphenol A concentration and the risk of central obesity in Chinese adults: A prospective study. *J Diabetes*. 2018;10(6):442-8. Epub 2017/01/18. doi: 10.1111/1753-0407.12531. PubMed PMID: 28097815.
46. Carwile JL, Michels KB. Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003-2006. *Environ Res*. 2011;111(6):825-30. Epub 2011/06/17. doi: 10.1016/j.envres.2011.05.014. PubMed PMID: 21676388; PubMed Central PMCID: PMCPMC3747781.
47. Valvi D, Casas M, Mendez MA, Ballesteros-Gomez A, Luque N, Rubio S, et al. Prenatal bisphenol a urine concentrations and early rapid growth and overweight risk in the offspring. *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 2013;24(6):791-9. Epub 2013/09/17. doi: 10.1097/EDE.0b013e3182a67822. PubMed PMID: 24036610.
48. Liu B, Lehmler HJ, Sun Y, Xu G, Liu Y, Zong G, et al. Bisphenol A substitutes and obesity in US adults: analysis of a population-based, cross-sectional study. *The Lancet Planetary health*. 2017;1(3):e114-e22. Epub 2018/01/09. doi: 10.1016/s2542-5196(17)30049-9. PubMed PMID: 29308453; PubMed Central PMCID: PMCPMC5751959.

49. Ryan KK, Haller AM, Sorrell JE, Woods SC, Jandacek RJ, Seeley RJ. Perinatal exposure to bisphenol-a and the development of metabolic syndrome in CD-1 mice. *Endocrinology*. 2010;151(6):2603-12. Epub 2010/03/31. doi: 10.1210/en.2009-1218. PubMed PMID: 20351315; PubMed Central PMCID: PMCPMC2875828.
50. Lee I, Kim S, Kim KT, Kim S, Park S, Lee H, et al. Bisphenol A exposure through receipt handling and its association with insulin resistance among female cashiers. *Environ Int*. 2018;117:268-75. Epub 2018/05/20. doi: 10.1016/j.envint.2018.05.013. PubMed PMID: 29778011.
51. Duan Y, Yao Y, Wang B, Han L, Wang L, Sun H, et al. Association of urinary concentrations of bisphenols with type 2 diabetes mellitus: A case-control study. *Environ Pollut*. 2018;243(Pt B):1719-26. Epub 2018/11/10. doi: 10.1016/j.envpol.2018.09.093. PubMed PMID: 30408859.
52. Silver MK, O'Neill MS, Sowers MR, Park SK. Urinary bisphenol A and type-2 diabetes in U.S. adults: data from NHANES 2003-2008. *PLoS One*. 2011;6(10):e26868. Epub 2011/11/03. doi: 10.1371/journal.pone.0026868. PubMed PMID: 22046388; PubMed Central PMCID: PMCPMC3202589.
53. Leung YK, Govindarajah V, Cheong A, Veevers J, Song D, Gear R, et al. Gestational high-fat diet and bisphenol A exposure heightens mammary cancer risk. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(7):365-78. Epub 2017/05/11. doi: 10.1530/erc-17-0006. PubMed PMID: 28487351; PubMed Central PMCID: PMCPMC5488396.
54. Tse LA, Lee PMY, Ho WM, Lam AT, Lee MK, Ng SSM, et al. Bisphenol A and other environmental risk factors for prostate cancer in Hong Kong. *Environ Int*. 2017;107:1-7. Epub 2017/06/24. doi: 10.1016/j.envint.2017.06.012. PubMed PMID: 28644961.
55. Gao H, Yang BJ, Li N, Feng LM, Shi XY, Zhao WH, et al. Bisphenol A and hormone-associated cancers: current progress and perspectives. *Medicine*. 2015;94(1):e211. Epub 2015/01/09. doi: 10.1097/md.000000000000211. PubMed PMID: 25569640; PubMed Central PMCID: PMCPMC4602822.
56. Pollock T, deCatanzaro D. Presence and bioavailability of bisphenol A in the uterus of rats and mice following single and repeated dietary administration at low doses. *Reproductive toxicology (Elmsford, NY)*. 2014;49:145-54. Epub 2014/09/03. doi: 10.1016/j.reprotox.2014.08.005. PubMed PMID: 25181699.
57. Shafei A, Ramzy MM, Hegazy AI, Husseny AK, El-Hadary UG, Taha MM, et al. The molecular mechanisms of action of the endocrine disrupting chemical bisphenol A in

- the development of cancer. *Gene*. 2018;647:235-43. Epub 2018/01/11. doi: 10.1016/j.gene.2018.01.016. PubMed PMID: 29317319.
58. Zhang KS, Chen HQ, Chen YS, Qiu KF, Zheng XB, Li GC, et al. Bisphenol A stimulates human lung cancer cell migration via upregulation of matrix metalloproteinases by GPER/EGFR/ERK1/2 signal pathway. *Biomed Pharmacother*. 2014;68(8):1037-43. Epub 2014/10/15. doi: 10.1016/j.biopha.2014.09.003. PubMed PMID: 25312822.
59. Corbel T, Gayrard V, Puel S, Lacroix MZ, Berrebi A, Gil S, et al. Bidirectional placental transfer of Bisphenol A and its main metabolite, Bisphenol A-Glucuronide, in the isolated perfused human placenta. *Reproductive toxicology* (Elmsford, NY). 2014;47:51-8. Epub 2014/06/17. doi: 10.1016/j.reprotox.2014.06.001. PubMed PMID: 24933518.
60. Spanier AJ, Fiorino EK, Trasande L. Bisphenol A exposure is associated with decreased lung function. *J Pediatr*. 2014;164(6):1403-8.e1. Epub 2014/03/25. doi: 10.1016/j.jpeds.2014.02.026. PubMed PMID: 24657123; PubMed Central PMCID: PMC4035373.
61. Erden ES, Genc S, Motor S, Ustun I, Ulutas KT, Bilgic HK, et al. Investigation of serum bisphenol A, vitamin D, and parathyroid hormone levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Endocrine*. 2014;45(2):311-8. Epub 2013/08/02. doi: 10.1007/s12020-013-0022-z. PubMed PMID: 23904340.
62. Youssef MM, El-Din E, AbuShady MM, El-Baroudy NR, Abd El Hamid TA, Armaneus AF, et al. Urinary bisphenol A concentrations in relation to asthma in a sample of Egyptian children. *Hum Exp Toxicol*. 2018;37(11):1180-6. Epub 2018/02/15. doi: 10.1177/0960327118758150. PubMed PMID: 29441827.
63. Lee MR, Park H, Bae S, Lim YH, Kim JH, Cho SH, et al. Urinary bisphenol A concentrations are associated with abnormal liver function in the elderly: a repeated panel study. *J Epidemiol Community Health*. 2014;68(4):312-7. Epub 2013/11/29. doi: 10.1136/jech-2013-202548. PubMed PMID: 24285822.
64. Lee S, Lee HA, Park B, Han H, Park BH, Oh SY, et al. A prospective cohort study of the association between bisphenol A exposure and the serum levels of liver enzymes in children. *Environ Res*. 2018;161:195-201. Epub 2017/11/21. doi: 10.1016/j.envres.2017.11.007. PubMed PMID: 29156342.
65. Kataria A, Levine D, Wertenteil S, Vento S, Xue J, Rajendiran K, et al. Exposure to bisphenols and phthalates and association with oxidant stress, insulin resistance, and endothelial dysfunction in children. *Pediatr Res*. 2017;81(6):857-64. Epub 2017/01/19.

- doi: 10.1038/pr.2017.16. PubMed PMID: 28099427; PubMed Central PMCID: PMCPMC5618435.
66. Sheng Z, Wang C, Ren F, Liu Y, Zhu B. Molecular mechanism of endocrine-disruptive effects induced by Bisphenol A: The role of transmembrane G-protein estrogen receptor 1 and integrin alphavbeta3. *Journal of environmental sciences (China)*. 2019;75:1-13. Epub 2018/11/27. doi: 10.1016/j.jes.2018.05.002. PubMed PMID: 30473274.
 67. Chailurkit LO, Aekplakorn W, Ongphiphadhanakul B. The Association of Serum Bisphenol A with Thyroid Autoimmunity. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(11). Epub 2016/11/22. doi: 10.3390/ijerph13111153. PubMed PMID: 27869686; PubMed Central PMCID: PMCPMC5129363.
 68. Deutschmann A, Hans M, Meyer R, Haberlein H, Swandulla D. Bisphenol A inhibits voltage-activated Ca(2+) channels in vitro: mechanisms and structural requirements. *Molecular pharmacology*. 2013;83(2):501-11. Epub 2012/12/01. doi: 10.1124/mol.112.081372. PubMed PMID: 23197648.
 69. Schopel M, Jockers KF, Duppe PM, Autzen J, Potheraveedu VN, Ince S, et al. Bisphenol A binds to Ras proteins and competes with guanine nucleotide exchange: implications for GTPase-selective antagonists. *Journal of medicinal chemistry*. 2013;56(23):9664-72. Epub 2013/11/26. doi: 10.1021/jm401291q. PubMed PMID: 24266771.
 70. Shankar A, Teppala S, Sabanayagam C. Bisphenol A and peripheral arterial disease: results from the NHANES. *Environmental health perspectives*. 2012;120(9):1297-300. Epub 2012/05/31. doi: 10.1289/ehp.1104114. PubMed PMID: 22645278; PubMed Central PMCID: PMCPMC3440106.
 71. Melzer D, Gates P, Osborne NJ, Henley WE, Cipelli R, Young A, et al. Urinary bisphenol a concentration and angiography-defined coronary artery stenosis. *PLoS One*. 2012;7(8):e43378. Epub 2012/08/24. doi: 10.1371/journal.pone.0043378. PubMed PMID: 22916252; PubMed Central PMCID: PMCPMC3419714.
 72. Melzer D, Osborne NJ, Henley WE, Cipelli R, Young A, Money C, et al. Urinary bisphenol A concentration and risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women. *Circulation*. 2012;125(12):1482-90. Epub 2012/02/23. doi: 10.1161/circulationaha.111.069153. PubMed PMID: 22354940.
 73. Karmakar PC, Kang HG, Kim YH, Jung SE, Rahman MS, Lee HS, et al. Bisphenol A Affects on the Functional Properties and Proteome of Testicular Germ Cells and Spermatogonial Stem Cells in vitro Culture Model. *Sci Rep*. 2017;7(1):11858. Epub

- 2017/09/21. doi: 10.1038/s41598-017-12195-9. PubMed PMID: 28928476; PubMed Central PMCID: PMCPMC5605497.
74. Vom Saal FS. TRIENNIAL REPRODUCTION SYMPOSIUM: Environmental programming of reproduction during fetal life: Effects of intrauterine position and the endocrine disrupting chemical bisphenol A. *Journal of animal science*. 2016;94(7):2722-36. Epub 2016/08/03. doi: 10.2527/jas.2015-0211. PubMed PMID: 27482660.
75. Miao M, Zhou X, Li Y, Zhang O, Zhou Z, Li T, et al. LINE-1 hypomethylation in spermatozoa is associated with Bisphenol A exposure. *Andrology*. 2014;2(1):138-44. Epub 2013/12/03. doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00166.x. PubMed PMID: 24293158.
76. Herath CB, Jin W, Watanabe G, Arai K, Suzuki AK, Taya K. Adverse effects of environmental toxicants, octylphenol and bisphenol A, on male reproductive functions in pubertal rats. *Endocrine*. 2004;25(2):163-72. Epub 2005/02/16. doi: 10.1385/endo:25:2:163. PubMed PMID: 15711031.
77. Li DK, Zhou Z, Miao M, He Y, Wang J, Ferber J, et al. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertility and sterility*. 2011;95(2):625-30.e1-4. Epub 2010/11/03. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.09.026. PubMed PMID: 21035116.
78. Lassen TH, Frederiksen H, Jensen TK, Petersen JH, Joensen UN, Main KM, et al. Urinary bisphenol A levels in young men: association with reproductive hormones and semen quality. *Environmental health perspectives*. 2014;122(5):478-84. Epub 2014/05/03. doi: 10.1289/ehp.1307309. PubMed PMID: 24786630; PubMed Central PMCID: PMCPMC4014766.
79. Den Hond E, Tournaye H, De Sutter P, Ombelet W, Baeyens W, Covaci A, et al. Human exposure to endocrine disrupting chemicals and fertility: A case-control study in male subfertility patients. *Environ Int*. 2015;84:154-60. Epub 2015/08/21. doi: 10.1016/j.envint.2015.07.017. PubMed PMID: 26292060.
80. Metwally FM, Rashad H, Zeidan HM, Kilany A, Abdol Raouf ER. Study of the Effect of Bisphenol A on Oxidative Stress in Children with Autism Spectrum Disorders. *Indian J Clin Biochem*. 2018;33(2):196-201. Epub 2018/04/14. doi: 10.1007/s12291-017-0667-0. PubMed PMID: 29651211; PubMed Central PMCID: PMCPMC5891459.
81. Li Y, Zhang H, Kuang H, Fan R, Cha C, Li G, et al. Relationship between bisphenol A exposure and attention-deficit/ hyperactivity disorder: A case-control study for primary school children in Guangzhou, China. *Environ Pollut*. 2018;235:141-9. Epub 2017/12/26. doi: 10.1016/j.envpol.2017.12.056. PubMed PMID: 29276960.

82. Lee JH, Yi SK, Kim SY, Kim JS, Son SA, Jeong SH, et al. Salivary bisphenol A levels and their association with composite resin restoration. *Chemosphere*. 2017;172:46-51. Epub 2017/01/08. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.12.123. PubMed PMID: 28063316.
83. Becher R, Wellendorf H, Sakhi AK, Samuelsen JT, Thomsen C, Bolling AK, et al. Presence and leaching of bisphenol a (BPA) from dental materials. *Acta Biomater Odontol Scand*. 2018;4(1):56-62. Epub 2018/06/06. doi: 10.1080/23337931.2018.1476869. PubMed PMID: 29868625; PubMed Central PMCID: PMCPMC5974758.
84. Chin KY, Pang KL, Mark-Lee WF. A Review on the Effects of Bisphenol A and Its Derivatives on Skeletal Health. *International journal of medical sciences*. 2018;15(10):1043-50. Epub 2018/07/18. doi: 10.7150/ijms.25634. PubMed PMID: 30013446; PubMed Central PMCID: PMCPMC6036156.
85. Li G, Xu Z, Hou L, Li X, Li X, Yuan W, et al. Differential effects of bisphenol A diglycidyl ether on bone quality and marrow adiposity in ovary-intact and ovariectomized rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016;311(6):E922-e7. Epub 2016/10/21. doi: 10.1152/ajpendo.00267.2016. PubMed PMID: 27756728.
86. Thent ZC, Froemming GRA, Muid S. Bisphenol A exposure disturbs the bone metabolism: An evolving interest towards an old culprit. *Life sciences*. 2018;198:1-7. Epub 2018/02/13. doi: 10.1016/j.lfs.2018.02.013. PubMed PMID: 29432759.
87. Hwang JK, Min KH, Choi KH, Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, et al. Bisphenol A reduces differentiation and stimulates apoptosis of osteoclasts and osteoblasts. *Life sciences*. 2013;93(9-11):367-72. Epub 2013/08/01. doi: 10.1016/j.lfs.2013.07.020. PubMed PMID: 23900028.
88. Kim DH, Oh CH, Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY, et al. Serum bisphenol a concentration in postmenopausal women with osteoporosis. *Journal of bone metabolism*. 2012;19(2):87-93. Epub 2012/11/01. doi: 10.11005/jbm.2012.19.2.87. PubMed PMID: 24524038; PubMed Central PMCID: PMCPMC3780927.
89. Zhao HY, Bi YF, Ma LY, Zhao L, Wang TG, Zhang LZ, et al. The effects of bisphenol A (BPA) exposure on fat mass and serum leptin concentrations have no impact on bone mineral densities in non-obese premenopausal women. *Clinical biochemistry*. 2012;45(18):1602-6. Epub 2012/09/18. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.08.024. PubMed PMID: 22981830.
90. Wirtz DC RS. Orthopädie und Unfallchirurgie: Thieme; 2019.
91. Lüllmann-Rauch R AE. Taschenlehrbuch Histologie. 6 ed2019.

92. Aumüller G AG, Conrad A, Engele J, Kirsch J. Duale Reihe Anatomie: Thieme; 2017.
93. River C, Pumps AO. Infusion Pumps for Continuous Dosing of Laboratory Animals. 2020.
94. Noel PR, Barnett KC, Davies RE, Jolly DW, Leahy JS, Mawdesley-Thomas LE, et al. The toxicity of dimethyl sulphoxide (DMSO) for the dog, pig, rat and rabbit. *Toxicology*. 1975;3(2):143-69. Epub 1975/01/01. doi: 10.1016/0300-483x(75)90081-5. PubMed PMID: 1124535.
95. Dimethylsulfoxid (DMSO) [MAK Value Documentation in German language, 2009]. The MAK-Collection for Occupational Health and Safety. p. 1-11.
96. Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res*. 1989;4(1):3-11. Epub 1989/02/01. doi: 10.1002/jbmr.5650040103. PubMed PMID: 2718776.
97. Layton MW, Goldstein SA, Goulet RW, Feldkamp LA, Kubinski DJ, Bole GG. Examination of subchondral bone architecture in experimental osteoarthritis by microscopic computed axial tomography. *Arthritis Rheum*. 1988;31(11):1400-5. Epub 1988/11/01. doi: 10.1002/art.1780311109. PubMed PMID: 3190784.
98. Stauber M, Muller R. Micro-computed tomography: a method for the non-destructive evaluation of the three-dimensional structure of biological specimens. *Methods Mol Biol*. 2008;455:273-92. Epub 2008/05/09. doi: 10.1007/978-1-59745-104-8_19. PubMed PMID: 18463825.
99. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1468-86. Epub 2010/06/10. doi: 10.1002/jbmr.141. PubMed PMID: 20533309.
100. Roach HI, Mehta G, Oreffo RO, Clarke NM, Cooper C. Temporal analysis of rat growth plates: cessation of growth with age despite presence of a physis. *J Histochem Cytochem*. 2003;51(3):373-83. Epub 2003/02/18. doi: 10.1177/002215540305100312. PubMed PMID: 12588965.
101. Hughes PC, Tanner JM. The assessment of skeletal maturity in the growing rat. *J Anat*. 1970;106(Pt 2):371-402. Epub 1970/03/01. PubMed PMID: 4315144; PubMed Central PMCID: PMCPMC1233709.

102. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*. 1993;14(4):595-608. Epub 1993/07/01. doi: 10.1016/8756-3282(93)90081-k. PubMed PMID: 8274302.
103. Samuels W, Schaffner. Statistics for the Life Sciences: Pearson; 2012. 654 p.
104. Tiwari D, Vanage G. Bisphenol A Induces Oxidative Stress in Bone Marrow Cells, Lymphocytes, and Reproductive Organs of Holtzman Rats. *Int J Toxicol*. 2017;36(2):142-52. Epub 2017/04/14. doi: 10.1177/1091581817691224. PubMed PMID: 28403740.
105. Miki Y HS, Nagasaki S, Suzuki T, Ito K, Kumamoto H, Sasano H. Steroid and xenobiotic receptor-mediated effects of bisphenol A on human osteoblasts. 2016.
106. Lind T, Lejonklou MH, Dunder L, Rasmusson A, Larsson S, Melhus H, et al. Low-dose developmental exposure to bisphenol A induces sex-specific effects in bone of Fischer 344 rat offspring. *Environ Res*. 2017;159:61-8. Epub 2017/08/05. doi: 10.1016/j.envres.2017.07.020. PubMed PMID: 28772150.
107. Lind T, Lejonklou MH, Dunder L, Kushnir MM, Ohman-Magi C, Larsson S, et al. Developmental low-dose exposure to bisphenol A induces chronic inflammation, bone marrow fibrosis and reduces bone stiffness in female rat offspring only. *Environ Res*. 2019;177:108584. Epub 2019/07/22. doi: 10.1016/j.envres.2019.108584. PubMed PMID: 31326715.
108. Lejonklou MH, Christiansen S, Orberg J, Shen L, Larsson S, Boberg J, et al. Low-dose developmental exposure to bisphenol A alters the femoral bone geometry in wistar rats. *Chemosphere*. 2016;164:339-46. Epub 2016/09/07. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.114. PubMed PMID: 27592323.
109. Theeuwes F, Yum SI. Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations. *Ann Biomed Eng*. 1976;4(4):343-53. Epub 1976/12/01. doi: 10.1007/bf02584524. PubMed PMID: 1020825.
110. Semenova S, Jin X, McClure-Begley TD, Tadman MP, Marks MJ, Markou A. Differential effects of withdrawal from intermittent and continuous nicotine exposure on reward deficit and somatic aspects of nicotine withdrawal and expression of alpha4beta2* nAChRs in Wistar male rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2018;171:54-65. Epub 2018/06/17. doi: 10.1016/j.pbb.2018.06.002. PubMed PMID: 29908200; PubMed Central PMCID: PMCPMC6170027.

111. Keraliya RA PC, Patel P, et al. . Osmotic drug delivery system as a part of modified release dosage form. doi: doi:10.5402/2012/528079. PubMed Central PMCID: PMC22852100.
112. Seachrist DD, Bonk KW, Ho SM, Prins GS, Soto AM, Keri RA. A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. *Reproductive toxicology* (Elmsford, NY). 2016;59:167-82. Epub 2015/10/24. doi: 10.1016/j.reprotox.2015.09.006. PubMed PMID: 26493093; PubMed Central PMCID: PMCPMC4783235.
113. (EFSA) EFSA. Bisphenol A (BPA) hazard assessment protocol [Technical Report]. 2017 [cited 2017]. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/de/supporting/pub/en-1354>.
114. Tomza-Marciniak A, Stępkowska P, Kuba J, Pilarczyk B. Effect of bisphenol A on reproductive processes: A review of in vitro, in vivo and epidemiological studies. *J Appl Toxicol.* 2018;38(1):51-80. Epub 2017/06/14. doi: 10.1002/jat.3480. PubMed PMID: 28608465.
115. Kapadia RD, Stroup GB, Badger AM, Koller B, Levin JM, Coatney RW, et al. Applications of micro-CT and MR microscopy to study pre-clinical models of osteoporosis and osteoarthritis. *Technol Health Care.* 1998;6(5-6):361-72. Epub 1999/04/01. PubMed PMID: 10100939.
116. Bonnet N, Laroche N, Vico L, Dolleans E, Courteix D, Benhamou CL. Assessment of trabecular bone microarchitecture by two different x-ray microcomputed tomographs: a comparative study of the rat distal tibia using Skyscan and Scanco devices. *Med Phys.* 2009;36(4):1286-97. Epub 2009/05/29. doi: 10.1111/j.13096605. PubMed PMID: 19472637.
117. Waarsing JH, Day JS, Weinans H. An improved segmentation method for in vivo microCT imaging. *J Bone Miner Res.* 2004;19(10):1640-50. Epub 2004/09/10. doi: 10.1359/jbm.040705. PubMed PMID: 15355559.
118. Alexander JM, Bab I, Fish S, Muller R, Uchiyama T, Gronowicz G, et al. Human parathyroid hormone 1-34 reverses bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res.* 2001;16(9):1665-73. Epub 2001/09/08. doi: 10.1359/jbm.2001.16.9.1665. PubMed PMID: 11547836.
119. Barbier A, Martel C, de Vernejoul MC, Tirode F, Nys M, Mocaer G, et al. The visualization and evaluation of bone architecture in the rat using three-dimensional X-ray microcomputed tomography. *J Bone Miner Metab.* 1999;17(1):37-44. Epub 1999/03/20. doi: 10.1007/s007740050061. PubMed PMID: 10084400.

