

Aus dem Department Endokrinologie
(Prof. Dr. med. W. Wuttke)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die therapeutischen Effekte von
Estradiol, Dihydrotestosteron, Genistein und Equol
auf den osteoporotischen Knochen
der orchidektomierten männlichen Sprague-Dawley-Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Elena Vorwerk
aus Duisburg

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Wuttke

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1 Allgemeine Einführung	7
1.2 Der Knochen	8
1.3 Osteoporose.....	10
1.3.1 Osteoporose beim Mann	11
1.3.2 Pathogenese der Osteoporose beim Mann.....	11
1.3.3 Diagnostik der Osteoporose	12
1.3.4 Therapie der Osteoporose.....	13
1.4 Steroidhormone.....	14
1.4.1 Sexualsteroiden	14
1.4.2 Rezeptoren der Sexualsteroiden	15
1.5 Phytoöstrogene	16
1.5.1 Genistein.....	17
1.5.2 Equol.....	18
1.6 Der Knochen der orchidektomierten Ratte als Osteoporosemodell.....	19
1.7 Fettgewebe.....	21
1.8 Muskelgewebe	21
1.9 Ziel der Studie	22
2. Material und Methoden.....	23
2.1 Die Versuchstiere und ihre Haltung	23
2.2 Der Versuchsablauf.....	23
2.3 Die Orchidektomie.....	24
2.4 Die Tiernahrung	25
2.5 Die pQCT-Messung	26
2.5.1 Die Identifizierung der Tiere.....	26
2.5.2 Die Narkose	27
2.5.3 Die Computertomographie.....	27
2.6 Serum-Analyse.....	29
2.7 Statistische Methoden.....	29
3. Ergebnisse	30
3.1 Die Futteraufnahme	31
3.2 Die Veränderung des Körpergewichtes	32
3.3 Serumparameter des Knochenmetabolismus.....	33
3.3.1 Die Veränderung der Serum-Cross-Laps	33
3.3.2 Die Veränderung des Serum-Osteocalcins	36

3.4	Knochen	39
3.4.1	Die Veränderung der Spongiosadichte der Metaphyse der Tibia.....	39
3.4.2	Die Veränderung der Spongiosafläche der Metaphyse der Tibia.....	42
3.4.3	Die Veränderung der Kortikalisdichte der Metaphyse der Tibia	45
3.4.4	Die Veränderung der Kortikalisfläche der Metaphyse der Tibia	48
3.4.5	Die Veränderung des trabekulären Anteils der Metaphyse der Tibia.....	51
3.4.6	Die Veränderung des Knochenwiderstandes der Metaphyse der Tibia	54
3.5	Fett	57
3.6	Muskulatur.....	59
4.	Diskussion.....	61
4.1	Der aktuelle Forschungsstand zum Thema Osteoporose	61
4.2	Körpergewicht und Futteraufnahme.....	62
4.3	Die Veränderung des Knochens nach Orchidektomie.....	63
4.4	Die Veränderung der Serumparameter.....	64
4.5	Die therapeutischen Effekte der untersuchten Substanzen auf den osteoporotischen Knochen	66
4.5.1	Die therapeutischen Effekte der gonadalen Steroide auf den osteoporotischen Knochen.....	67
4.5.2	Die therapeutischen Effekte der Phytohormone auf den osteoporotischen Knochen.....	70
4.6	Die Veränderung des paratibialen Fettdepots	74
4.7	Die Veränderung der paratibialen Muskelfläche	75
5.	Zusammenfassung	77
6.	Tabellenverzeichnis.....	79
7.	Literaturverzeichnis.....	80

Abkürzungsverzeichnis:

°	Grad
<	kleiner als
>	größer als
Abb.	Abbildung
AR	Androgenrezeptor
BW	Körpergewicht
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
d	Tag
d.h.	das heißt
DHT	5 α -Dihydrotestosteron
DXA	Dual X-ray-Absorptiometry
E2	17 β -Estradiol
E2B	Estradiolbenzoat
EQ	Equol
ER	Östrogenrezeptor
ER α	Östrogenrezeptor alpha
ER β	Östrogenrezeptor beta
et al.	et alii
Fa.	Firma
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GEN	Genistein
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
HRT	Hormonersatztherapie
HSP	Hitzeschockprotein(e)
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
LH	Luteinisierendes Hormon
mg	Milligramm
min	Minuten

ml	Milliliter
mm	Millimeter
Obd.	Obduktion
Orx	Orchidektomie
orx	orchidektomiert
Ovx	Ovarektomie
ovx	ovarektomiert
pQCT	periphere quantitative Computertomographie
s.c.	subkutan
S.D.-Ratte	Sprague-Dawley-Ratte
SD	Standardabweichung
SERM	selektiver Östrogenrezeptor-Modulator
SF	soja-frei
SHBG	Sexualhormon-bindendes-Globulin
sog.	so genannt(e)
T	Testosteron
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
vs.	versus
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Erkrankungen innerhalb des endokrinen Systems können sich beim Menschen auf unterschiedlichste Art und Weise manifestieren. Sie betreffen entweder den gesamten Organismus oder sind organspezifisch. Die häufigste Stoffwechselerkrankung des Knochens ist die Osteoporose, welche durch eine verminderte Knochendichte und -festigkeit charakterisiert ist. Die Osteoporose tritt physiologisch im Rahmen des Alterungsprozesses auf oder kann sekundär durch eine andere Erkrankung bedingt sein. Insgesamt geht man von sechs Millionen Betroffenen in Deutschland aus (Pollähne und Minne 2001). Die Kosten für das Gesundheitssystem sind immens, vor allem aufgrund der Folgeschäden der Osteoporose wie beispielsweise Schenkelhals- und Wirbelkörperfrakturen. Da es sich bei der Osteoporose überwiegend um eine Erkrankung des älteren Menschen handelt, ist die Inzidenz der Osteoporose aufgrund einer immer höheren Lebenserwartung in unserer Gesellschaft ansteigend. So betrug 1990 die Anzahl der Schenkelhalsfrakturen 1,7 Millionen weltweit und für 2050 wird aufgrund des demographischen Wandels ein globales Auftreten von insgesamt 6 Millionen Schenkelhalsfrakturen pro Jahr erwartet (WHO 2003). Die Häufigkeit der Osteoporose und ihre volkswirtschaftliche Bedeutung, aber auch die somatischen und psychosozialen Folgen für jeden einzelnen Betroffenen, verdeutlichen die absolute Notwendigkeit einer adäquaten Therapie.

Bisher gibt es eine Reihe von therapeutischen Ansätzen zur Behandlung der Osteoporose. Einer der Therapieansätze war die Hormonersatztherapie (HRT), die auf der Annahme eines Hormonmangels bei der Entstehung der Osteoporose beruht. Da die reine Substitution von Östrogenen zur Therapie der Osteoporose aufgrund der damit verbundenen Nebenwirkungen heute nicht mehr indiziert ist (Rossouw et al. 2002), wird nach möglichen Alternativen zur Hormonersatztherapie gesucht. Dabei stehen unter anderem (u.a.) Phytohormone, das heißt (d.h.) aus Pflanzen stammende, hormonell wirksame Verbindungen, im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses und sind auch Thema dieser Studie. In früheren Untersuchungen konnte bereits die Wirksamkeit von Phytohormonen auf den Knochen belegt werden (Dai et al. 2008; Fujioka et al. 2004).

Da bisher ein Schwerpunkt der Forschung auf die Osteoporose der Frau gelegt wurde, werden wir uns nun in dieser Studie mit der therapeutischen Wirkung der Phytohormone Genistein (GEN) und Equol (EQ), die Bestandteil von in Soja vorkommenden Isoflavonen sind, auf die Osteoporose des Mannes befassen. Vergleichend dazu wird die Wirkung der gonadalen Steroide auf den osteoporotischen Knochen betrachtet. Als Tiermodell dient die männliche, orchidektomierte (orx) Sprague-Dawley-Ratte (S.D.-Ratte).