120. Akhter MP, Lappe JM, Davies KM, Recker RR. Transmenopausal changes in the trabecular bone structure. *Bone*. 2007;41(1):111-6. Epub 2007/05/15. doi: 10.1016/j.bone.2007.03.019. PubMed PMID: 17499038.
121. Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, et al. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone*. 1998;23(1):59-66. Epub 1998/07/14. doi: 10.1016/s8756-3282(98)00068-4. PubMed PMID: 9662131.
122. Kuhn JL, Goldstein SA, Feldkamp LA, Goulet RW, Jesion G. Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure. *J Orthop Res*. 1990;8(6):833-42. Epub 1990/11/01. doi: 10.1002/jor.1100080608. PubMed PMID: 2213340.
123. Fanuscu MI, Chang TL. Three-dimensional morphometric analysis of human cadaver bone: microstructural data from maxilla and mandible. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(2):213-8. Epub 2004/03/11. doi: 10.1111/j.1600-0501.2004.00969.x. PubMed PMID: 15008933.
124. Chappard D, Retailleau-Gaborit N, Legrand E, Basle MF, Audran M. Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT. *J Bone Miner Res*. 2005;20(7):1177-84. Epub 2005/06/09. doi: 10.1359/jbmr.050205. PubMed PMID: 15940370.
125. Fajardo RJ, Cory E, Patel ND, Nazarian A, Laib A, Manoharan RK, et al. Specimen size and porosity can introduce error into microCT-based tissue mineral density measurements. *Bone*. 2009;44(1):176-84. Epub 2008/09/30. doi: 10.1016/j.bone.2008.08.118. PubMed PMID: 18822398; PubMed Central PMCID: PMC4286574.
126. Kommission E. Bisphenol A: EU-Verbot von Säuglingsflaschen tritt morgen in Kraft. 2011.
127. Deutschland DBdB. Neuregelungen im November 2018 [1. Verbraucherschutz]. Available from: <https://www.bundesregierung.de/breg-de/aktuelles/neuregelungen-im-november-2018-1541550>.
128. Lebensmittelsicherheit EBz. Wissenschaftliches Gutachten zu Bisphenol A (2015). 2015.

129. (EFSA) EBfL. Wissenschaftliches Gutachten zu Bisphenol A (2015). Available from: https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheetbpa150121-de.pdf.
130. (EFSA) EFSA. BPA update: working group to start reviewing new studies. 2018.
131. Risikobewertung Bf. Zusammenhang zwischen „Kreidezähnen“ bei Kindern (Molar- Incisor- Hypomineralisation, MIH) und der Aufnahme von Bisphenol A ist nach derzeitigen Stand des Wissens unwahrscheinlich. Mitteilung Nr 025/2018 des BfR vom 3 August 2018. 2018.
132. (ECHA) ECA. Seven new substances added to the Candidate List, entry for bisphenol-A updated 2017. Available from: <https://echa.europa.eu/de/-/seven-new-substances-added-to-the-candidate-list-entry-for-bisphenol-a-updated-to-reflect-its-endocrine-disrupting-properties-for-the-environment>.
133. Agency EC. REACH verstehen.
134. (ECHA) ECA. Bisphenol A. Available from: <https://echa.europa.eu/de/hot-topics/bisphenol-a>.
135. (EFSA) EFSA. Bisphenol A. Available from: <https://www.efsa.europa.eu/de/topics/topic/bisphenol>.

9. Danksagung

Danken möchte ich allen voran meinem Betreuer Herrn Privatdozent Dr. med. habil. Ioannis Stratos und meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Thomas Mittlmeier für die Möglichkeit diese Arbeit verfassen zu dürfen und den zu jedem Zeitpunkt bestehenden freundlichen und konstruktiven Austausch.

Zudem danke ich Frau Professor Brigitte Vollmar vom Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock für die Kooperation und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Außerdem danke ich Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Dietmar Zechner und den medizinisch-technischen Assistentinnen des Rudolf-Zenker-Instituts für ihre zugewandte Unterstützung und lösungsorientierte Einstellung.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Privatdozentin Dr. Anja Niehoff vom Institut für Biomechanik und Orthopädie der Deutschen Sporthochschule Köln sowie Frau Dr. Hildegard Christ aus dem Institut für Medizinische Statistik und Bioinformatik der Universität zu Köln, die jederzeit für Rückfragen und ausführliche Erklärungen freundlich zur Verfügung standen.

Vor allem für die Unterstützung in der Endphase der Verfassung dieser Doktorarbeit und die Motivation will ich Frau Privatdozentin Dr. med. habil. Carolin Meyer, die mir stets als Ansprechpartnerin und Mentorin zur Seite steht, herzlich danken.

Besonders dankbar bin ich meinen Freunden und meiner Familie. Dabei danke ich insbesondere meiner Mutter Brigitte Polewsky-Prasse und meinem Vater Dr. med. Günter Prasse, die mich fortwährend in jedweder Hinsicht unterstützten und mir für das Medizinstudium und den Beruf das Wichtigste mit auf den Weg gegeben haben.

Zum Schluss danke ich von ganzem Herzen meiner Freundin Louise Wellmann, die mir immer mit Muße, Geduld und Zeit zur Seite stand und oftmals einen zielführenden Blick auf bis dahin ungelöste Probleme hatte.

10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der ausgewiesenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die experimentellen Versuche, einschließlich der Vor- und Nachbereitung der Operationen, wurden zu gleichen Anteilen von einem weiteren Doktoranden (Johannes De Pay) und mir durchgeführt. Weiterführende durch den Tierschutzantrag genehmigte und im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführte Untersuchungen, die das Muskelgewebe der operierten Ratten betreffen, werden im Rahmen einer geplanten Dissertationsschrift durch Herrn De Pay abgehandelt. Die Verfassung und Verschriftlichung dieser Arbeit oblag ausschließlich meiner Person. Sämtliche Stellen der Arbeit, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen gedruckten oder im Internet verfügbaren Werken entnommen sind, habe ich durch genaue Quellenangaben kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keinem Prüfungsamt vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Köln 06.05.2020

Tobias Prasse

11. Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen wird der Lebenslauf nicht online veröffentlicht

Aus Datenschutzgründen wird der Lebenslauf nicht online veröffentlicht

Aus Datenschutzgründen wird der Lebenslauf nicht online veröffentlicht

12. Anhang

12.1 Ergebnistabellen der Mikro-CT-Untersuchung

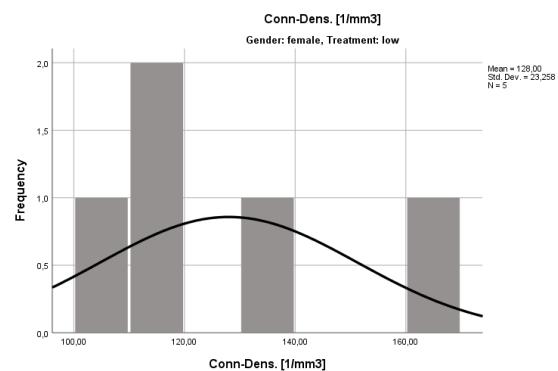
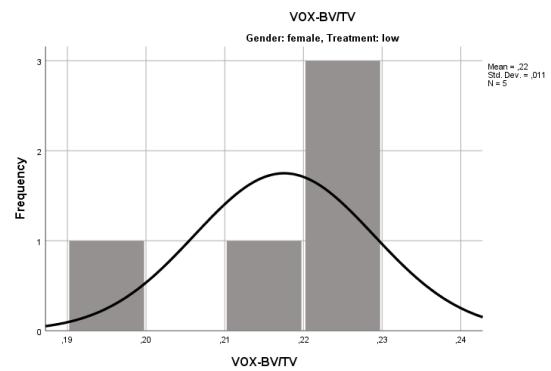
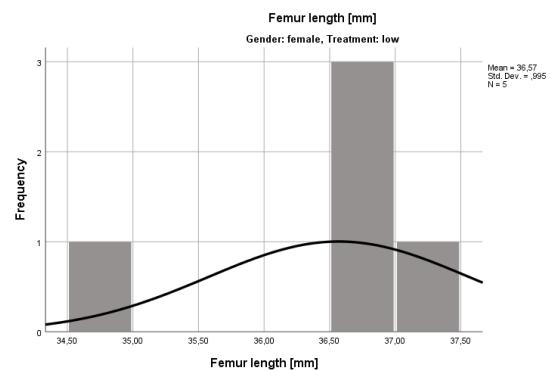
		Metaphysis						Diaphysis						
Sex	Femur length	VOK-BV/TV	Conn-Dens.	DT-Tb.N	DT-Tb.Th	DT-Tb.Sp	Tt.Ar	mm	1/mm	mm	mm ²	mm	mm ²	%
Female low	37,00	0,23	115,46	3,98	0,07	0,24	8,80	0,64	5,77	3,03	65,60	Ct.Ar/Tt.Ar		
Female low	34,90	0,22	116,99	4,27	0,07	0,22	8,61	0,64	5,42	3,19	62,92			
Female low	36,98	0,23	163,68	4,52	0,07	0,21	9,11	0,66	5,80	3,31	63,64			
Female low	37,46	0,20	105,52	3,63	0,07	0,26	9,27	0,69	6,16	3,11	66,42			
Female low	36,50	0,22	138,33	4,42	0,07	0,22	9,50	0,62	5,85	3,65	61,61			
		Metaphysis						Diaphysis						
Sex	Femur length	VOK-BV/TV	Conn-Dens.	DT-Tb.N	DT-Tb.Th	DT-Tb.Sp	Tt.Ar	mm	1/mm	mm	mm ²	mm	mm ²	%
Female high	35,22	0,27	172,59	4,96	0,07	0,19	9,23	0,65	5,75	3,48	62,31	Ct.Ar/Tt.Ar		
Female high	37,62	0,26	139,13	4,71	0,07	0,19	9,55	0,62	6,00	3,55	62,81			
Female high	35,98	0,21	102,88	3,74	0,07	0,27	9,91	0,65	6,25	3,66	63,10			
Female high	35,54	0,38	179,72	5,65	0,08	0,16	9,23	0,65	5,91	3,32	64,01			
Female high	37,46	0,33	300,27	6,09	0,07	0,15	9,75	0,64	6,00	3,75	61,56			
		Metaphysis						Diaphysis						
Sex	Femur length	VOK-BV/TV	Conn-Dens.	DT-Tb.N	DT-Tb.Th	DT-Tb.Sp	Tt.Ar	mm	1/mm	mm	mm ²	mm	mm ²	%
Female control	35,54	0,15	106,63	3,14	0,06	0,33	9,16	0,60	5,68	3,48	61,97	Ct.Ar/Tt.Ar		
Female control	35,70	0,20	99,73	4,01	0,07	0,24	8,83	0,65	5,69	3,15	64,40			
Female control	37,62	0,17	76,67	3,36	0,07	0,29	8,46	0,66	5,71	2,75	67,53			
Female control	36,94	0,28	151,35	4,70	0,07	0,20	9,55	0,62	5,89	3,66	61,70			
Female control	37,14	0,15	85,32	3,02	0,07	0,33	8,26	0,66	5,47	2,79	66,26			
Female control	36,02	0,38	195,29	6,13	0,08	0,14	10,38	0,66	6,36	4,01	61,32			

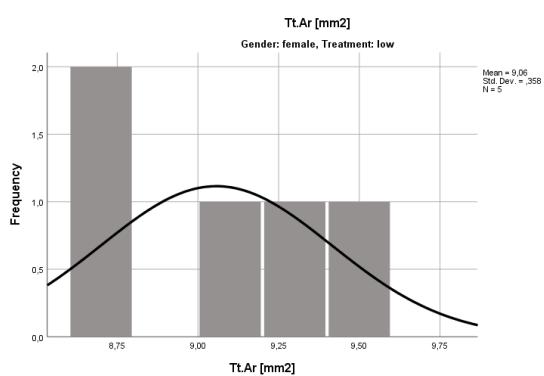
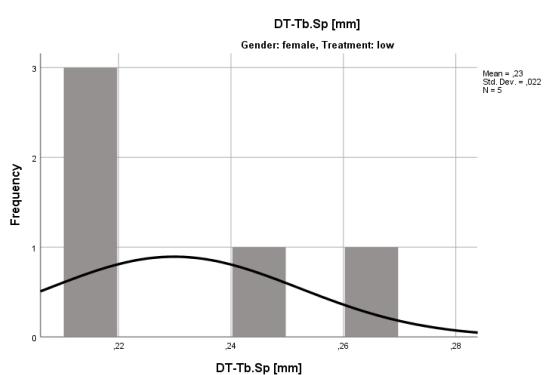
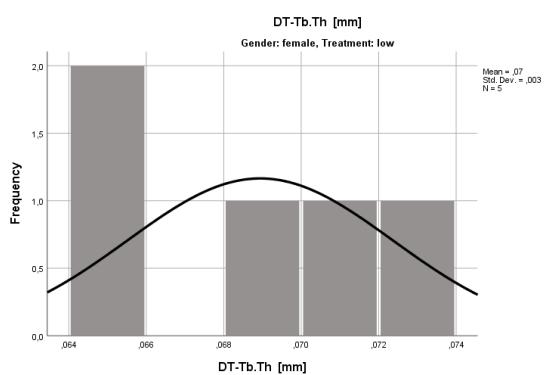
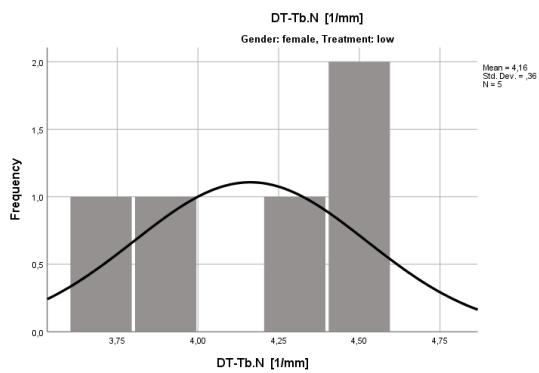
		Metaphysis			Diaphysis						
	mm	1,00	1/mm ³	1/mm	mm	mm ²	mm	mm ²	mm ²	%	
Sex	Femur length	Vox-BV/TV	Conn-Dens.	DT-Tb.N	DT-Tb.Th	DT-Tb.Sp	Tt.Ar	Ct.Th	Ct.Area	Marrow area	Ct.Ar/Tt.Ar
Male low	42,90	0,04	8,08	1,85	0,07	0,60	15,11	0,71	9,08	6,04	60,06
Male low	41,38	0,06	11,16	1,53	0,09	0,72	13,04	0,71	9,71	3,33	74,43
Male low	41,18	0,06	16,55	2,66	0,07	0,42	15,05	0,71	9,55	5,51	63,42
Male low	44,24	0,15	41,11	2,40	0,08	0,43	15,30	0,65	9,20	6,09	60,15
Male low	41,92	0,09	25,14	2,06	0,07	0,50	12,92	0,65	8,05	4,88	62,25
Sex	Femur length	Vox-BV/TV	Conn-Dens.	DT-Tb.N	DT-Tb.Th	DT-Tb.Sp	Tt.Ar	Ct.Th	Ct.Area	Marrow area	Ct.Ar/Tt.Ar
Male high	41,54	0,04	8,97	1,94	0,07	0,53	12,72	0,72	8,33	4,39	65,48
Male high	41,30	0,11	26,83	2,18	0,08	0,53	13,81	0,70	9,31	4,49	67,47
Male high	40,80	0,12	38,26	2,13	0,08	0,48	12,06	0,69	7,69	4,37	63,78
Male high	41,06	0,12	28,40	2,34	0,08	0,43	12,52	0,70	8,10	4,42	64,67
Male high	40,36	0,07	14,16	1,62	0,07	0,64	13,96	0,71	8,93	5,03	63,96
Male high	42,20	0,13	36,04	2,32	0,08	0,45	14,14	0,66	8,38	5,76	59,27
Male high	40,76	0,06	13,41	2,32	0,09	0,45	12,88	0,68	8,02	4,86	62,24
Sex	Femur length	Vox-BV/TV	Conn-Dens.	DT-Tb.N	DT-Tb.Th	DT-Tb.Sp	Tt.Ar	Ct.Th	Ct.Area	Marrow area	Ct.Ar/Tt.Ar
Male control	40,26	0,10	21,31	2,94	0,08	0,34	12,87	0,71	8,01	4,86	62,25
Male control	42,10	0,16	34,72	3,17	0,10	0,31	14,04	0,72	9,30	4,74	66,23
Male control	42,30	0,06	11,85	1,45	0,08	0,74	14,41	0,65	8,64	5,77	59,94
Male control	42,50	0,10	27,87	2,09	0,07	0,49	13,31	0,65	8,09	5,22	60,76
Male control	40,26	0,10	32,31	2,24	0,07	0,45	12,86	0,71	8,17	4,69	63,50
Male control	40,86	0,11	33,67	2,12	0,08	0,48	13,16	0,74	8,65	4,51	65,74

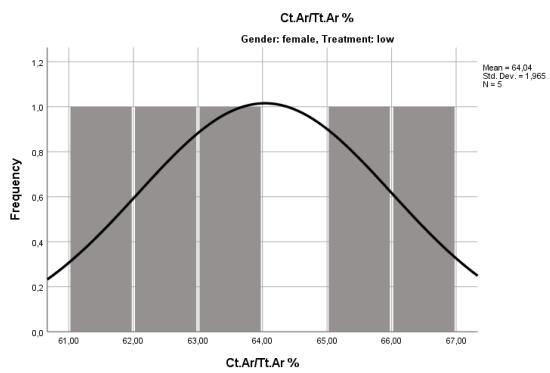
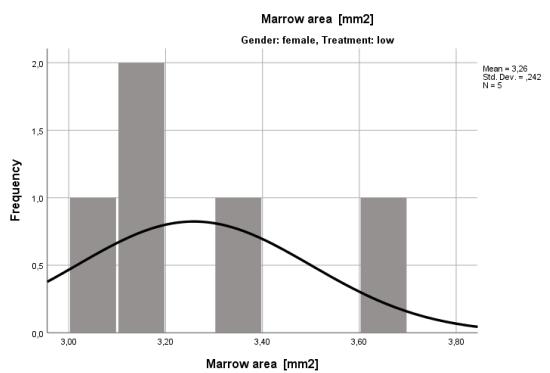
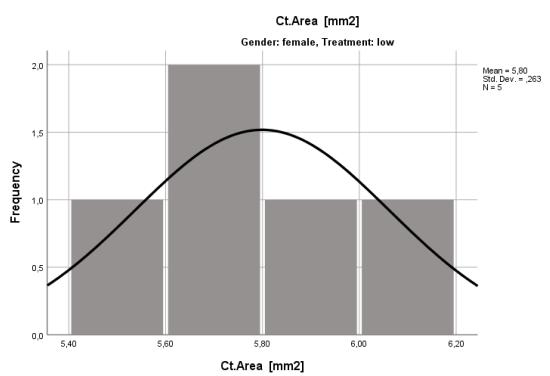
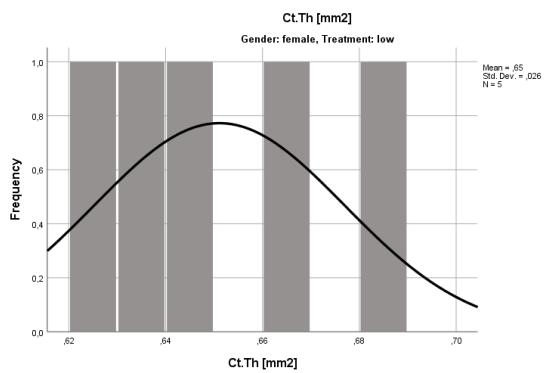
12.2 Ergebnistabellen des Dreipunkt-Biegetests

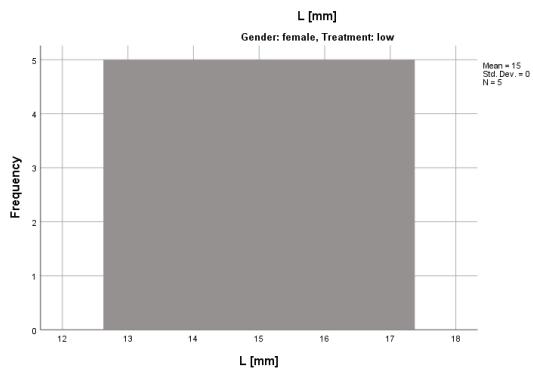
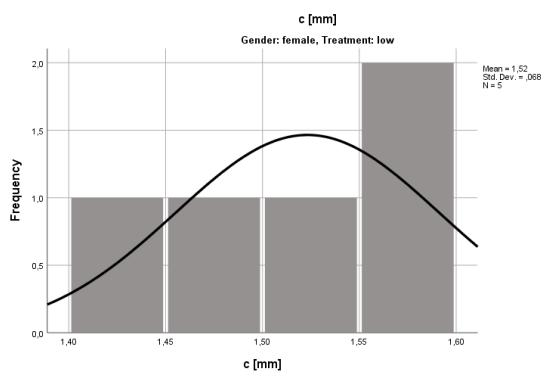
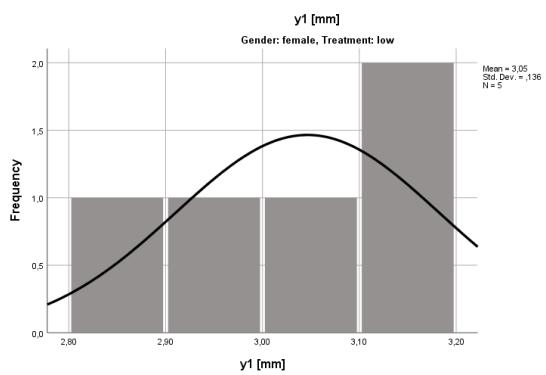
Sex	y_1 [mm]	c [mm]	L [mm]	I [mm \times 2]	Ultimate Force [N]	Ultimate Displacement [mm]	Stiffness [N/mm]	Energy [mJ]	Ultimate Stress [MPa]	Ultimate Strain	Elastic Modulus [MPa]	Energy density [J/mm \times 3]
Female low	2,86	1,43	15,00	4,04	136,77	1,00	342,89	45,50	181,31	0,08	6006,74	4,60
Female low	2,96	1,48	15,00	4,32	118,18	0,83	291,39	27,01	151,68	0,07	4791,29	2,74
Female low	3,19	1,60	15,00	5,07	127,95	1,00	312,60	40,06	150,81	0,09	4422,09	4,02
Female low	3,09	1,55	15,00	5,31	149,60	1,02	376,54	35,41	163,41	0,08	5072,15	3,19
Female low	3,13	1,57	15,00	5,36	136,97	1,38	282,60	57,76	150,04	0,12	3702,45	5,29
Female high	3,03	1,51	15,00	4,76	142,86	1,02	360,77	34,68	170,42	0,08	5414,43	3,34
Female high	3,11	1,55	15,00	4,89	129,54	0,80	310,13	30,05	154,47	0,07	4455,27	2,97
Female high	3,24	1,62	15,00	6,07	125,65	0,77	361,56	25,11	125,51	0,07	4269,53	2,16
Female high	3,16	1,58	15,00	5,12	114,39	0,69	289,71	26,53	132,45	0,06	4108,67	2,59
Female high	3,27	1,63	15,00	5,79	155,10	0,73	374,86	46,34	164,23	0,06	4690,28	4,28
Female control	3,13	1,56	15,00	5,22	134,16	0,97	368,94	31,06	150,76	0,08	4999,40	2,91
Female control	3,06	1,53	15,00	4,73	131,35	1,17	287,58	37,98	159,29	0,10	4355,77	3,76
Female control	2,93	1,47	15,00	4,18	146,51	0,61	348,24	37,21	192,73	0,05	5953,96	3,83
Female control	3,16	1,58	15,00	5,39	127,38	1,24	258,16	42,14	140,00	0,10	3410,04	3,90
Female control	2,97	1,49	15,00	4,35	131,45	0,74	308,82	41,74	168,56	0,06	5044,54	4,24
Female control	3,24	1,62	15,00	6,00	170,88	0,52	450,34	47,44	172,82	0,04	5372,80	4,14
Male low	3,94	1,97	20,00	13,57	177,52	0,86	399,45	56,40	128,72	0,05	4993,46	2,41
Male low	3,65	1,83	20,00	11,78	206,72	1,59	363,70	93,87	160,19	0,09	5222,53	3,98
Male low	4,04	2,02	20,00	13,97	238,69	1,26	502,89	99,10	172,44	0,08	6097,41	4,34
Male low	4,00	2,00	20,00	14,85	175,21	1,88	246,58	98,64	118,04	0,11	2767,22	3,99
Male low	3,52	1,76	20,00	8,64	153,21	1,66	249,30	68,18	156,23	0,09	4843,63	3,67
Male high	3,66	1,83	20,00	10,55	161,98	1,77	292,34	78,00	140,29	0,10	4675,16	3,70
Male high	3,77	1,89	20,00	11,98	209,79	1,74	351,05	93,31	165,16	0,10	4886,99	4,16
Male high	3,30	1,65	20,00	6,96	165,67	1,08	326,87	65,93	196,36	0,05	7925,84	3,87
Male high	3,38	1,69	20,00	8,49	168,35	0,96	252,54	78,06	167,70	0,05	4995,35	3,95
Male high	3,76	1,88	20,00	11,14	167,21	0,87	258,38	69,32	140,96	0,05	3873,94	3,29
Male high	3,75	1,87	20,00	10,83	168,35	0,96	250,60	78,06	145,68	0,05	3871,82	3,80
Male high	3,57	1,78	20,00	9,41	215,99	2,02	321,29	104,15	204,63	0,11	5876,14	5,28
Male control	3,49	1,75	20,00	8,99	163,65	1,19	323,95	66,79	158,85	0,06	6019,80	3,39
Male control	3,96	1,98	20,00	12,87	235,03	1,67	432,44	113,96	180,90	0,10	5560,27	5,21
Male control	3,77	1,88	20,00	11,52	173,09	1,15	321,41	62,09	141,40	0,06	4727,94	2,86
Male control	3,67	1,84	20,00	9,97	165,71	1,47	232,93	69,04	152,47	0,08	3808,78	3,50
Male control	3,58	1,79	20,00	8,52	200,66	1,25	387,83	76,26	210,79	0,07	7677,37	4,30
Male control	3,77	1,89	20,00	11,33	185,21	1,26	281,62	69,85	154,19	0,07	4191,65	3,29

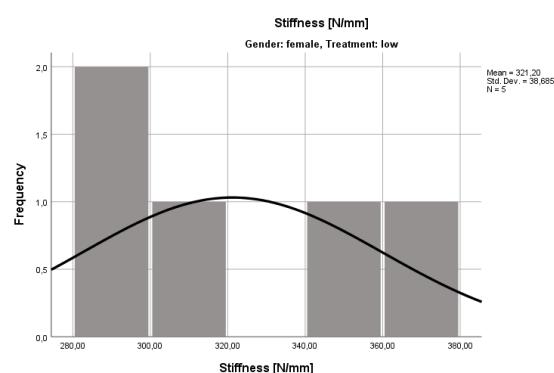
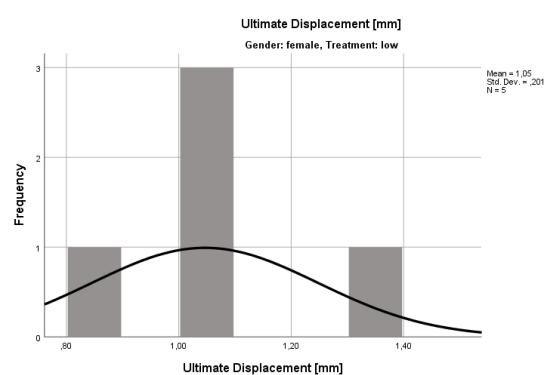
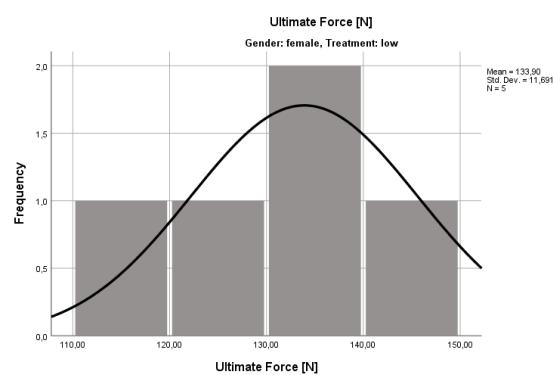
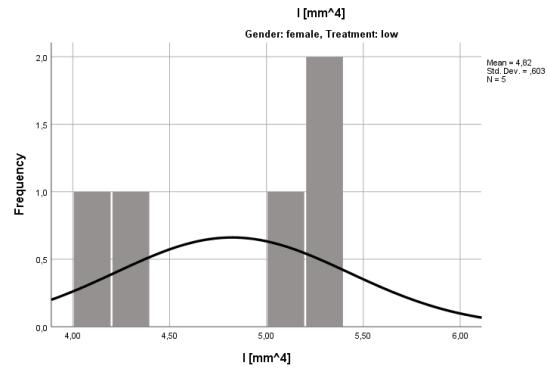
12.3 Ergebnistabellen der statistischen Tests

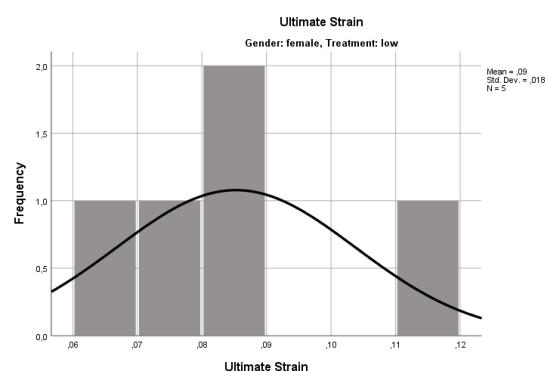
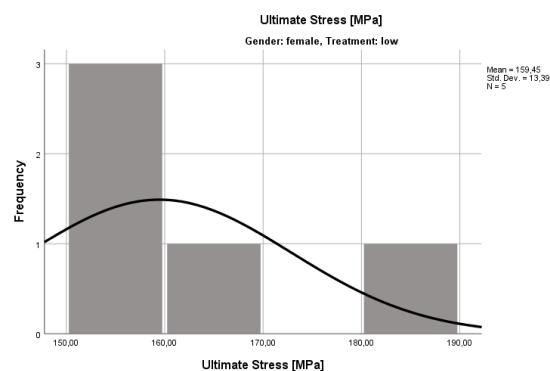
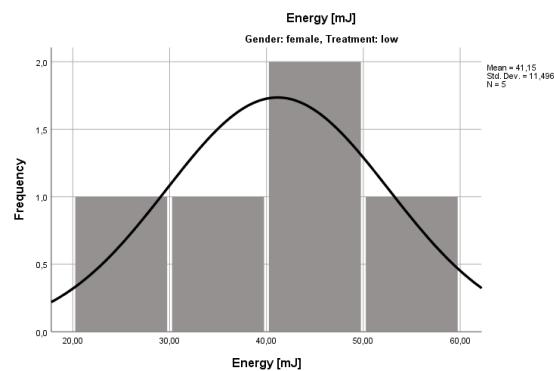


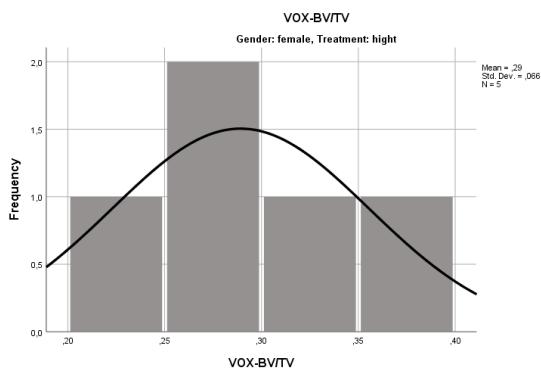
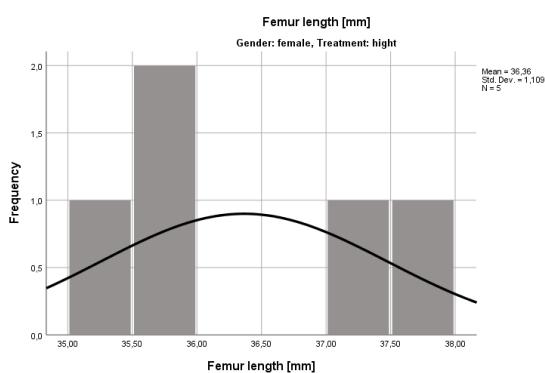
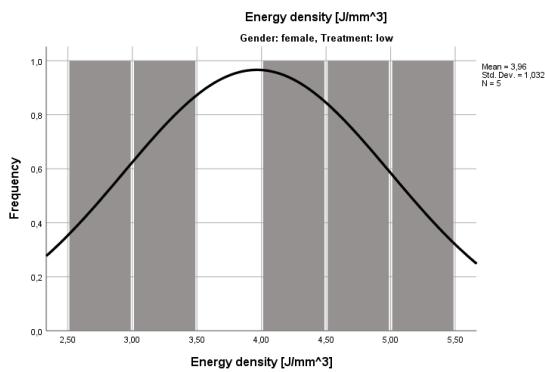
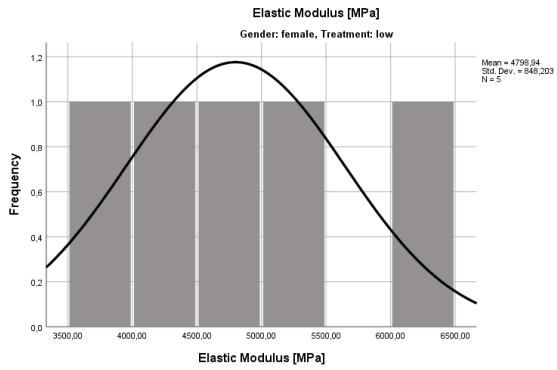


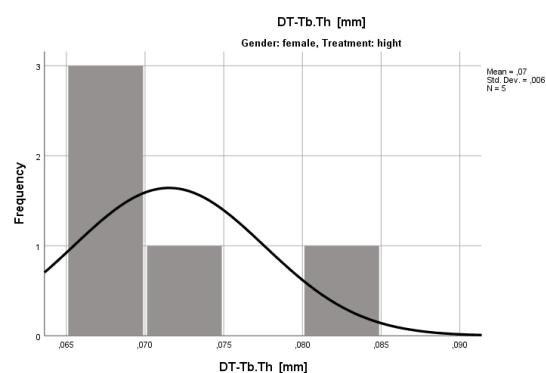
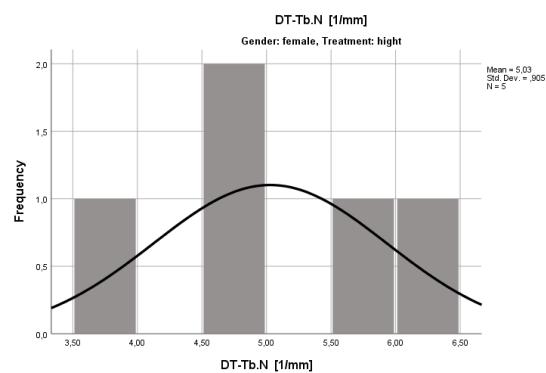
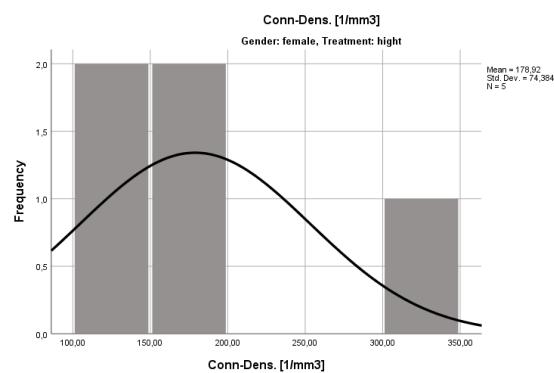


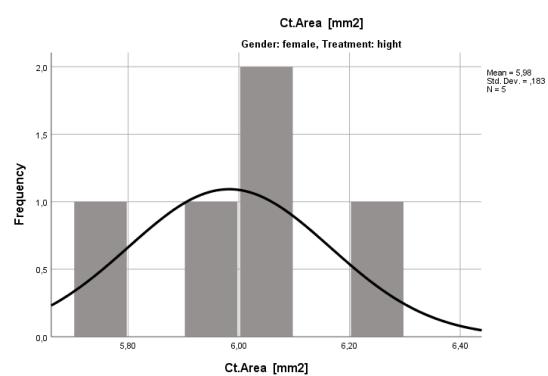
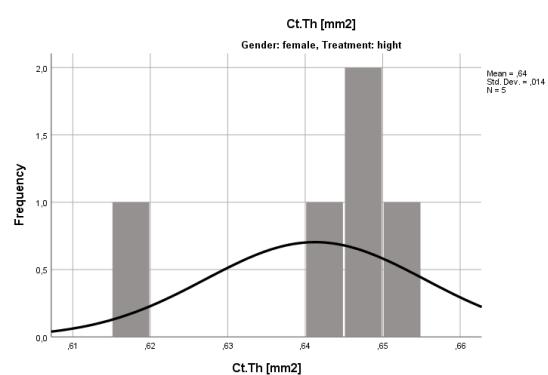
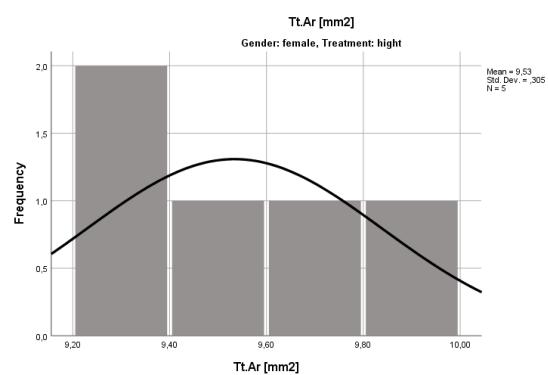
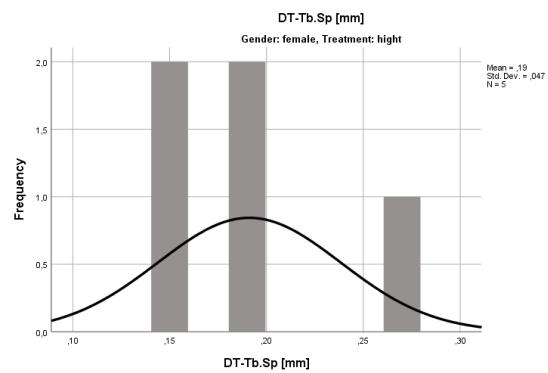


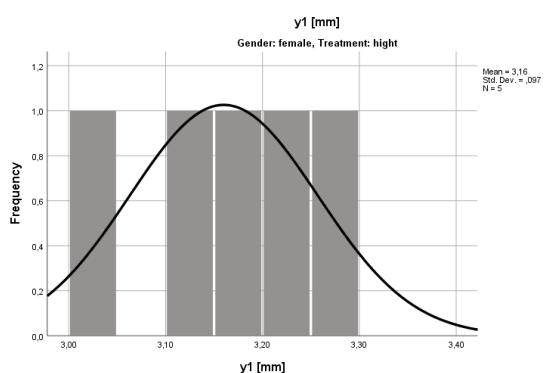
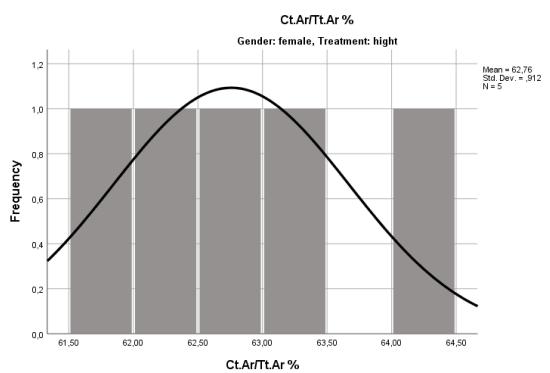
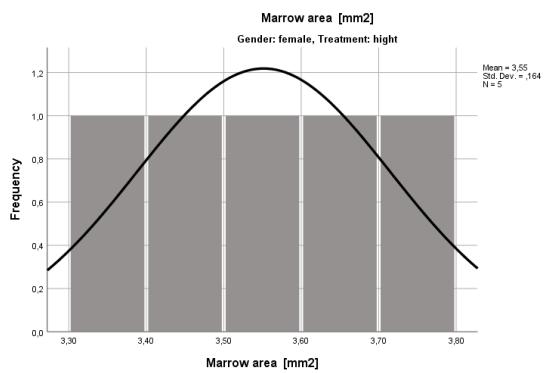


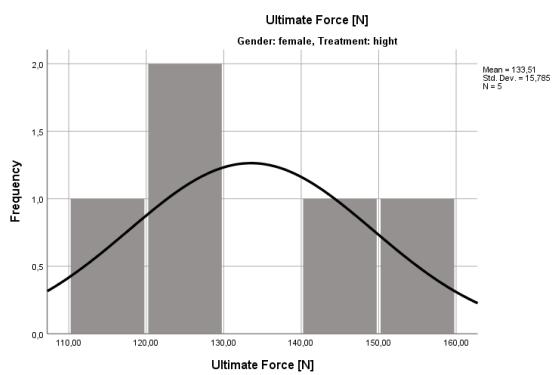
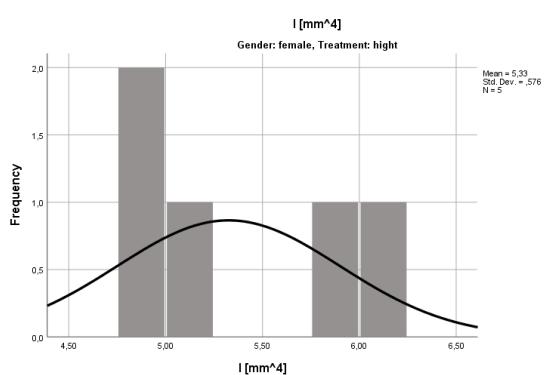
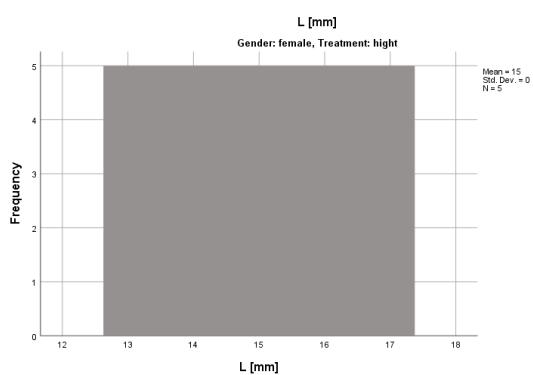
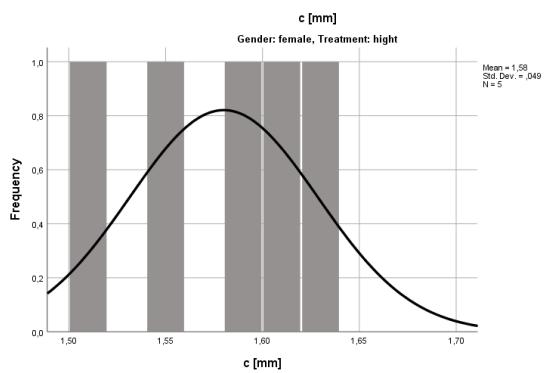


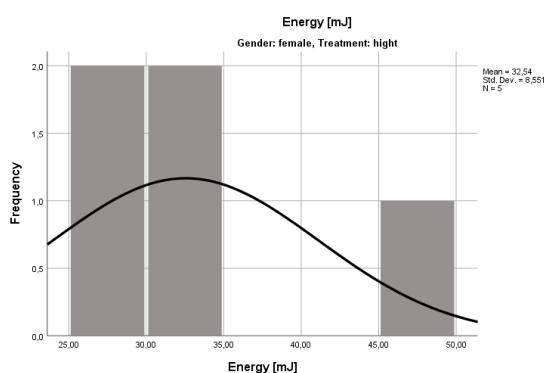
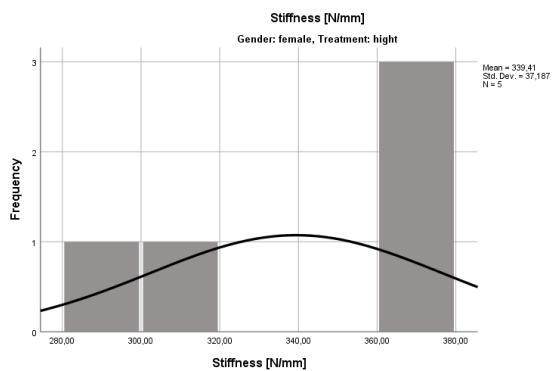
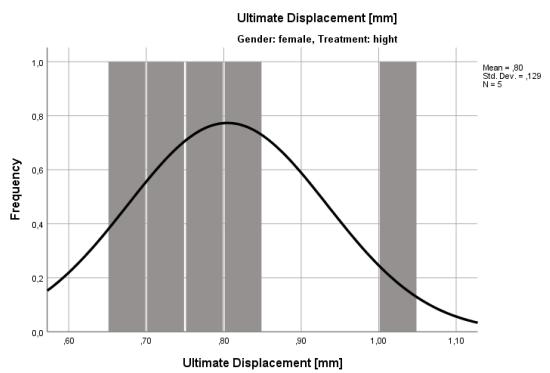


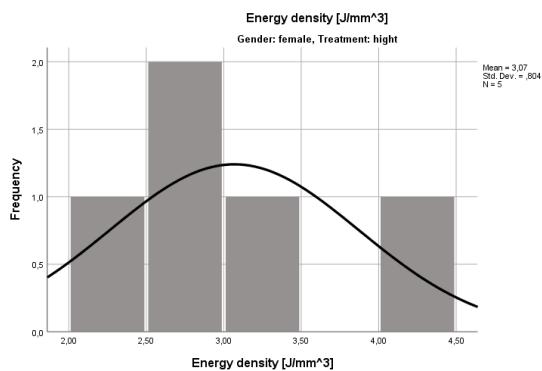
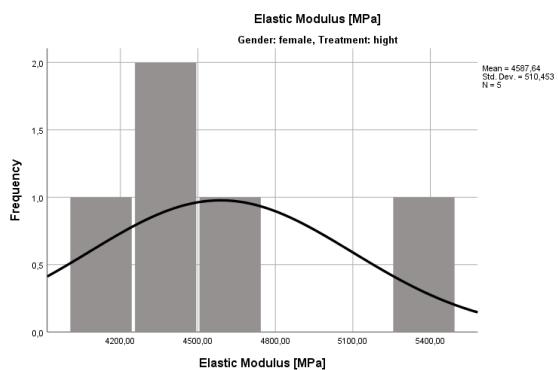
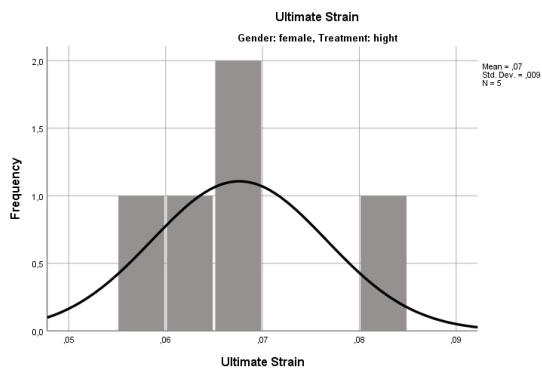
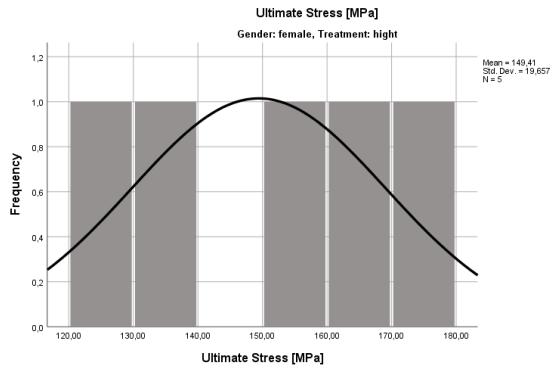


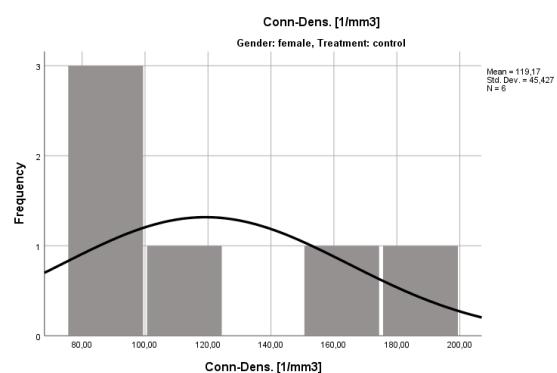
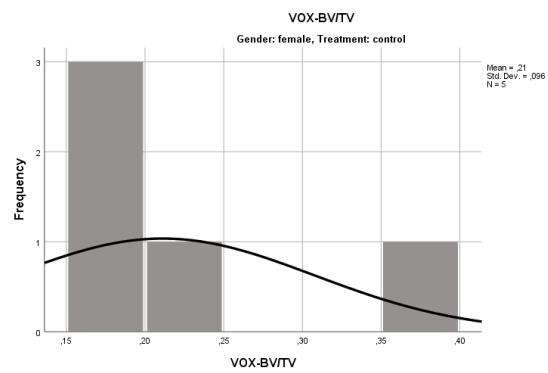
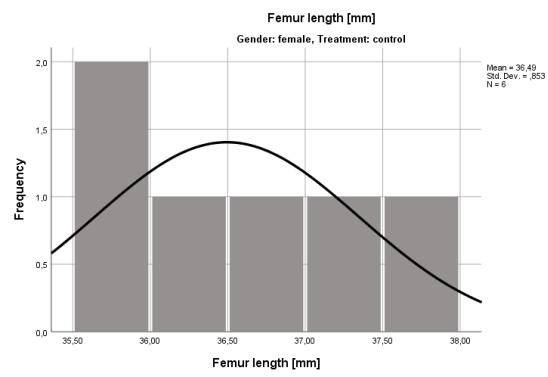


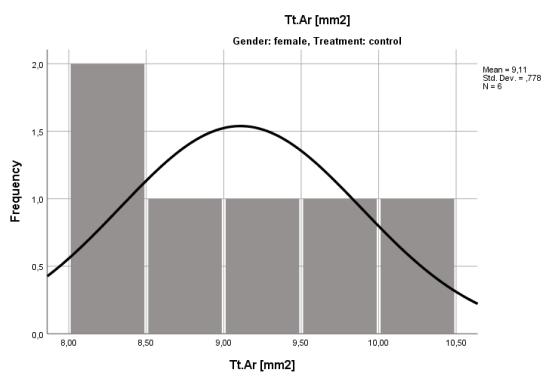
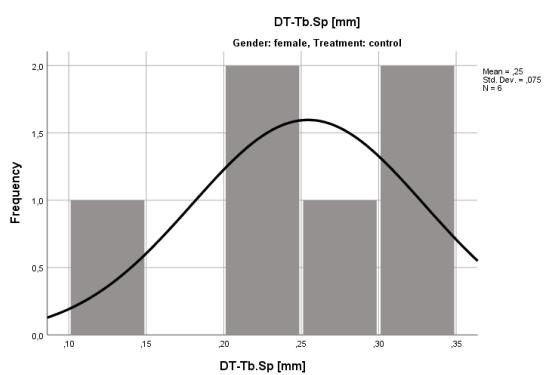
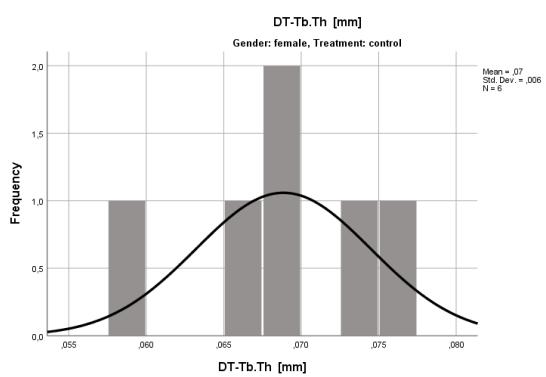
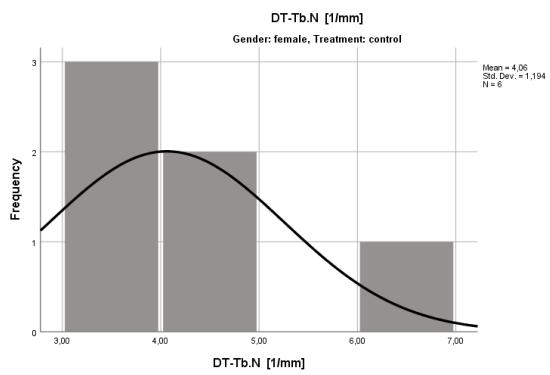


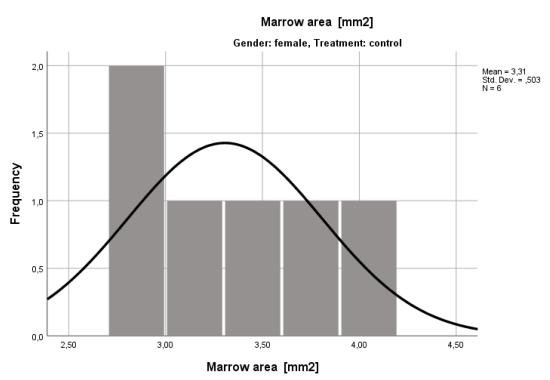
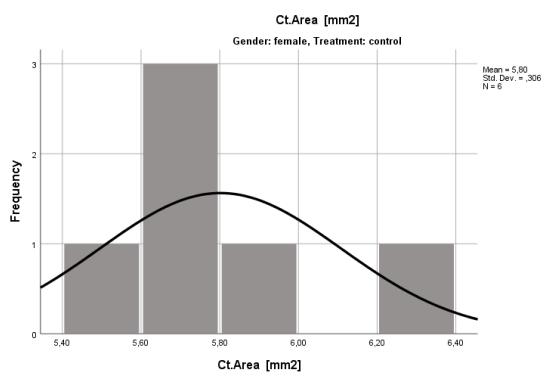
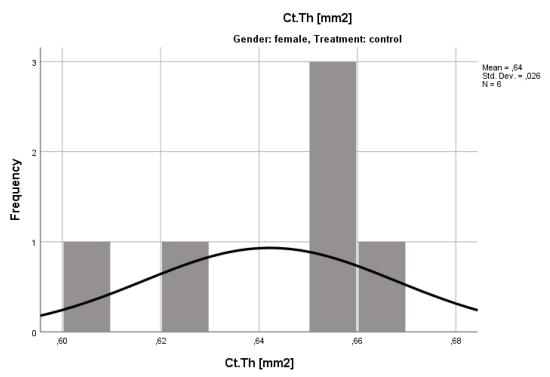


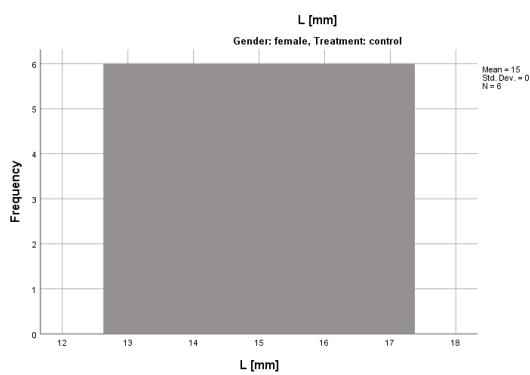
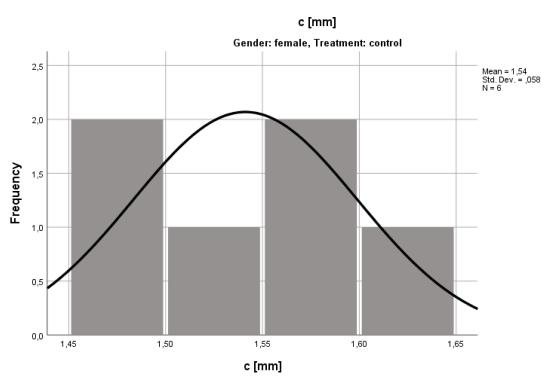
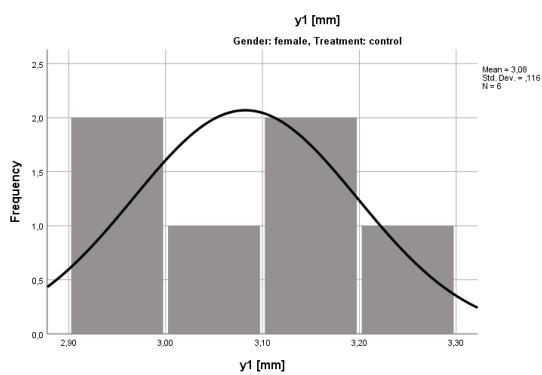
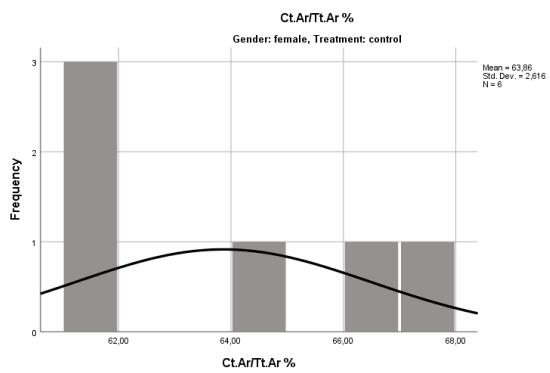


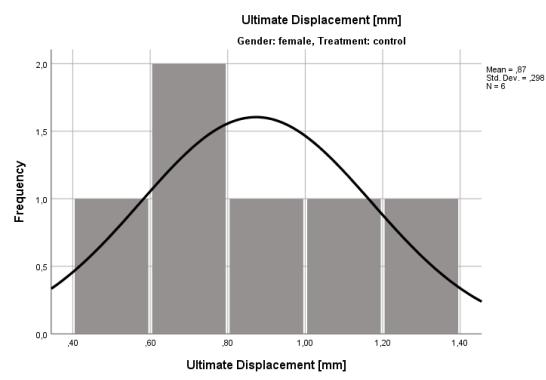
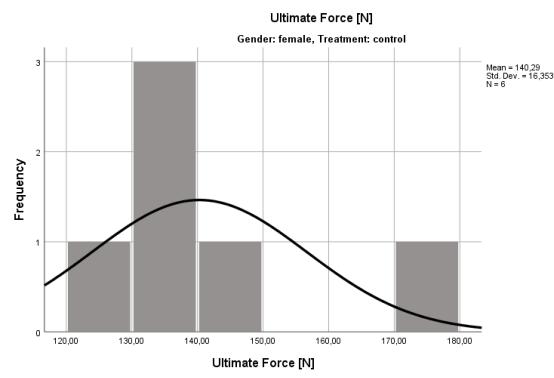
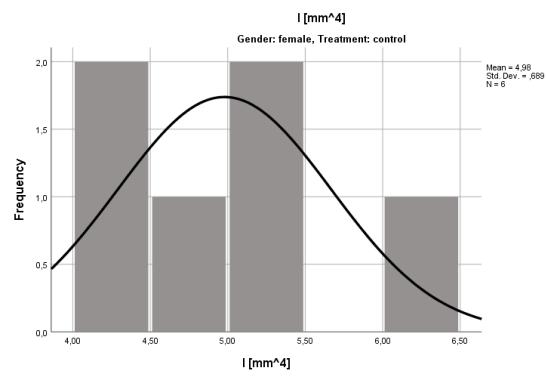


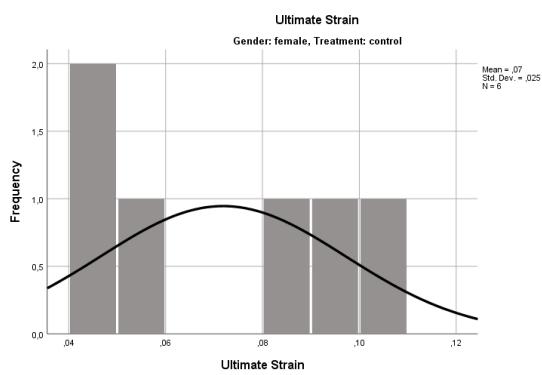
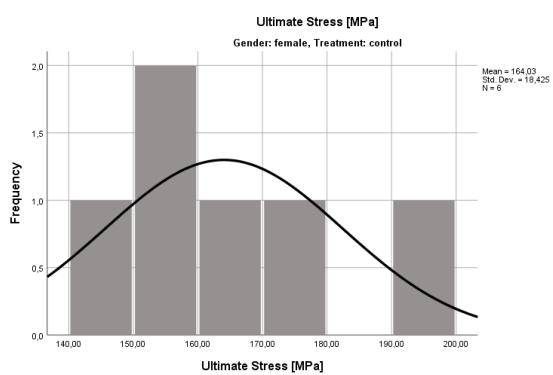
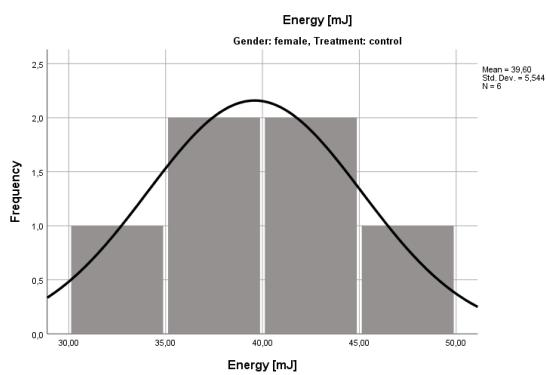
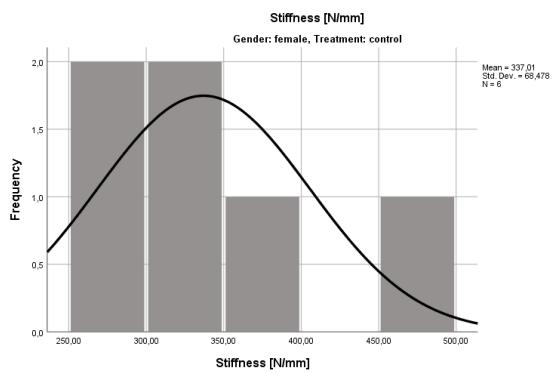


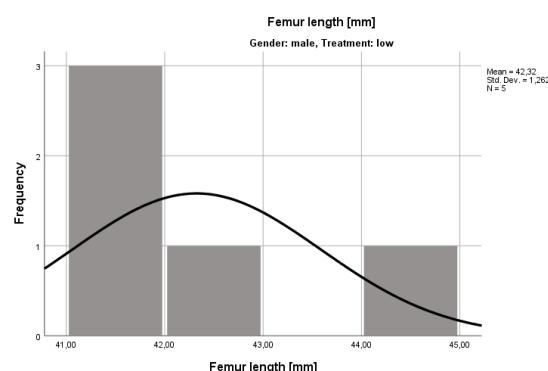
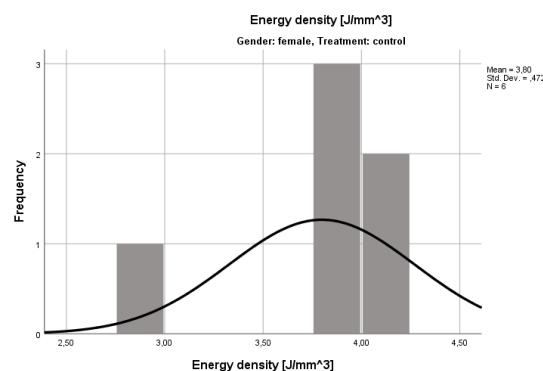
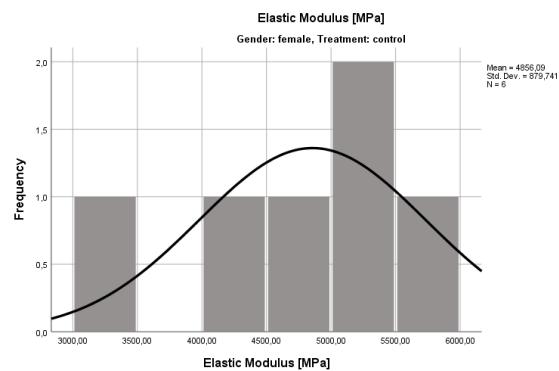


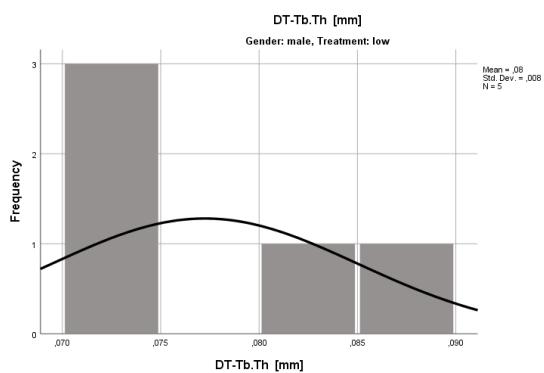
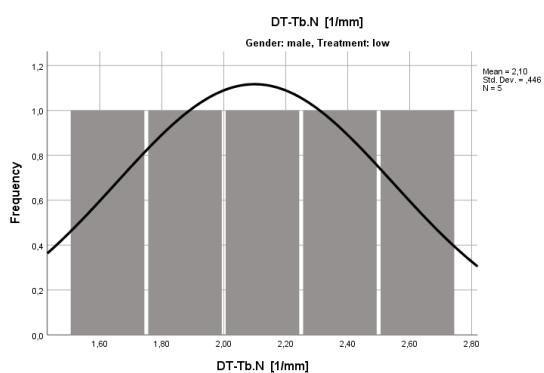
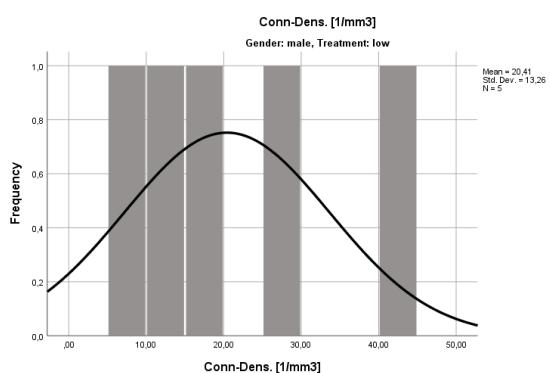
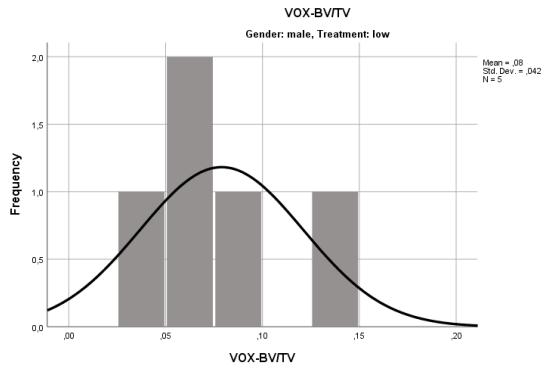


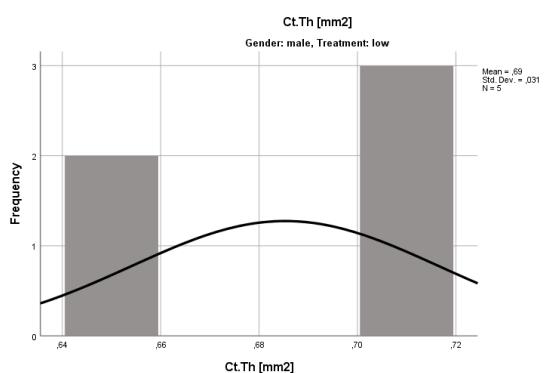
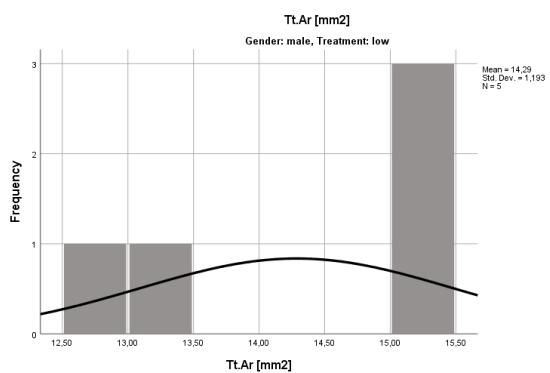
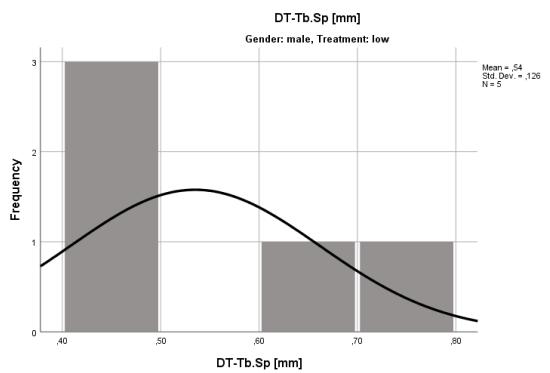


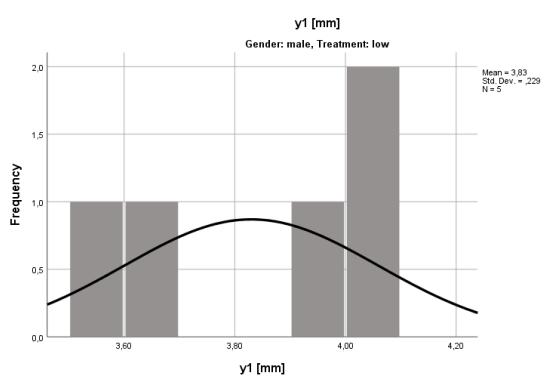
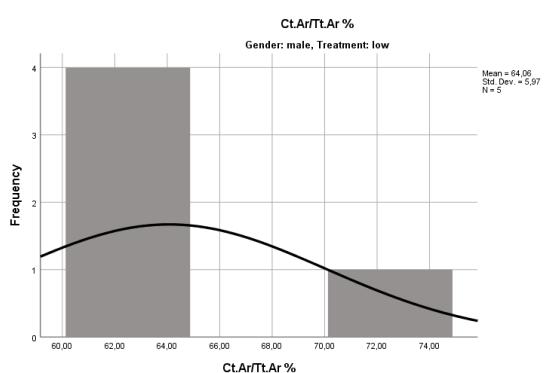
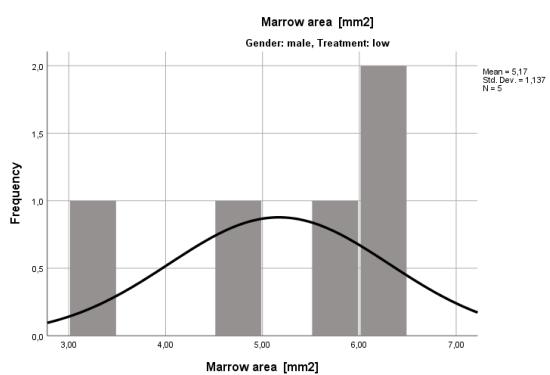
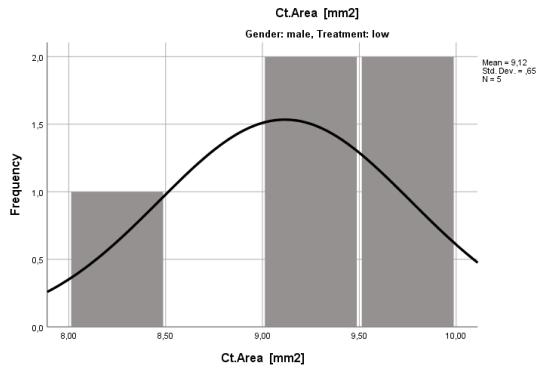


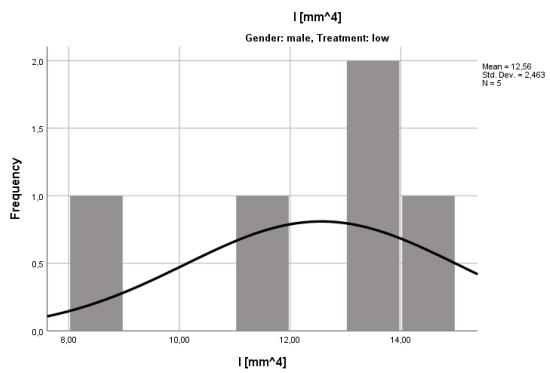
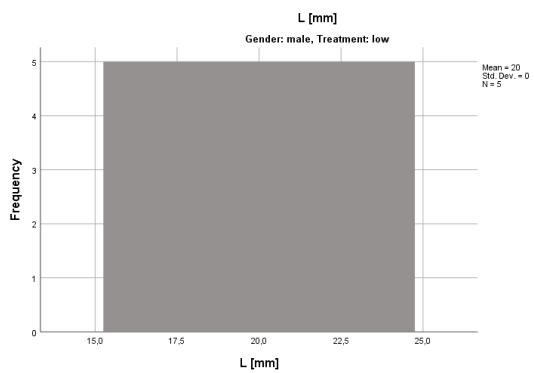
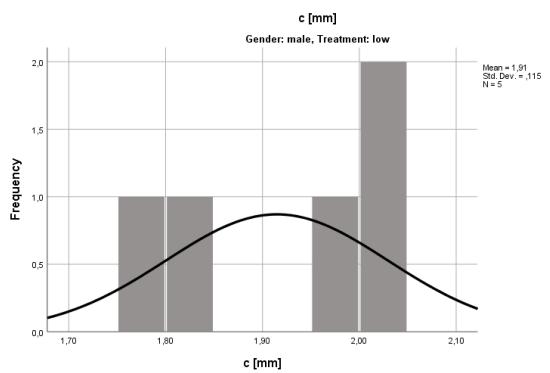


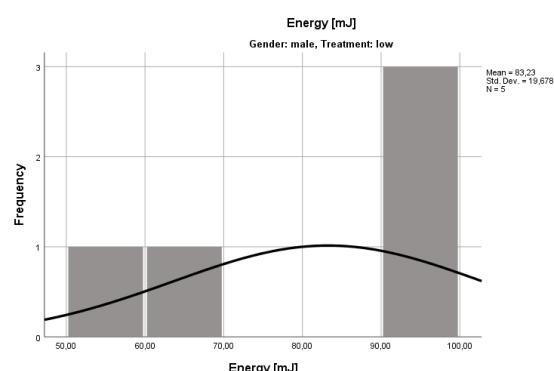
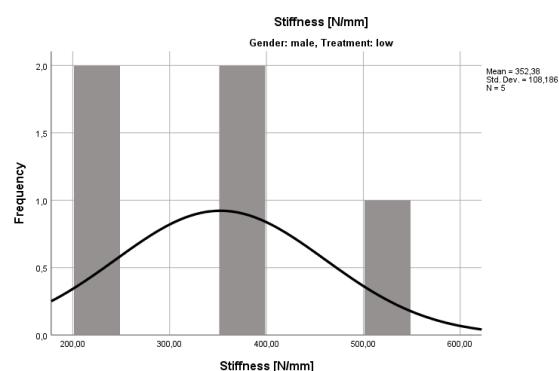
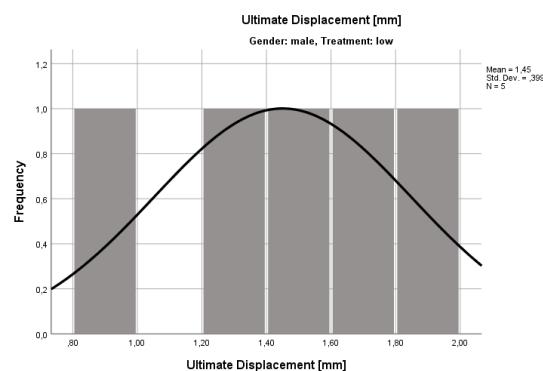
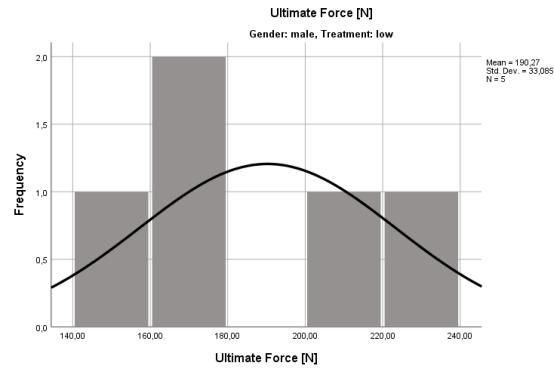


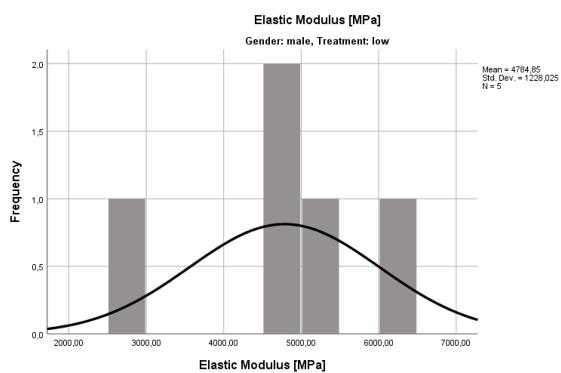
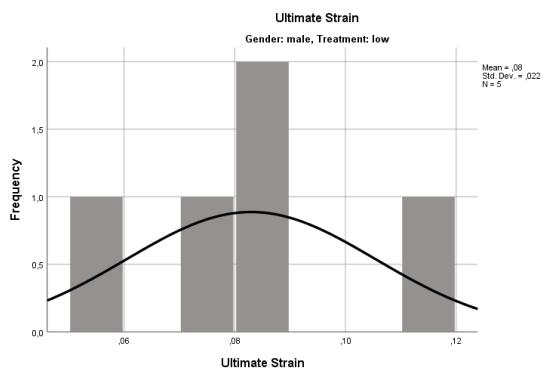
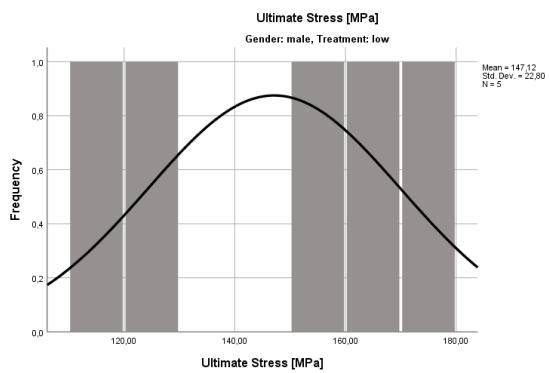


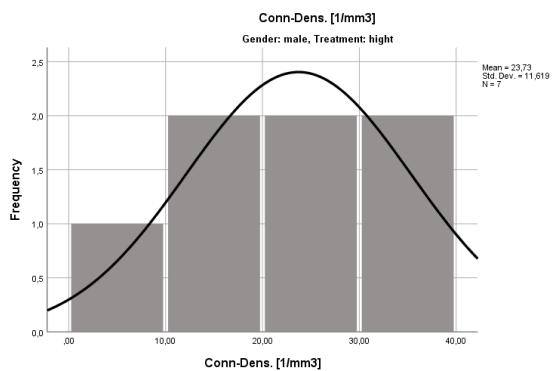
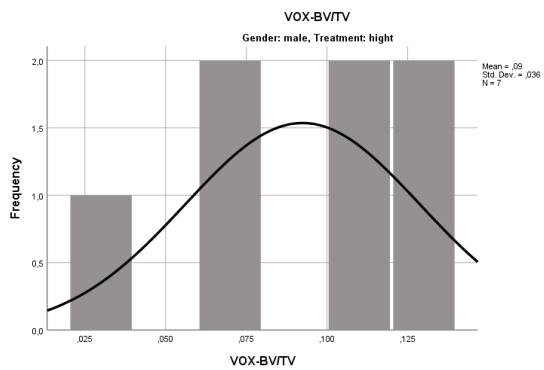
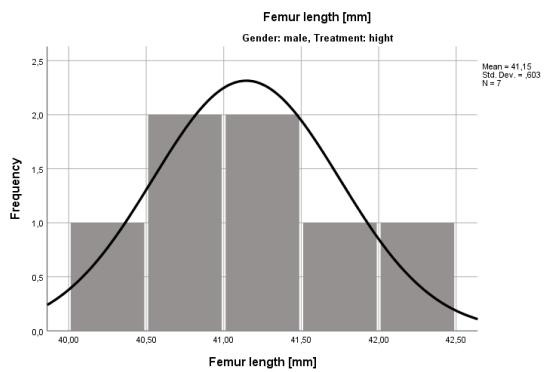
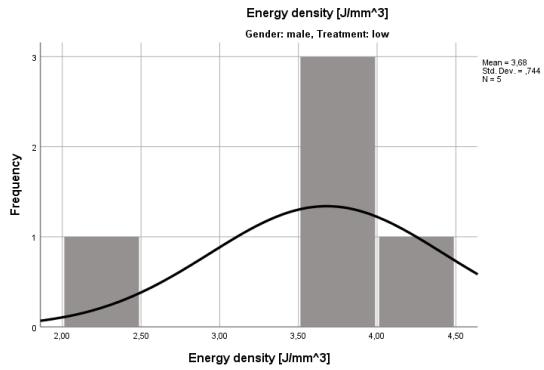


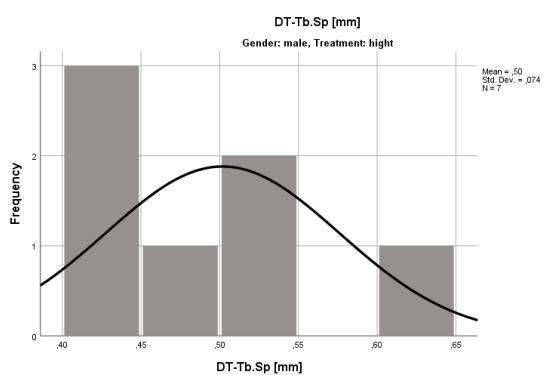
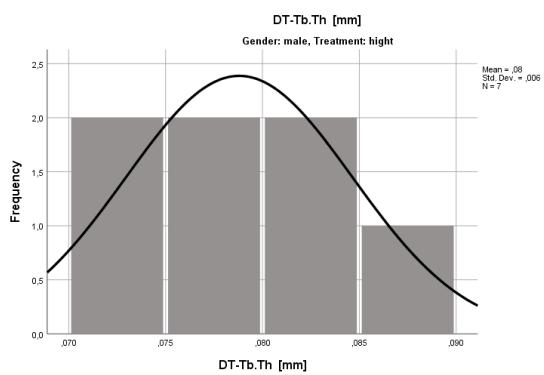
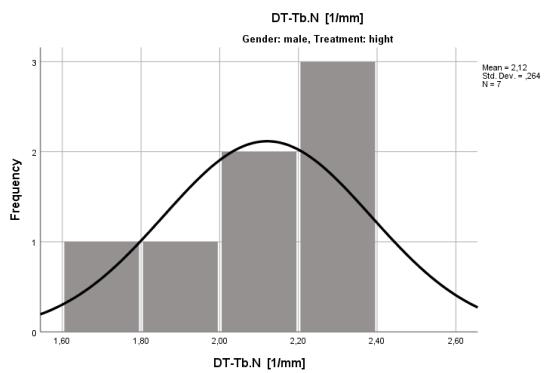


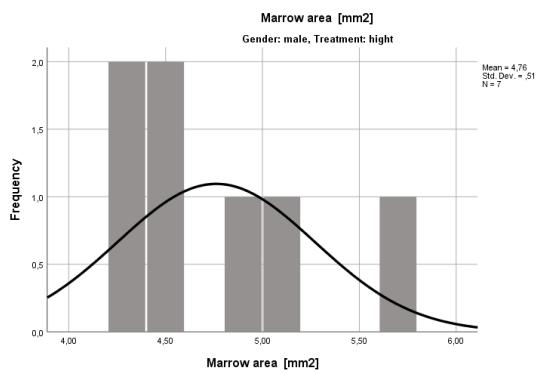
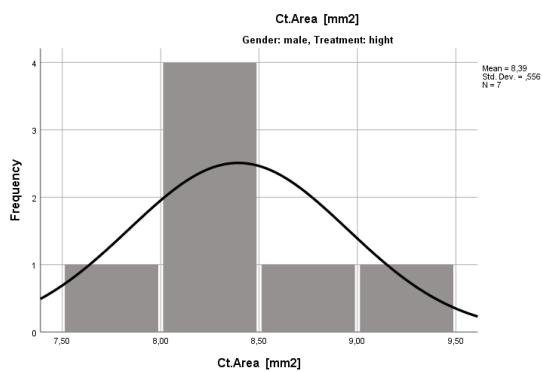
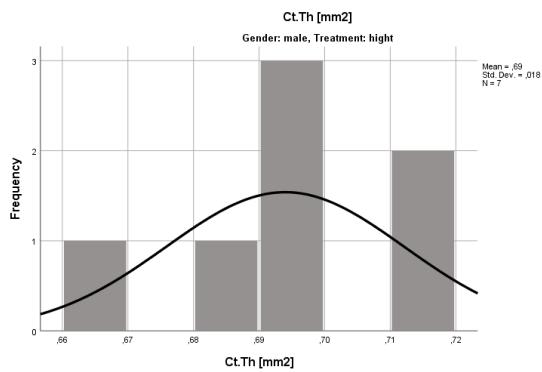
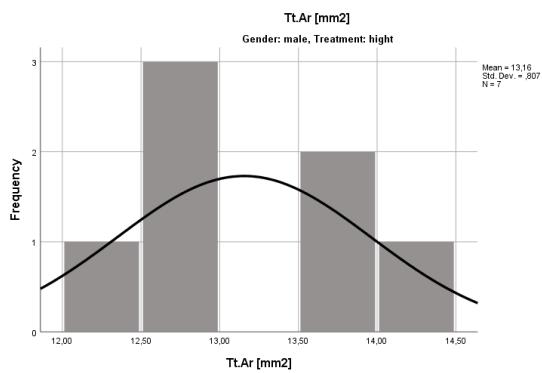


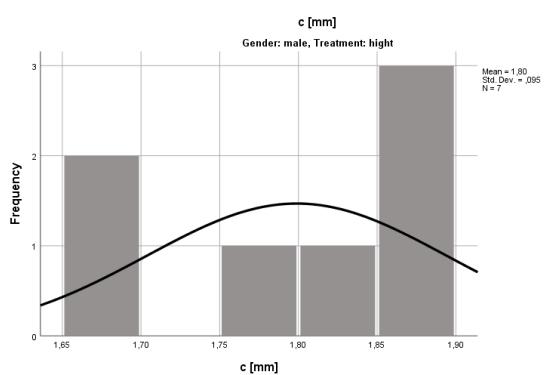
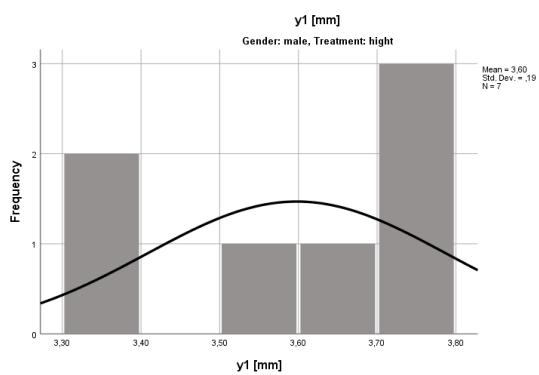
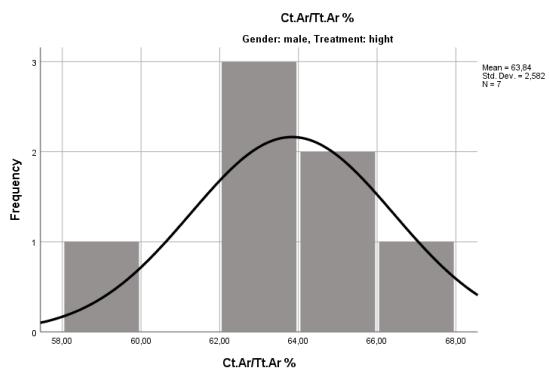


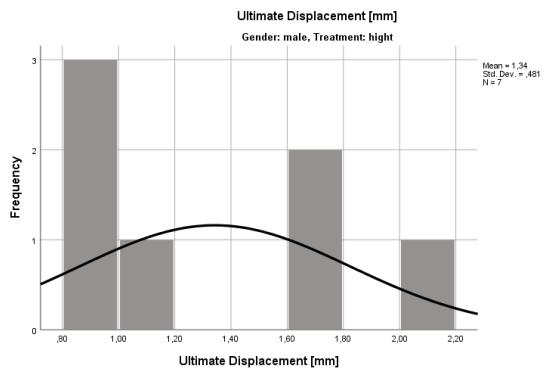
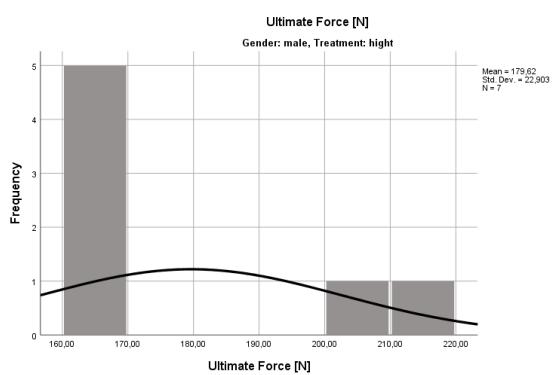
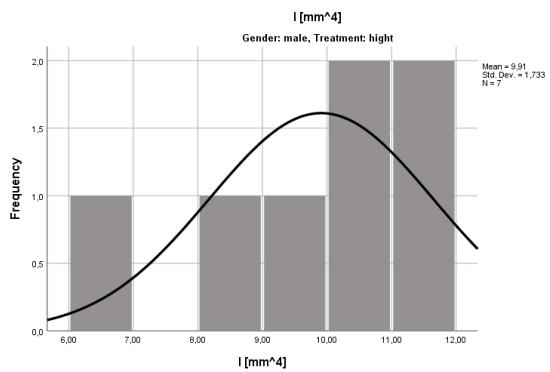
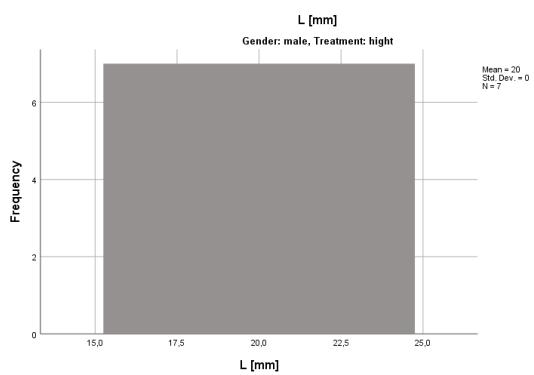


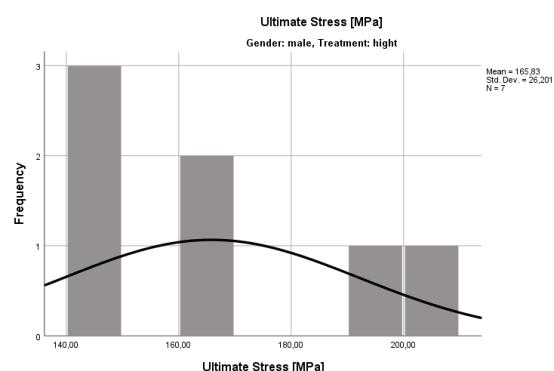
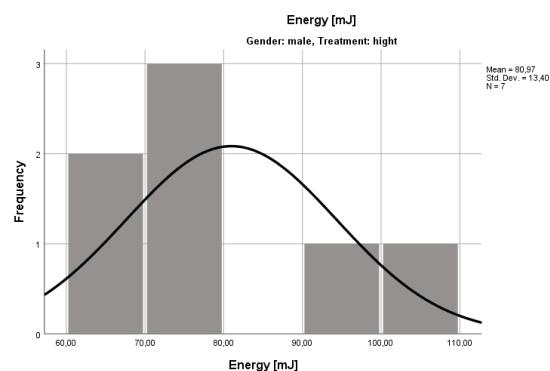
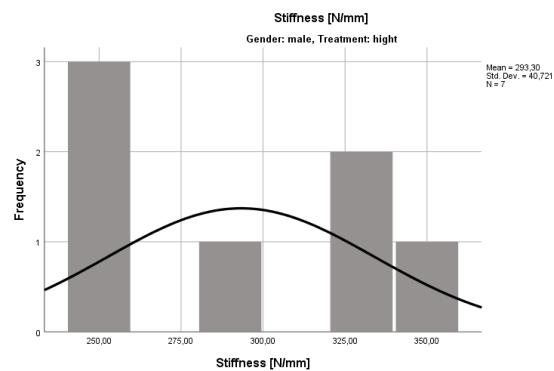


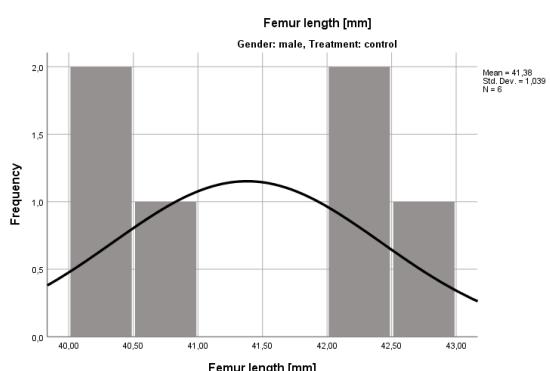
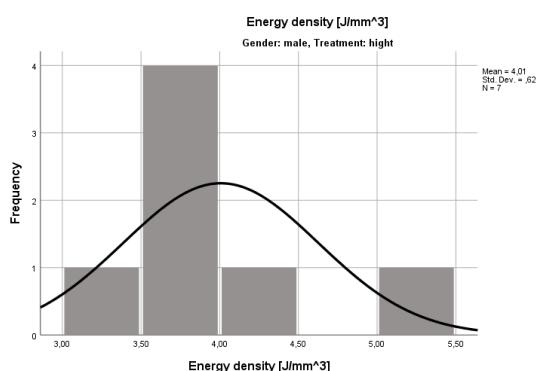
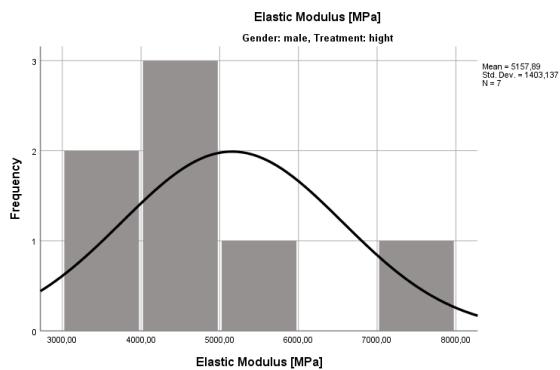
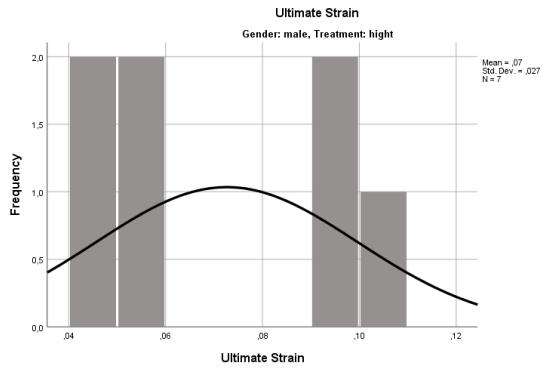


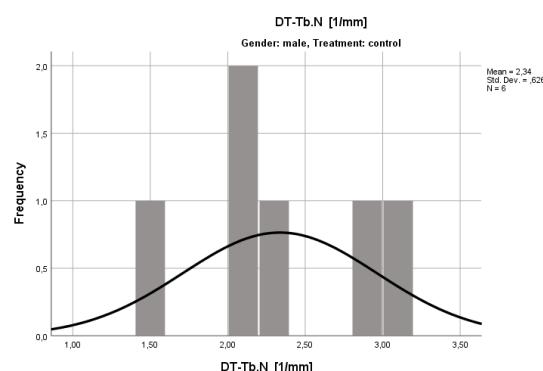
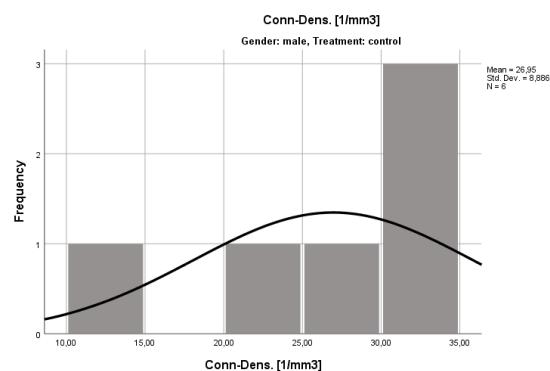
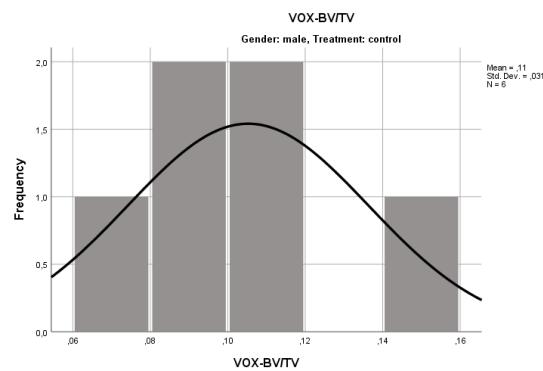


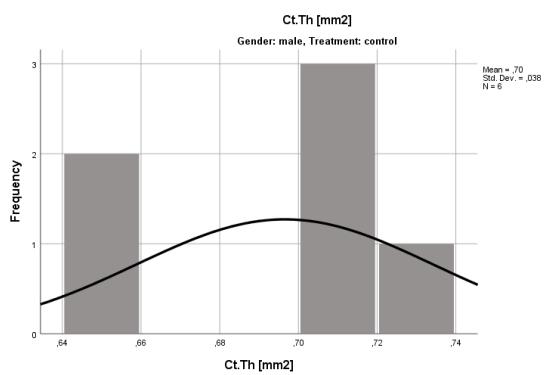
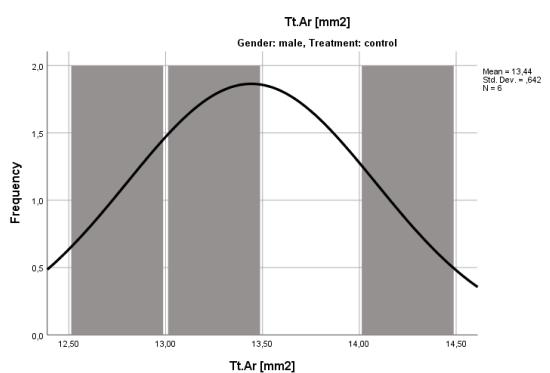
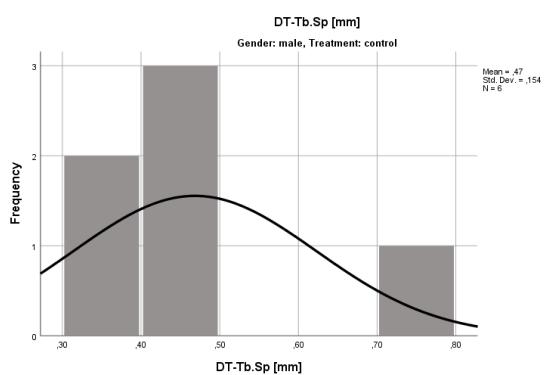
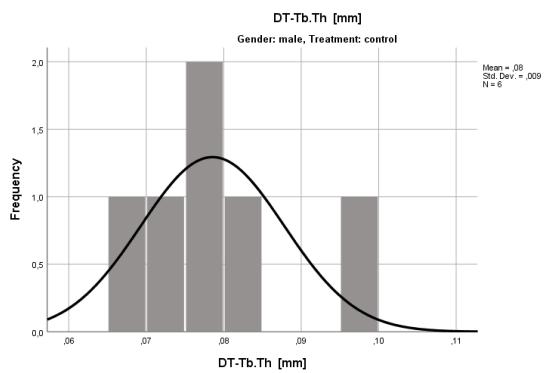


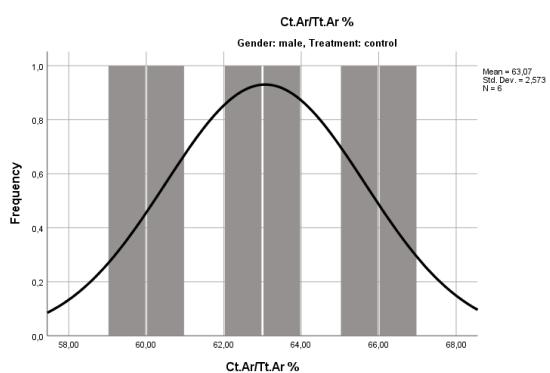
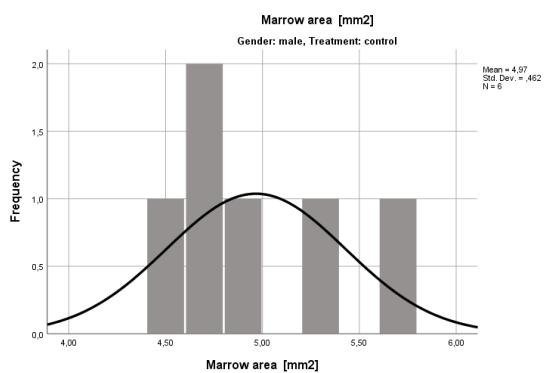
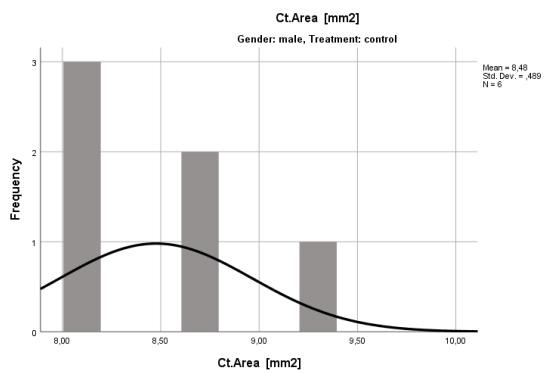


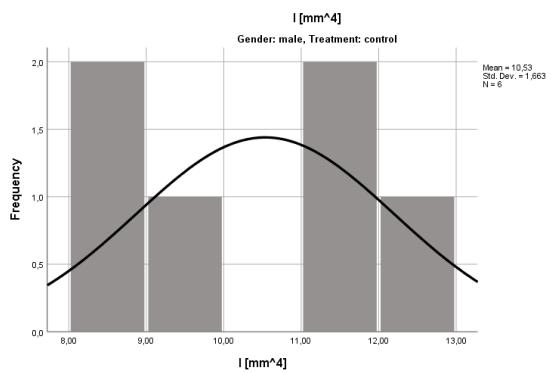
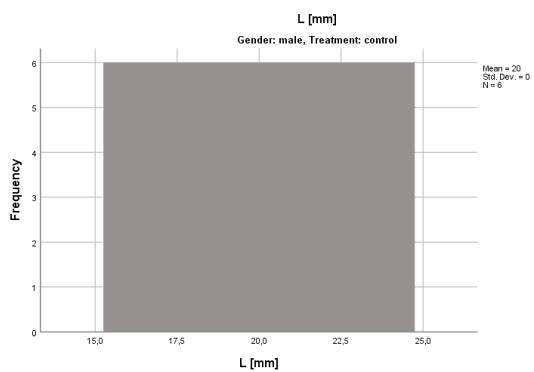
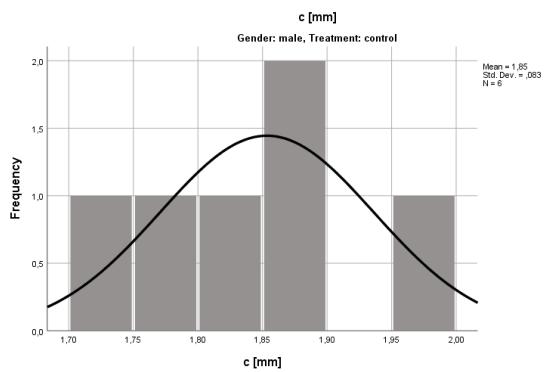
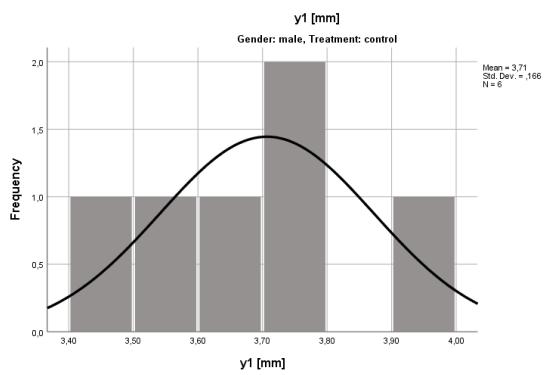


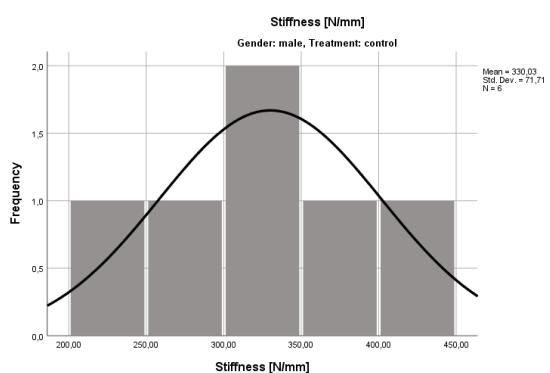
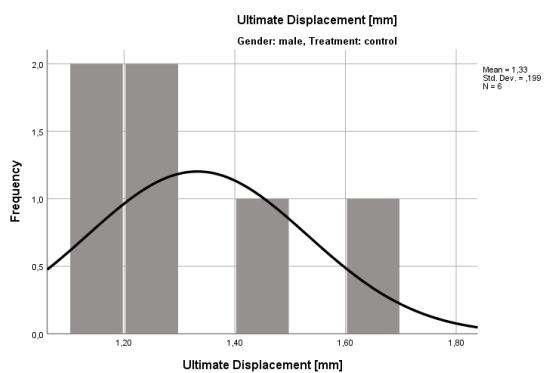
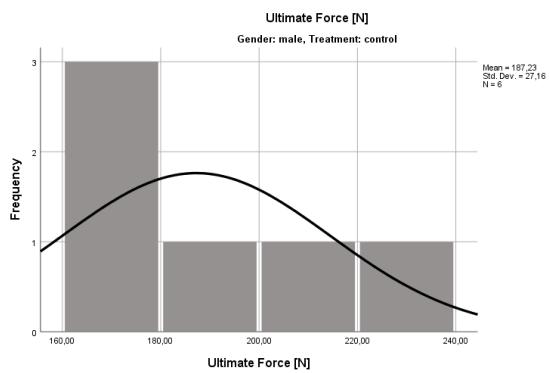


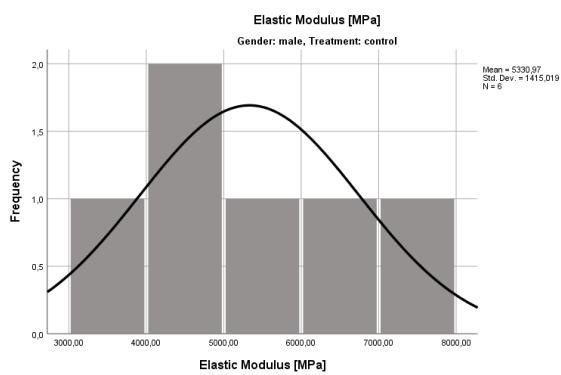
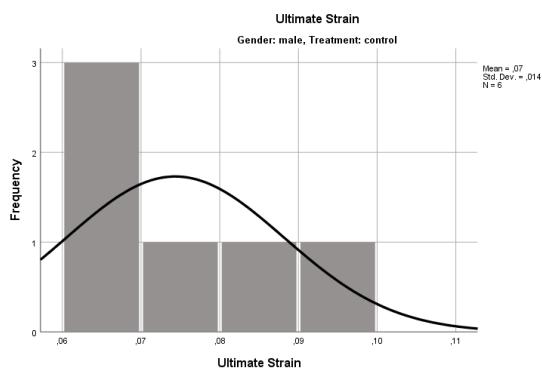
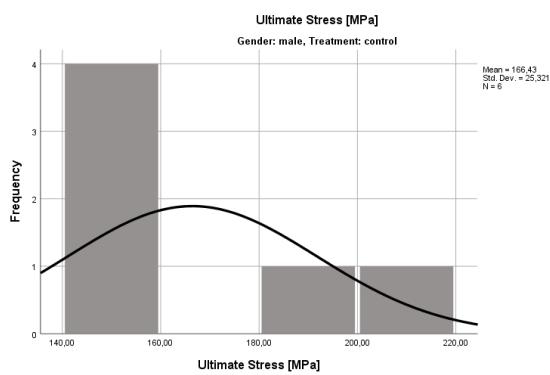
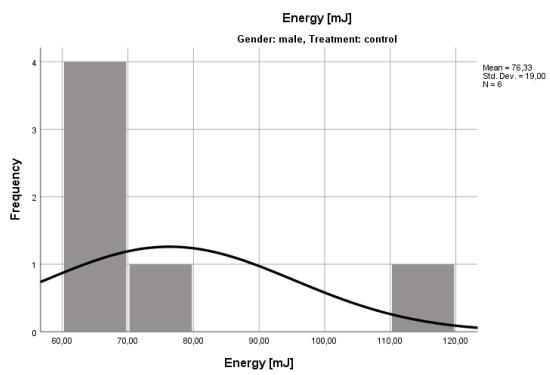


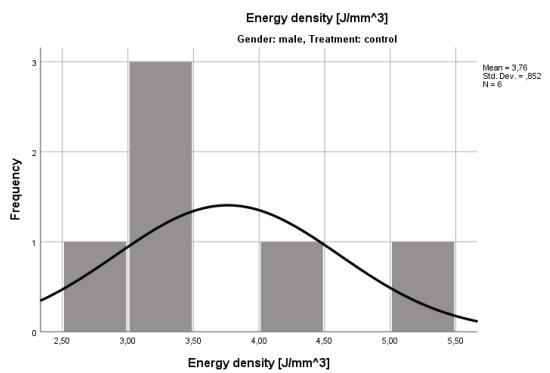












Unterschied Treatment

Statistics

Treatment			Femur length [mm]	VOX-BV/TV	Conn-Dens. [mm ⁻³]	DT-Tb.N [mm ⁻¹]	DT-Tb.Th [mm]	DT-Tb.Sp [mm]	Tt.Ar [mm ²]	Ct.Th [mm ²]	Ct.Area [mm ²]	Marrow area [mm ²]	Ct.Ar/Tt.A r %
low N	Valid		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Missing		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mean		39,446 4	,1482	74,2025	3,1310	,0731	,3824 7	11,671 6	,6682	7,4575	4,2141	64,0515
	Std. Deviation		3,2168 0	,078662	59,4473 7	1,1523 8	,0071 6	,1821 9	2,8780 6	,0325 1	1,8095 1	1,2713 0	4,19011
	Minimum		34,90	,04	8,08	1,53	,07	,21	8,61	,62	5,42	3,03	60,06
	Maximum		44,24	,23	163,68	4,52	,09	,72	15,30	,71	9,71	6,09	74,43
	Percentile s	25	36,864 0	,0628	15,2046	2,0068	,0688	,2156	9,0295 2	,6422	5,7896	3,1729	61,2430
		50	39,322 0	,1724	73,3165	3,1447	,0714	,3447 2	11,213 6	,6582	7,1012	3,4914	63,1730
		75	42,165 0	,2224	122,327 1	4,3054	,0755	,5228 7	15,066	,7066	9,2872	5,6381	65,8066
high N	Valid		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Missing		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mean		39,153 7	,1744	88,3884	3,3323	,0758	,3723 3	11,646 9	,6720	7,3891	4,2571	63,3874
	Std. Deviation		2,5896 6	,11219	92,0414 5	1,6057 0	,0067 9	,1714 9	1,9661 7	,0314 6	1,3125 2	,73460	2,06125
	Minimum		35,22	,04	8,97	1,62	,07	,15	9,23	,62	5,75	3,32	59,27
	Maximum		42,20	,38	300,27	6,09	,09	,64	14,14	,72	9,31	5,76	67,47
	Percentile s	25	36,348 0	,0766	17,3267	2,1452	,0691	,1915 1	9,6016 1	,6479	6,0001	3,5789	62,2593
		50	40,560 0	,1283	37,1501	2,3296	,0763	,4400 1	12,292 6	,6720	7,8542	4,3792	63,4381
		75	41,240 0	,2658	164,227 3	4,8976	,0808	,5155 1	13,574 1	,6983	8,3681	4,7702	64,5048
control I	Valid		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Missing		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mean		38,937 0	,1639	73,0597	3,1990	,0737	,3614 9	11,274 9	,6693	7,1387	4,1362	63,4667
	Std. Deviation		2,7077 6	,0890	57,3839 3	1,2802 4	,0088 9	,1607 2	2,3634 9	,0418 5	1,4495 9	,98162	2,50823
	Minimum		35,54	,06	11,85	1,45	,06	,14	8,26	,60	5,47	2,75	59,94
	Maximum		42,50	,38	195,29	6,13	,10	,74	14,41	,74	9,30	5,77	67,53
	Percentile s	25	36,252 0	,0994	28,9767	2,1506	,0689	,2496 4	8,9161 1	,6480	5,6956	3,2300	61,4162
		50	38,940 0	,1538	55,6938	3,0792	,0730	,3277 4	11,618 8	,6573	7,1887	4,2606	62,8738
		75	41,790 0	,1926	104,902 3	3,8515	,0764	,4751 8	13,271	,7121	8,5215	4,8298	66,1093

Test Statistics^{a,b}

	Femur length [mm]	VOX-BV/TV	Conn-Dens. [mm ⁻³]	DT-Tb.N [mm ⁻¹]	DT-Tb.Th [mm]	DT-Tb.Sp [mm]	Tt.Ar [mm ²]	Ct.Th [mm ²]	Ct.Area [mm ²]	Marrow area [mm ²]	Ct.Ar/Tt.Ar %
Kruskal-Wallis H	,269	,221	,058	,046	1,039	,013	,258	,233	,750	,237	,021
df	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Asymp.	,874	,898	,971	,977	,595	,993	,879	,890	,687	,888	,990
Sig.											

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Treatment

Low - high

Low - high Test Statistics^b

	Femur length [mm]	VOX-BV/TV	Conn-Dens. [mm ⁻³]	DT-Tb.N [mm ⁻¹]	DT-Tb.Th [mm]	DT-Tb.Sp [mm]	Tt.Ar [mm ²]	Ct.Th [mm ²]	Ct.Area [mm ²]	Marrow area [mm ²]	Ct.Ar/Tt.Ar %
Mann-Whitney U	53,500	52,000	55,000	56,000	45,500	58,000	58,000	55,000	60,000	49,000	58,000
Wilcoxon W	131,500	107,000	110,000	111,000	100,500	136,000	113,000	110,000	138,000	104,000	113,000
Z	-,429	-,528	-,330	-,264	-,957	-,132	-,132	-,330	,000	-,725	-,132
Asymp. Sig. (2-tailed)	,668	,598	,742	,792	,339	,895	,895	,742	1,000	,468	,895
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,674 ^a	,628 ^a	,771 ^a	,821 ^a	,346 ^a	,923 ^a	,923 ^a	,771 ^a	1,000 ^a	,497 ^a	,923 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Treatment

Low - control

Test Statistics^b

	Femur length [mm]	VOX-BV/TV	Conn-Dens. [mm ⁻³]	DT-Tb.N [mm ⁻¹]	DT-Tb.Th [mm]	DT-Tb.Sp [mm]	Tt.Ar [mm ²]	Ct.Th [mm ²]	Ct.Area [mm ²]	Marrow area [mm ²]	Ct.Ar/Tt.Ar %
Mann-Whitney U	53,000	56,000	59,000	59,000	56,500	59,000	53,000	53,000	50,000	58,000	60,000
Wilcoxon W	131,000	111,000	114,000	114,000	111,500	137,000	131,000	108,000	128,000	136,000	138,000
Z	-,462	-,264	-,066	-,066	-,231	-,066	-,462	-,462	-,659	-,132	,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	,644	,792	,947	,947	,817	,947	,644	,644	,510	,895	1,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,674 ^a	,821 ^a	,974 ^a	,974 ^a	,821 ^a	,974 ^a	,674 ^a	,674 ^a	,539 ^a	,923 ^a	1,000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Treatment

High - control

Test Statistics^b

	Femur length [mm]	VOX-BV/TV	Conn-Dens. [mm ⁻³]	DT-Tb.N [mm ⁻¹]	DT-Tb.Th [mm]	DT-Tb.Sp [mm]	Tt.Ar [mm ²]	Ct.Th [mm ²]	Ct.Area [mm ²]	Marrow area [mm ²]	Ct.Ar/Tt.Ar %
Mann-Whitney U	70,000	71,000	72,000	71,000	59,000	71,000	65,000	69,000	58,000	70,000	70,000
Wilcoxon W	148,000	149,000	150,000	149,000	137,000	149,000	143,000	147,000	136,000	148,000	148,000
Z	-,116	-,058	,000	-,058	-,751	-,058	-,404	-,173	-,808	-,115	-,115
Asymp. Sig. (2-tailed)	,908	,954	1,000	,954	,453	,954	,686	,862	,419	,908	,908
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,932 ^a	,977 ^a	1,000 ^a	,977 ^a	,478 ^a	,977 ^a	,713 ^a	,887 ^a	,443 ^a	,932 ^a	,932 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Treatment

Statistics

Treatment			y1 [mm]	c [mm]	L [mm]	I [mm ⁴]	Ultimate Force [N]	Ultimate Displaceme nt [mm]	Stiffnes s [N mm ⁻¹]	Energy [mJ]	Ultimate Stress [MPa]	Ultimat e Strain	Elastic Modulus [MPa]
low N	Valid		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Missin g		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mean		3,438	1,719	17,5	8,6918	162,082	1,2483	336,793	62,1903	153,287	,0841	4791,8964
	Std. Deviation		,4495	,2247	2,63	4,4156	37,8159	,36575	78,3393	26,8873	18,7869	,01945	995,01358
	Minimum		2,86	1,43	15	4,04	118,18	,83	246,58	27,01	118,04	,05	2767,22
	Maximum		4,04	2,02	20	14,85	238,69	1,88	502,89	99,10	181,31	,12	6097,41
	Percentile 25		3,059	1,529	15,0	4,8862	134,567	,9655	274,271	38,8928	144,708	,0737	4242,1787
	s		3	6	0		5		2		2		
high N	Valid		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Missin g		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mean		3,415	1,707	17,9	7,9995	160,407	1,1183	312,509	60,7942	158,988	,0705	4920,2847
	Std. Deviation		,2720	,1360	2,57	2,7077	30,6664	,45714	44,3965	27,3215	24,2152	,02084	1120,2064
	Minimum		3,03	1,51	15	4,76	114,39	,69	250,60	25,11	125,51	,05	3871,82
	Maximum		3,77	1,89	20	11,98	215,99	2,02	374,86	104,15	204,63	,11	7925,84
	Percentile 25		3,181	1,590	15,0	5,2883	132,873	,7778	266,215	31,2096	140,457	,0537	4148,8821
	s		0	5	0		9		6		7		
contr ol	Valid		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Missin g		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mean		3,394	1,697	17,5	7,7566	163,757	1,1027	333,521	57,9635	165,230	,0731	5093,5282
	Std. Deviation		,3534	,1767	2,61	3,1446	32,5223	,34065	66,9494	23,3692	21,1498	,01949	1150,4018
	Minimum		2,93	1,47	15	4,18	127,38	,52	232,93	31,06	140,00	,04	3410,04
	Maximum		3,96	1,98	20	12,87	235,03	1,67	450,34	113,96	210,79	,10	7677,37
	Percentile 25		3,078	1,539	15,0	4,8554	132,128	,7978	283,106	38,9230	151,190	,0598	4232,6830
	s		5	3	0		7		6		5		
50	Valid		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Missin g		0	0	0		4		2		3		
75	Valid		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Missin g		3	6	0	0	6		3		0		

Test Statistics^{a,b}

	y1 [mm]	c [mm]	L [mm]	I [mm ⁴]	Ultimate Force [N]	Ultimate Displacement [mm]	Stiffness [N mm ⁻¹]	Energy [mJ]	Ultimate Stress [MPa]	Ultimate Strain	Elastic Modulus [MPa]	Energy density [J mm ⁻³]
Kruskal- Wallis H	,095	,095	,210	,199	,096	1,324	,421	,070	1,088	3,014	,516	,598
df	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Asymp.	,954	,954	,900	,905	,953	,516	,810	,966	,581	,222	,773	,742
Sig.												

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Treatment

Low - high

Test Statistics^b

	y1 [mm]	c [mm]	L [mm]	I [mm ⁴]	Ultimat e Force [N]	Ultimate Displaceme nt [mm]	Stiffnes s [N/mm]	Energy [mJ]	Ultimat e Stress [MPa]	Ultimat e Strain	Elastic Modulu s [MPa]	Energy density [J mm ^{- 3}]	Ct.Ar/Tt. Ar %
Mann- Whitney U	57,000	57,000	55,000	58,000	59,000	44,000	52,000	57,000	54,000	36,000	54,000	48,000	58,000
Wilcoxo n W	112,00	112,00	110,00	136,00	114,00	122,000	130,00	135,00	109,00	114,00	132,00	126,00	113,000
Z	-,198	-,198	-,382	-,132	-,066	-1,055	-,528	-,198	-,396	-,1,583	-,396	-,791	-,132
Asymp.	,843	,843	,703	,895	,947	,291	,598	,843	,692	,114	,692	,429	,895
Sig. (2- tailed)													
Exact Sig. [2*(1- tailed Sig.)]	,872 ^a	,872 ^a	,771 ^a	,923 ^a	,974 ^a	,314 ^a	,628 ^a	,872 ^a	,722 ^a	,123 ^a	,722 ^a	,456 ^a	,923 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Treatment

Low - control

Test Statistics^b

	y1 [mm]	c [mm]	L [mm]	I [mm ⁴]	Ultimat e Force [N]	Ultimate Displaceme nt [mm]	Stiffnes s [N mm ⁻¹]	Energy [mJ]	Ultimat e Stress [MPa]	Ultimat e Strain	Elastic Modulu s [MPa]	Energy density [J mm ⁻³]	Ct.Ar/Tt. Ar %
Mann-Whitney U	57,000	57,000	60,000	54,000	60,000	48,000	60,000	58,000	45,000	39,000	55,000	55,000	60,000
Wilcoxon W	135,000	135,000	138,000	132,000	138,000	126,000	138,000	136,000	100,000	117,000	110,000	133,000	138,000
Z	-,198	-,198	,000	-,396	,000	-,791	,000	-,132	-,989	-1,385	-,330	-,330	,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	,843	,843	1,000	,692	1,000	,429	1,000	,895	,323	,166	,742	,742	1,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,872 ^a	,872 ^a	1,000 ^a	,722 ^a	1,000 ^a	,456 ^a	1,000 ^a	,923 ^a	,346 ^a	,180 ^a	,771 ^a	,771 ^a	1,000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Treatment

High - control

Test Statistics^b

	y1 [mm]	c [mm]	L [mm]	I [mm ⁴]	Ultimat e Force [N]	Ultimate Displaceme nt [mm]	Stiffnes s [N mm ⁻¹]	Energy [mJ]	Ultimat e Stress [MPa]	Ultimat e Strain	Elastic Modulu s [MPa]	Energy density [J mm ⁻³]	Ct.Ar/Tt. Ar %
Mann-Whitney U	67,500	67,500	66,000	66,000	64,000	63,000	62,000	67,000	60,000	65,000	60,000	65,000	70,000
Wilcoxon W	145,500	145,500	144,000	144,000	142,000	141,000	140,000	145,000	138,000	143,000	138,000	143,000	148,000
Z	-,260	-,260	-,401	-,346	-,462	-,520	-,577	-,289	-,693	-,404	-,693	-,404	-,115
Asymp. Sig. (2-tailed)	,795	,795	,688	,729	,644	,603	,564	,773	,488	,686	,488	,686	,908
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,799 ^a	,799 ^a	,755 ^a	,755 ^a	,671 ^a	,630 ^a	,590 ^a	,799 ^a	,514 ^a	,713 ^a	,514 ^a	,713 ^a	,932 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Treatment

Statistics

Gender				Femur length [mm]	VOX-BV/T V	Conn-Dens. [mm ⁻³]	DT-Tb.N [mm ⁻¹]	DT-Tb.Th [mm]	DT-Tb.Sp [mm]	Tt.Ar [mm ²]	Ct.Th [mm ²]	Ct.Are a [mm ²]	Marrow area [mm ²]	Ct.Ar/Tt.A r %	
female	low	N	Valid	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
			Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			Mean	36,568	,2175	127,997	4,1622	,0689	,2299	9,0573	,6511	5,7992	3,2581	64,0388	
				8		4									
			Std. Deviation	,99483	,0114	23,2579	,36034	,0034	,0223	,35774	,0258	,26284	,24210	1,96455	
				0		2		2	3		2				
			Minimum	34,90	,20	105,52	3,63	,07	,21	8,61	,62	5,42	3,03	61,61	
			Maximum	37,46	,23	163,68	4,52	,07	,26	9,50	,69	6,16	3,65	66,42	
			Percentile	25	35,700	,2074	110,490	3,8050	,0653	,2144	8,7039	,6297	5,5946	3,0691	62,2649
			s	0		1									
			50	36,984	,2214	116,992	4,2687	,0699	,2157	9,1075	,6442	5,7961	3,1930	63,6413	
				0		8									
			75	37,230	,2258	151,007	4,4663	,0721	,2525	9,3857	,6760	6,0053	3,4798	66,0114	
			0			0									
	high	N	Valid	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
			Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			Mean	36,364	,2892	178,916	5,0287	,0715	,1911	9,5340	,6413	5,9826	3,5514	62,7575	
				8		6									
			Std. Deviation	1,1089	,0663	74,3843	,90528	,0060	,0472	,30499	,0141	,18254	,16369	,91240	
				6	0	6		7	7		8				
			Minimum	35,22	,21	102,88	3,74	,07	,15	9,23	,62	5,75	3,32	61,56	
			Maximum	37,62	,38	300,27	6,09	,08	,27	9,91	,65	6,25	3,75	64,01	
			Percentile	25	35,382	,2359	121,003	4,2251	,0671	,1518	9,2299	,6294	5,8298	3,4001	61,9345
			s	0		2									
			50	35,976	,2663	172,592	4,9588	,0684	,1908	9,5531	,6473	6,0001	3,5528	62,8097	
				0		7									
			75	37,542	,3540	239,992	5,8672	,0775	,2306	9,8285	,6502	6,1266	3,7020	63,5544	
			0			0									
	control	N	Valid	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	
			Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			Mean	36,494	,2226	119,165	4,0621	,0689	,2544	9,1078	,6421	5,8017	3,3061	63,8623	
				0		8									
			Std. Deviation	,85257	,0827	45,4266	1,1941	,0056	,0749	,77801	,0256	,30627	,50299	2,61613	
				6	3	5		7			9				
			Minimum	35,54	,15	76,67	3,02	,06	,14	8,26	,60	5,47	2,75	61,32	
			Maximum	37,62	,38	195,29	6,13	,08	,33	10,38	,66	6,36	4,01	67,53	
			Percentile	25	35,661	,1539	83,1576	3,1073	,0649	,1858	8,4107	,6155	5,6252	2,7770	61,6047
			s	0											
			50	36,480	,1840	103,178	3,6892	,0690	,2641	8,9975	,6548	5,7018	3,3147	63,1819	
				0		1									
			75	37,260	,3050	162,339	5,0596	,0736	,3268	9,7598	,6593	6,0119	3,7479	66,5748	
			0			4									
	male	low	N	Valid	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
			Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			Mean	42,324	,0789	20,4077	2,0997	,0772	,5350	14,286	,6853	9,1159	5,1701	64,0642	
				0						0					
			Std. Deviation	1,2615	,0421	13,2601	,44647	,0077	,1264	1,1925	,0313	,65021	1,1371	5,97021	
				4	8	4		9	3	3	0		1		

		Minimum	41,18	,04	8,08	1,53	,07	,42	12,92	,65	8,05	3,33	60,06
		Maximum	44,24	,15	41,11	2,66	,09	,72	15,30	,71	9,71	6,09	74,43
		Percentile 25	41,280	,0475	9,6185	1,6886	,0712	,4275	12,984	,6512	8,5618	4,1069	60,1073
	s		0						2				
		50	41,920	,0640	16,5535	2,0593	,0739	,4959	15,050	,7064	9,2012	5,5052	62,2493
			0						7				
		75	43,570	,1178	33,1239	2,5310	,0850	,6622	15,205	,7089	9,6273	6,0658	68,9286
			0						5				
high	N	Valid	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
		Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mean	41,145	,0924	23,7255	2,1206	,0788	,5018	13,155	,6940	8,3939	4,7612	63,8373
			7						1				
		Std. Deviation	,60329	,0363	11,6186	,26389	,0058	,0742	,80702	,0181	,55647	,50991	2,58216
					6	0		5	6		4		
		Minimum	40,36	,04	8,97	1,62	,07	,43	12,06	,66	7,69	4,37	59,27
		Maximum	42,20	,13	38,26	2,34	,09	,64	14,14	,72	9,31	5,76	67,47
	s	Percentile 25	40,760	,0602	13,4147	1,9362	,0717	,4485	12,524	,6817	8,0166	4,3901	62,2420
			0						0				
		50	41,060	,1088	26,8316	2,1847	,0795	,4794	12,879	,6966	8,3261	4,4915	63,9621
			0						7				
		75	41,540	,1235	36,0386	2,3222	,0828	,5320	13,956	,7104	8,9270	5,0297	65,4762
			0						8				
control	N	Valid	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
I		Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mean	41,380	,1053	26,9535	2,3360	,0786	,4684	13,442	,6965	8,4758	4,9663	63,0712
			0						1				
		Std. Deviation	1,0390	,0310	8,88621	,62636	,0092	,1540	,64201	,0376	,48853	,46154	2,57313
			8	7			5	2		7			
		Minimum	40,26	,06	11,85	1,45	,07	,31	12,86	,65	8,01	4,51	59,94
		Maximum	42,50	,16	34,72	3,17	,10	,74	14,41	,74	9,30	5,77	66,23
	s	Percentile 25	40,260	,0897	18,9435	1,9289	,0723	,3313	12,869	,6508	8,0689	4,6474	60,5575
			0						9				
		50	41,480	,0998	30,0881	2,1810	,0762	,4674	13,233	,7118	8,4028	4,8000	62,8738
			0						9				
		75	42,350	,1234	33,9307	2,9976	,0843	,5520	14,131	,7241	8,8124	5,3603	65,8656
			0						9				

Unterschied Treatment und Geschlecht

Test Statistics^{a,b}

Gender	Femur length [mm]	VOX-BV/TV	Conn-Dens. [mm ⁻³]	DT-Tb.N [mm ⁻¹]	DT-Tb.Th [mm]	DT-Tb.Sp [mm]	Tt.Ar [mm ²]	Ct.Th [mm ²]	Ct.Area [mm ²]	Marrow area [mm ²]	Ct.Ar/Tt.Ar %
female	Kruskal-Wallis H	,052	3,640	3,118	3,559	,322	3,188	3,118	,722	2,853	2,647
	df	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Asymp. Sig.	,974	,162	,210	,169	,851	,203	,210	,697	,240	,266
male	Kruskal-Wallis H	3,159	1,632	1,019	,290	,261	,434	3,943	1,164	3,351	2,507
	df	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Asymp. Sig.	,206	,442	,601	,865	,878	,805	,139	,559	,187	,286

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Treatment

Low – high

Test Statistics^b

Gender	Femur length [mm]	VOX-BV/TV	Conn-Dens. [mm ⁻³]	DT-Tb.N [mm ⁻¹]	DT-Tb.Th [mm]	DT-Tb.Sp [mm]	Tt.Ar [mm ²]	Ct.Th [mm ²]	Ct.Area [mm ²]	Marrow area [mm ²]	Ct.Ar/Tt.Ar %
female	Mann-Whitney U	12,500	4,000	6,000	4,000	9,000	5,000	4,000	11,000	7,000	3,000
	Wilcoxon W	27,500	19,000	21,000	19,000	24,000	20,000	19,000	26,000	22,000	18,000
	Z	,000	-1,776	-1,358	-1,776	-,731	-1,567	-1,776	-,313	-1,149	-1,984
	Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000	,076	,175	,076	,465	,117	,076	,754	,251	,047
	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 ^a	,095 ^a	,222 ^a	,095 ^a	,548 ^a	,151 ^a	,095 ^a	,841 ^a	,310 ^a	,056 ^a
male	Mann-Whitney U	6,000	13,000	14,000	17,000	15,000	17,000	6,000	16,000	7,000	10,000
	Wilcoxon W	34,000	28,000	29,000	32,000	30,000	32,000	34,000	31,000	35,000	38,000
	Z	-1,868	-,731	-,568	-,081	-,406	-,081	-1,868	-,244	-1,705	-1,218
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,062	,465	,570	,935	,685	,935	,062	,808	,088	,223
	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,073 ^a	,530 ^a	,639 ^a	1,000 ^a	,755 ^a	1,000 ^a	,073 ^a	,876 ^a	,106 ^a	,530 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Treatment

Low – control

Test Statistics^b

Gender		Femur length [mm]	VOX-BV/TV	Conn-Dens. [mm ⁻³]	DT-Tb.N [mm ⁻¹]	DT-Tb.Th [mm]	DT-Tb.Sp [mm ²]	Tt.Ar [mm ²]	Ct.Th [mm ²]	Marrow area [mm ²]	Ct.Ar/Tt.Ar %
female	Mann-Whitney U	14,000	11,000	10,000	12,000	14,500	12,000	15,000	13,000	14,000	14,000
	Wilcoxon W	35,000	32,000	31,000	33,000	29,500	27,000	36,000	34,000	29,000	35,000
	Z	-,183	-,730	-,913	-,548	-,091	-,548	,000	-,365	-,365	-,183
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,855	,465	,361	,584	,927	,584	1,000	,715	,715	,855
	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,931 ^a	,537 ^a	,429 ^a	,662 ^a	,931 ^a	,662 ^a	1,000 ^a	,792 ^a	,792 ^a	,931 ^a
male	Mann-Whitney U	9,000	7,000	9,000	11,000	14,000	11,000	8,000	9,000	7,000	9,000
	Wilcoxon W	30,000	22,000	24,000	26,000	29,000	32,000	29,000	24,000	28,000	30,000
	Z	-1,098	-1,461	-1,095	-,730	-,183	-,730	-1,278	-1,095	-1,461	-1,095
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,272	,144	,273	,465	,855	,465	,201	,273	,144	,273
	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,329 ^a	,177 ^a	,329 ^a	,537 ^a	,931 ^a	,537 ^a	,247 ^a	,329 ^a	,177 ^a	,329 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Treatment

High - control

Test Statistics^b

Gender		Femur length [mm]	VOX-BV/TV	Conn-Dens. [mm ⁻³]	DT-Tb.N [mm ⁻¹]	DT-Tb.Th [mm]	DT-Tb.Sp [mm ²]	Tt.Ar [mm ²]	Ct.Th [mm ²]	Marrow area [mm ²]	Ct.Ar/Tt.Ar %
female	Mann-Whitney U	13,000	7,000	7,000	7,000	14,000	7,000	8,000	9,000	6,000	11,000
	Wilcoxon W	28,000	28,000	28,000	28,000	35,000	22,000	29,000	24,000	27,000	32,000
	Z	-,367	-1,461	-1,461	-1,461	-,183	-1,461	-1,278	-1,095	-1,643	-,730
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,714	,144	,144	,144	,855	,144	,201	,273	,100	,465
	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,792 ^a	,177 ^a	,177 ^a	,177 ^a	,931 ^a	,177 ^a	,247 ^a	,329 ^a	,126 ^a	,537 ^a
male	Mann-Whitney U	19,000	20,000	19,000	20,000	18,000	18,000	15,000	16,000	20,000	13,000
	Wilcoxon W	47,000	48,000	47,000	48,000	39,000	39,000	43,000	44,000	48,000	41,000
	Z	-,286	-,143	-,286	-,143	-,429	-,429	-,857	-,714	-,143	-1,143
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,775	,886	,775	,886	,668	,668	,391	,475	,886	,253
	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,836 ^a	,945 ^a	,836 ^a	,945 ^a	,731 ^a	,731 ^a	,445 ^a	,534 ^a	,945 ^a	,731 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Treatment

Statistics

Gender		Treatment		y1 [mm]	c [mm]	L [mm]	I [mm ⁴]	Ultimate Force [N]	Ultimate Displacement [mm]	Stiffness [N mm ⁻¹]	Energy [mJ]	Ultimate Stress [MPa]	Ultimate Strain	Elastic Modulus [MPa]
femal e	low N	Valid	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Mean	3,046	1,523	15,0	4,822	133,89	1,0466	321,204	41,145	159,45	,0853	4798,942	
			4	2	0	1	51		1	8	24		5	
		Std. Deviation	,1361	,0680	,000	,6034	11,691	,20106	38,6855	11,496	13,390	,01849	848,2026	
			6	8		2	30		0	30	22		1	
		Minimum	2,86	1,43	15	4,04	118,18		,83	282,60	27,01	150,04	,07	3702,45
		Maximum	3,19	1,60	15	5,36	149,60		1,38	376,54	57,76	181,31	,12	6006,74
		Percentiles	25	2,907	1,453	15,0	4,181	123,06	,9170	286,992	31,210	150,42	,0710	4062,268
			5	8	0	0	61		0	0	65		5	
			50	3,093	1,546	15,0	5,074	136,77	1,0025	312,603	40,055	151,68	,0839	4791,286
			0	5	0	6	21		2	1	44		6	
			75	3,162	1,581	15,0	5,336	143,28	1,1982	359,716	51,626	172,36	,1003	5539,444
			0	0	0	8	56		7	9	23		5	
high	N	Valid	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Mean	3,160	1,580	15,0	5,325	133,51	,8047	339,406	32,542	149,41	,0676	4587,635	
			0	0	0	1	09		6	7	42		4	
		Std. Deviation	,0972	,0486	,000	,5762	15,785	,12898	37,1865	8,5506	19,656	,00901	510,4527	
			1	0		4	26		1	4	63		6	
		Minimum	3,03	1,51	15	4,76	114,39		,69	289,71	25,11	125,51	,06	4108,67
		Maximum	3,27	1,63	15	6,07	155,10		1,02	374,86	46,34	170,42	,08	5414,43
		Percentiles	25	3,067	1,533	15,0	4,821	120,02	,7140	299,919	25,821	128,97	,0612	4189,098
			50	3,067	1,533	15,0	4,821	120,02		2	1	75		7
			50	3,163	1,581	15,0	5,122	129,54	,7697	360,768	30,052	154,47	,0664	4455,269
			0	5	0	1	36		7	4	11		2	
			75	3,251	1,625	15,0	5,929	148,98	,9130	368,213	40,509	167,32	,0746	5052,355
			0	8	0	8	33		0	5	24		3	
contr ol	N	Valid	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
		Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Mean	3,082	1,541	15,0	4,979	140,28	,8730	337,013	39,595	164,02	,0719	4856,086	
			3	2	0	1	90		8	4	87		2	
		Std. Deviation	,1157	,0578	,000	,6885	16,352	,29840	68,4784	5,5442	18,424	,02531	879,7412	
			1	6		1	79		0	4	84		9	
		Minimum	2,93	1,47	15	4,18	127,38		,52	258,16	31,06	140,00	,04	3410,04
		Maximum	3,24	1,62	15	6,00	170,88		1,24	450,34	47,44	192,73	,10	5953,96
		Percentiles	25	2,963	1,481	15,0	4,306	130,35	,5842	280,222	35,670	148,07	,0467	4119,341
			50	3,095	1,547	15,0	4,976	132,80	,8539	328,530	39,862	163,92	,0697	5021,970
			0	5	0	6	44		4	5	40		7	
			75	3,180	1,590	15,0	5,544	152,60	1,1851	389,292	43,462	177,80	,0976	5518,091
			0	0	0	5	58		3	1	15		8	

male	low	N	Valid	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Mean	3,829	1,914	20,0	12,56	190,26	1,4500	352,382	83,234	147,12	,0829
				8	9	0	16	98		8	9	31	2
			Std. Deviation	,2294	,1147	,000	2,463	33,084	,39856	108,186	19,678	22,799	,02249
				2	1		35	64		11	38	88	94
			Minimum	3,52	1,76	20	8,64	153,21	,86	246,58	56,40	118,04	,05
			Maximum	4,04	2,02	20	14,85	238,69	,188	502,89	99,10	172,44	,11
			Percentiles	25	3,586	1,793	20,0	10,20	164,20	1,0599	247,936	62,286	123,37
				5	3	0	63	75		5	5	69	5
				50	3,937	1,968	20,0	13,57	177,52	1,5901	363,702	93,867	156,23
				0	5	0	45	06		5	0	47	9
				75	4,019	2,009	20,0	14,41	222,70	1,7700	451,169	98,867	166,31
				5	8	0	05	68		3	2	35	6
high	N	Valid	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
		Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mean	3,597	1,798	20,0	9,909	179,61	1,3422	293,297	80,973	165,82	,0726	5157,891
			9	9	0	8	89		3	9	70		3
		Std. Deviation	,1901	,0950	,000	1,732	22,903	,48124	40,7210	13,400	26,200	,02701	1403,137
			2	6		79	26		6	25	86		17
		Minimum	3,30	1,65	20	6,96	161,98	,87	250,60	65,93	140,29	,05	3871,82
		Maximum	3,77	1,89	20	11,98	215,99	,202	351,05	104,15	204,63	,11	7925,84
		Percentiles	25	3,383	1,691	20,0	8,490	165,66	,9596	252,544	69,318	140,95	,0488
			50	0	5	0	1	89		8	3	62	4
				50	3,655	1,827	20,0	10,55	168,34	1,0814	292,341	78,055	165,16
				0	5	0	01	57		0	6	11	9
				75	3,757	1,878	20,0	11,14	209,79	1,7675	326,868	93,310	196,36
				0	5	0	17	37		9	0	39	4
contr	N	Valid	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
ol		Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mean	3,706	1,853	20,0	10,53	187,22	1,3323	330,028	76,331	166,43	,0743	5330,970
			8	4	0	42	64		4	7	25		2
		Std. Deviation	,1657	,0828	,000	1,663	27,159	,19916	71,7101	19,000	25,320	,01383	1415,019
			0	5		00	79		0	01	99		43
		Minimum	3,49	1,75	20	8,52	163,65	,1,15	232,93	62,09	141,40	,06	3808,78
		Maximum	3,96	1,98	20	12,87	235,03	,1,67	432,44	113,96	210,79	,10	7677,37
		Percentiles	25	3,557	1,778	20,0	8,873	165,19	1,1836	269,445	65,613	149,70	,0643
			50	0	5	0	0	42		0	8	34	8
				50	3,717	1,858	20,0	10,65	179,15	1,2543	322,678	69,444	156,51
				5	8	0	26	37		2	0	67	9
				75	3,821	1,910	20,0	11,85	209,25	1,5200	398,980	85,686	188,37
				0	5	0	87	49		0	0	21	5

Test Statistics^{a,b}

Gender		y1 [mm]	c [mm]	L [mm]	I [mm ⁴]	Ultimate Force [N]	Ultimate Displacement [mm]	Stiffness [N mm ⁻¹]	Energy [mJ]	Ultimate Stress [MPa]	Ultimate Strain	Elastic Modulus [MPa]	Energy density [J mm ⁻³]
female	Kruskal-Wallis H	2,134	2,134	,000	1,322	,534	2,835	,404	3,088	,969	2,429	,546	2,429
	df	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Asymp. Sig.	,344	,344	1,000	,516	,766	,242	,817	,214	,616	,297	,761	,297
male	Kruskal-Wallis H	2,601	2,601	,000	4,407	,683	,297	,758	,883	1,086	,869	,036	,771
	df	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Asymp. Sig.	,272	,272	1,000	,110	,711	,862	,684	,643	,581	,648	,982	,680

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Treatment

Low – high

Test Statistics^b

Gender		y1 [mm]	c [mm]	L [mm]	I [mm ⁴]	Ultimat e Force [N]	Ultimate Displaceme nt [mm]	Stiffnes s [N mm ⁻¹]	Energ y [mJ]	Ultimat e Stress [MPa]	Ultimat e Strain	Elastic Modulu s [MPa]	Energ y densit y [J mm ⁻³]	Ct.Ar/Tt. Ar %
femal	Mann- Whitney U	6,000	6,000	12,50 0	8,000	12,000	4,000	10,000	6,000	11,000	4,000	10,000	6,000	7,000
	Wilcoxo n W	21,00 0	21,00 0	27,50 0	23,00	27,000	19,000	25,000	21,00 0	26,000	19,000	25,000	21,00 0	22,000
	Z	- 1,358	- 1,358	,000	-,940	-,104	-1,776	-,522	-1,358	-,313	-1,776	-,522	-1,358	-1,149
	Asymp. Sig. (2- tailed)	,175	,175	1,000	,347	,917	,076	,602	,175	,754	,076	,602	,175	,251
	Exact Sig. [2*(1- tailed Sig.)]	,222 ^a	,222 ^a	1,000 ^a	,421 ^a	1,000 ^a	,095 ^a	,690 ^a	,222 ^a	,841 ^a	,095 ^a	,690 ^a	,222 ^a	,310 ^a
male	Mann- Whitney U	9,000	9,000	17,50 0	6,000	13,000	17,000	14,000	16,00 0	11,000	14,000	17,000	17,00 0	13,000
	Wilcoxo n W	37,00 0	37,00 0	45,50 0	34,00	41,000	45,000	42,000	44,00 0	26,000	42,000	45,000	32,00 0	28,000
	Z	- 1,380	- 1,380	,000	- 1,868	-,732	-,081	-,568	-,244	-1,056	-,568	-,081	-,081	-,731
	Asymp. Sig. (2- tailed)	,167	,167	1,000	,062	,464	,935	,570	,807	,291	,570	,935	,935	,465
	Exact Sig. [2*(1- tailed Sig.)]	,202 ^a	,202 ^a	1,000 ^a	,073 ^a	,530 ^a	1,000 ^a	,639 ^a	,876 ^a	,343 ^a	,639 ^a	1,000 ^a	1,000 ^a	,530 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Treatment

Low – control

Test Statistics^b

Gender		y1 [mm]	c [mm]	L [mm]	I [mm ⁴]	Ultimat e Force [N]	Ultimate Displaceme nt [mm]	Stiffnes s [N mm ⁻¹]	Energ y [mJ]	Ultimat e Stress [MPa]	Ultimat e Strain	Elastic Modulu s [MPa]	Energ y densit y [J mm ⁻³]	Ct.Ar/Tt. Ar %
femal	Mann- Whitney U	13,00 0	13,00 0	15,00 0	12,00 0	14,000	9,000	14,000 0	15,00	13,000	10,000	15,000	13,00 0	14,000
	Wilcoxo n W	28,00 0	28,00 0	36,00 0	27,00 0	29,000	30,000	29,000 0	36,00 0	28,000	31,000	36,000	34,00 0	35,000
	Z	-,365	-,365	,000	-,548	-,183	-1,095	-,183 .855	,000	-,365	-,913	,000	-,365 .855	-,183
	Asymp. Sig. (2- tailed)	,715	,715	1,000	,584	,855	,273	,855	1,000	,715	,361	1,000	,715	,855
	Exact Sig. [2*(1- tailed Sig.)]	,792 ^a	,792 ^a	1,000	,662 ^a	,931 ^a	,329 ^a	,931 ^a	1,000 a	,792 ^a	,429 ^a	1,000 ^a	,792 ^a	,931 ^a
male	Mann- Whitney U	10,00 0	10,00 0	15,00 0	6,000	13,000	10,000	13,000 0	13,00	11,000	10,000	14,000	13,00 0	13,000
	Wilcoxo n W	31,00 0	31,00 0	36,00 0	27,00 0	34,000	31,000	34,000 0	34,00 0	26,000	31,000	29,000	34,00 0	28,000
	Z	-,913	-,913	,000	-	-,365	-,913	-,365 1,643	-,365	-,730	-,913	-,183	-,365	-,365
	Asymp. Sig. (2- tailed)	,361	,361	1,000	,100	,715	,361	,715 1,000	,715	,465	,361	,855	,715	,715
	Exact Sig. [2*(1- tailed Sig.)]	,429 ^a	,429 ^a	1,000	,126 ^a	,792 ^a	,429 ^a	,792 ^a	,792 ^a	,537 ^a	,429 ^a	,931 ^a	,792 ^a	,792 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Treatment

High - control

Test Statistics^b

Gender		y1 [mm]	c [mm]	L [mm]	I [mm ⁴]	Ultimat e Force [N]	Ultimate Displaceme nt [mm]	Stiffnes s [N mm ⁻¹]	Energ y [mJ]	Ultimat e Stress [MPa]	Ultimat e Strain	Elastic Modulu s [MPa]	Energ y densit y [J mm ⁻³]	Ct.Ar/Tt. Ar %
femal	Mann- Whitney U	9,000	9,000	15,00 0	10,00 0	10,000	14,000	12,000	6,000	9,000	15,000	11,000	8,000	13,000
	Wilcoxo n W	30,00 0	30,00 0	36,00 0	31,00 0	25,000	29,000	33,000	21,00 0	24,000	36,000	26,000	23,00 0	28,000
	Z	- 1,095	- 1,095	,000	-,913	-,913	-,183	-,548	-1,643	-1,095	,000	-,730	-1,278	-,365
	Asymp. Sig. (2- tailed)	,273	,273	1,000	,361	,361	,855	,584	,100	,273	1,000	,465	,201	,715
	Exact Sig. [2*(1- tailed Sig.)]	,329 ^a	,329 ^a	1,000 a	,429 ^a	,429 ^a	,931 ^a	,662 ^a	,126 ^a	,329 ^a	1,000 ^a	,537 ^a	,247 ^a	,792 ^a
male	Mann- Whitney U	13,50 0	13,50 0	21,00 0	16,00 0	17,000	18,000	15,000	13,00 0	19,000	16,000	20,000	14,00 0	18,000
	Wilcoxo n W	41,50 0	41,50 0	42,00 0	44,00 0	45,000	46,000	43,000	34,00 0	47,000	44,000	48,000	35,00 0	39,000
	Z	- 1,073	- 1,073	,000	-,714	-,572	-,429	-,857	-1,144	-,286	-,714	-,143	-1,000	-,429
	Asymp. Sig. (2- tailed)	,283	,283	1,000	,475	,567	,668	,391	,252	,775	,475	,886	,317	,668
	Exact Sig. [2*(1- tailed Sig.)]	,295 ^a	,295 ^a	1,000 a	,534 ^a	,628 ^a	,731 ^a	,445 ^a	,295 ^a	,836 ^a	,534 ^a	,945 ^a	,366 ^a	,731 ^a

Statistics

		y1	c	L	I	Ultim	Ultimate	Stiffn		Ultim	Ultim	Elasti	Energy
tr		[mm]	[mm]	[m]	[mm ⁴]	ate Force	Displace ment	ess [N/m m]	Energ y [mJ]	ate Stress [MPa]	Strai n	Modulu s [MPa]	den sity [J mm ⁻³]
Con trol	N	Valid	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
mal e	Miss ing		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean		3,70	1,85	20,	10,5	187,2	1,3323	330,0	76,33	166,4	,074	5330,9	3,76
		68	34	00	342	264		284	17	325	3	702	03
	Std.	,165	,082	,00	1,66	27,15	,19916	71,71	19,00	25,32	,013	1415,0	,851
	Deviation	70	85	0	300	979		010	001	099	83	1943	67
	Minimum	3,49	1,75	20	8,52	163,6	1,15	232,9	62,09	141,4	,06	3808,7	2,86
	Maximum	3,96	1,98	20	12,8	235,0	1,67	432,4	113,9	210,7	,10	7677,3	5,21
	Percen tiles	25	3,55	1,77	20,	8,87	165,1	1,1836	269,4	65,61	149,7	,064	4095,9
		70	85	00	30	942		450	38	034	3	358	51
Mean		3,71	1,85	20,	10,6	179,1	1,2543	322,6	69,44	156,5	,069	5144,1	3,44
		75	88	00	526	537		782	40	167	2	079	58
	Std.	,115	,057	,00	,688	16,35	,29840	68,47	5,544	18,42	,025	879,74	,472
	Deviation	71	86	0	51	279		840	24	484	31	129	47
	Minimum	2,93	1,47	15	4,18	127,3	,52	258,1	31,06	140,0	,04	3410,0	2,91
	Maximum	3,24	1,62	15	6,00	170,8	1,24	450,3	47,44	192,7	,10	5953,9	4,24
	Percen tiles	25	2,96	1,48	15,	4,30	130,3	,5842	280,2	35,67	148,0	,046	4119,3
		35	18	00	63	578		227	09	739	7	411	89
Mean		3,09	1,54	15,	4,97	132,8	1,8539	328,5	39,86	163,9	,069	5021,9	3,86
		50	75	00	66	044		304	25	240	7	707	53
	Std.	,115	,057	,00	,688	16,35	,29840	68,47	5,544	18,42	,025	879,74	,472
	Deviation	71	86	0	51	279		840	24	484	31	129	47
	Minimum	2,93	1,47	15	4,18	127,3	,52	258,1	31,06	140,0	,04	3410,0	2,91
	Maximum	3,24	1,62	15	6,00	170,8	1,24	450,3	47,44	192,7	,10	5953,9	4,24
	Percen tiles	25	2,96	1,48	15,	4,30	130,3	,5842	280,2	35,67	148,0	,046	4119,3
		35	18	00	63	578		227	09	739	7	411	89
Mean		3,18	1,59	15,	5,54	152,6	1,1851	389,2	43,46	177,8	,097	5518,0	4,16
		00	00	00	45	058		923	21	015	6	918	74

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Treatment

Statistics

		Femur length [mm]	VOX BV/ TV	Conn- Dens. [mm ⁻³]	DT- Tb.N [mm ⁻¹]	DT- h [mm]	DT- p [mm]		Ct.T h [mm ⁻²]	Ct.Ar ea [mm ²]	Marrow area [mm ²]	
Cont rol male	N Valid	6 0	6 0	6 0	6 0	6 0	6 0	6 0	6 0	6 0	6 0	Ct.Ar/T t.Ar %
Mean		41,38 00	,105 3	26,95 35	2,336 0	,078 6	,468 4	13,44 21	,696 5	8,47 58	4,96 63	63,071 2
Std. Deviation		1,039 08	,031 07	8,886 21	,6263 6	,009 25	,154 02	,6420 1	,037 67	,488 53	,461 54	2,5731 3
Minimum		40,26 42,50	,06 ,16	11,85 34,72	1,45 3,17	,07 ,10	,31 ,74	12,86 14,41	,65 ,74	8,01 9,30	4,51 5,77	59,94 66,23
Maximum		40,26 42,50	,089 00	18,94 35	1,928 9	,072 3	,331 3	12,86 99	,650 8	8,06 89	4,64 74	60,557 5
Percentiles	25	40,26 00	,089 00	18,94 35	1,928 9	,072 3	,331 3	12,86 99	,650 8	8,06 89	4,64 74	60,557 5
	50	41,48 00	,099 00	30,08 81	2,181 0	,076 2	,467 4	13,23 39	,711 8	8,40 28	4,80 00	62,873 8
	75	42,35 00	,123 00	33,93 07	2,997 6	,084 3	,552 0	14,13 19	,724 1	8,81 24	5,36 03	65,865 6
Cont rol fema le	N Valid	6 0	6 0	6 0	6 0	6 0	6 0	6 0	6 0	6 0	6 0	6 0
Mean		36,49 40	,222 6	119,1 658	4,062 1	,068 9	,254 4	9,107 8	,642 1	5,80 17	3,30 61	63,862 3
Std. Deviation		,8525 7	,082 7	45,42 666	1,194 13	,005 65	,074 97	,7780 1	,025 69	,306 27	,502 99	2,6161 3
Minimum		35,54 37,62	,15 ,38	76,67 195,2	3,02 9	,06 ,08	,14 ,33	8,26 10,38	,60 ,,66	5,47 6,36	2,75 4,01	61,32 67,53
Maximum		35,66 36,48	,153 ,184	83,15 103,1	3,107 3,689	,064 ,069	,185 ,264	8,410 8,997	,615 ,,654	5,62 5,70	2,77 3,31	61,604 63,181
Percentiles	25	35,66 10	,153 9	76 76	3 3	,064 9	,185 8	8,410 7	,615 5	5,62 52	2,77 70	61,604 7
	50	36,48 00	,184 0	103,1 781	3,689 2	,069 0	,264 1	8,997 5	,654 8	5,70 18	3,31 47	63,181 9
	75	37,26 00	,305 0	162,3 394	5,059 6	,073 6	,326 8	9,759 8	,659 3	6,01 19	3,74 79	66,574 8

Test Statistics^b

	Femur length [mm]	VOX- BV/TV	Conn- Dens. [mm ⁻³]	DT- Tb.N [mm ⁻¹]	DT- Tb.Th [mm]	DT- Tb.Sp [mm]	Tt.Ar [mm ²]	Ct.Th [mm ²]	Ct.Area [mm ²]	Marrow area [mm ²]	Ct.Ar/Tt.Ar %
Mann- Whitney U	,000	2,000	,000	2,000	4,000	2,000	,000	8,000	,000	,000	14,000
Wilcoxon W	21,000	23,000	21,000	23,000	25,000	23,000	21,000	29,000	21,000	21,000	35,000
Z	-2,887	-2,562	-2,882	-2,562	-2,242	-2,562	-2,882	-1,601	-2,882	-2,882	-,641
Asymp. Sig. (2- tailed)	,004	,010	,004	,010	,025	,010	,004	,109	,004	,004	,522
Exact Sig. [2*(1- tailed Sig.)]	,002 ^a	,009 ^a	,002 ^a	,009 ^a	,026 ^a	,009 ^a	,002 ^a	,132 ^a	,002 ^a	,002 ^a	,589 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: tr

Test Statistics^b

	y1 [mm]	c [mm]	L [mm] ⁴⁾	I [mm] ^{4]}	Ultim ate Force [N]	Ultimate Displace ment [mm]	Stiffne ss [N mm ⁻¹]	Ener gy [mJ]	Ultim ate Stres s [MPa]	Ultim ate Strain [MPa]	Elasti c Modul us [MPa]	Ener gy dens ity [J mm ⁻³]	Ct.Ar/Tt .Ar %
Mann-Whitney U	,000	,000	,000	,000	2,000	3,000	17,00 0	,000	18,00 0	15,00 0	15,00 0	15,0 00	14,000
Wilcoxon W	21,0 00	21,0 00	21,0 00	21,0 00	23,00 0	24,000	38,00 0	21,0 00	39,00 0	36,00 0	36,00 0	36,0 00	35,000
Z	- 2,88	- 2,88	- 3,31	- 2,88	- 2,562	-2,402	-,160	- 2,88	- 2	- 000	- 480	- 480	-,641
Asymp. Sig. (2-tailed)	,004	,004	,001	,004	,010	,016	,873	,004	1,000	,631	,631	,631	,522
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002	,002	,002	,002	,009 ^a	,015 ^a	,937 ^a	,002 ^a	1,000 a	,699 ^a	,699 ^a	,699 ^a	,589 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: tr

Statistics

Quotient End-/Startgewicht.

low	N	Valid	10
		Missing	0
		Mean	1,564580
		Std. Deviation	,3369920
		Minimum	1,2097
		Maximum	2,0296
	Percentiles	25	1,251275
		50	1,518000
		75	1,858625
high	N	Valid	12
		Missing	0
		Mean	1,566725
		Std. Deviation	,3595794
		Minimum	1,0909
		Maximum	2,0237
	Percentiles	25	1,201150
		50	1,718600
		75	1,827325
control	N	Valid	12
		Missing	0
		Mean	1,459650
		Std. Deviation	,3197235
		Minimum	1,1440
		Maximum	1,9709
	Percentiles	25	1,232700
		50	1,282500
		75	1,848325

Test Statistics^{a,b}

	Quotient End-/Startgewicht.
Kruskal-Wallis H	,372
df	2
Asymp. Sig.	,830

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Treatment

Low/High

	Quotient End-/Startgewicht.
Mann-Whitney U	55,000
Wilcoxon W	133,000
Z	-,330
Asymp. Sig. (2-tailed)	,742
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,771 ^a

Low/Control

	Quotient End-/Startgewicht.
Mann-Whitney U	50,000
Wilcoxon W	128,000
Z	-,659
Asymp. Sig. (2-tailed)	,510
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,539 ^a

High/Control

	Quotient End-/Startgewicht.
Mann-Whitney U	69,000
Wilcoxon W	147,000
Z	-,173
Asymp. Sig. (2-tailed)	,862
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,887 ^a

Statistics

Quotient End-/Startgewicht.

female	low	N	Valid	5
			Missing	0
		Mean		1,255960
		Std. Deviation		,0412949
		Minimum		1,2097
		Maximum		1,3027
	Percentiles	25		1,213650
		50		1,262500
		75		1,295000
high	N	Valid	5	
		Missing		0
		Mean		1,177160
		Std. Deviation		,0758344
		Minimum		1,0909
		Maximum		1,2717
	Percentiles	25		1,100150
		50		1,195400
		75		1,245050
control	N	Valid	6	
		Missing		0
		Mean		1,246817
		Std. Deviation		,0616439
		Minimum		1,1440
		Maximum		1,3166
	Percentiles	25		1,204000
		50		1,251300
		75		1,299425
male	low	N	Valid	5
		Missing		0
		Mean		1,873200
		Std. Deviation		,1252881
		Minimum		1,7333
		Maximum		2,0296
	Percentiles	25		1,769450
		50		1,818500

		75	2,004300
high	N	Valid	7
		Missing	0
		Mean	1,844986
		Std. Deviation	,1281015
		Minimum	1,6996
		Maximum	2,0237
	Percentiles	25	1,737600
		50	1,818100
		75	2,017300
control	N	Valid	6
		Missing	0
		Mean	1,672483
		Std. Deviation	,3352247
		Minimum	1,2369
		Maximum	1,9709
	Percentiles	25	1,255275
		50	1,819950
		75	1,937075

Test Statistics^{a,b}

Sex_c		Quotient End-/Startgewicht.
female	Kruskal-Wallis H	3,510
	df	2
	Asymp. Sig.	,173
male	Kruskal-Wallis H	,880
	df	2
	Asymp. Sig.	,644

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Treatment

Low/High

Test Statistics^b

Sex_c		Quotient End-/Startgewicht.
female	Mann-Whitney U	5,000
	Wilcoxon W	20,000
	Z	-1,567
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,117
	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,151 ^a
male	Mann-Whitney U	15,000
	Wilcoxon W	43,000
	Z	-,406
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,685
	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,755 ^a

Low/Control

Test Statistics^b

Sex_c		Quotient End-/Startgewicht.
female	Mann-Whitney U	14,000
	Wilcoxon W	29,000
	Z	-,183
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,855
	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,931 ^a
male	Mann-Whitney U	10,000
	Wilcoxon W	31,000
	Z	-,913
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,361
	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,429 ^a

High/Control

Test Statistics^b

Sex_c		Quotient End-/Startgewicht.
female	Mann-Whitney U	6,000
	Wilcoxon W	21,000
	Z	-1,643
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,100
	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,126 ^a
male	Mann-Whitney U	17,000
	Wilcoxon W	38,000
	Z	-,571
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,568
	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,628 ^a

Statistics

Quotient End-/Startgewicht.

Control male	N	Valid	6
		Missing	0
		Mean	1,672483
		Std. Deviation	,3352247
		Minimum	1,2369
		Maximum	1,9709
	Percentiles	25	1,255275
		50	1,819950
		75	1,937075
Control female	N	Valid	6
		Missing	0
		Mean	1,246817
		Std. Deviation	,0616439
		Minimum	1,1440
		Maximum	1,3166
	Percentiles	25	1,204000
		50	1,251300
		75	1,299425

Test Statistics^b

	Quotient End-/Startgewicht.
Mann-Whitney U	6,000
Wilcoxon W	27,000
Z	-1,922
Asymp. Sig. (2-tailed)	,055
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,065 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Treatment