Neben dem Einfluss der pflanzlichen Hormone auf die Knochenstruktur und den Knochenmetabolismus wird darüber hinaus auch die Wirkung auf die Weichteile (Fettgewebe und Muskulatur) untersucht.

1.2 Der Knochen

Der Knochen bildet in seiner Gesamtheit das Skelett, das Grundgerüst des menschlichen Körpers. Bei ausgewachsenen Menschen und Tieren findet man vor allem Lamellenknochen, welcher von dem während der Knochenneubildung entstehendem Geflechtknochen abzugrenzen ist. Der Prototyp des lamellären Knochens ist der lange Röhrenknochen, wie zum Beispiel die Tibia, die in dieser Studie untersucht wurde. Am Lamellenknochen unterscheidet man die außen gelegene Substantia compacta, auch Kortikalis genannt, von der inneren Substantia spongiosa. Die Spongiosa besteht aus einer Vielzahl von Knochenbälkchen, die man auch als Trabekel bezeichnet, wodurch sich der Begriff trabekulärer Knochen als Bezeichnung für die Spongiosa ableitet. Zwischen den Trabekeln der Spongiosa befindet sich das Knochenmark. Man findet die Spongiosa vor allem im Bereich der Epi- und Metaphyse der langen Röhrenknochen, die außen von einer dünnen Schicht Kompakta umgeben sind. Die Diaphyse, der Schaft des langen Röhrenknochens, besteht hingegen fast vollständig aus Kortikalis, die aus Speziallamellen, so genannten (sog.) Osteonen, und dazwischen befindlichen Schaltlamellen aufgebaut ist. Nach außen wird die Kortikalis durch die äußere Generallamelle sowie das Periost, nach innen durch die innere Generallamelle sowie das Endost begrenzt.

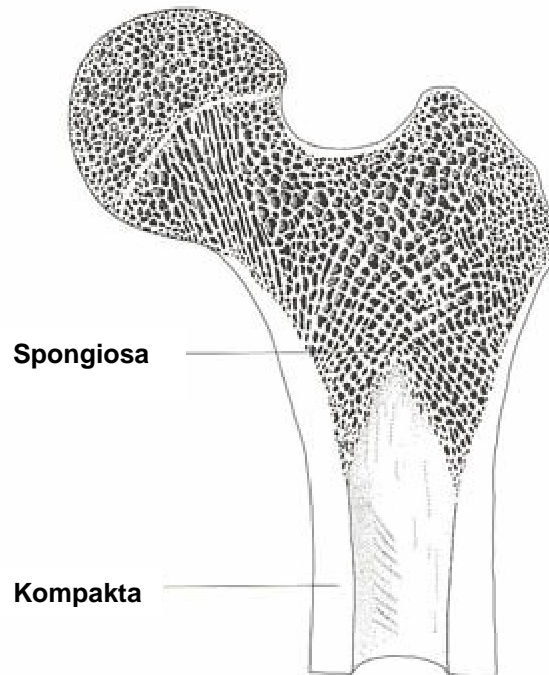


Abb. 1: Schema eines Knochens im Längsschnitt

(modifiziert nach http://www.visualhistology.com/products/atlas/VHA_Chpt6_Bone.html)

Das Knochengewebe an sich besteht aus einem zellulären und einem azellulären Anteil, der Knochenmatrix. Der organische Anteil der Knochenmatrix wird von den Osteoblasten synthetisiert und sezerniert. Dieser besteht aus Kollagen Typ I, welches durch sog. Cross-Laps zu Kollagenfibrillen vernetzt ist, sowie aus Proteoglykanen und Glykoproteinen, darunter Osteocalcin. Bei der Mineralisierung der Matrix, d.h. der Ablagerung von Calcium und Phosphat in Form von Hydroxyapatitkristallen entlang der Kollagenfibrillen, werden die Osteoblasten in die Matrix eingeschlossen und danach als Osteozyten bezeichnet. Neben den Osteoblasten und Osteozyten gibt es als weitere Zellpopulation des Knochens die Osteoklasten. Diese mehrkernigen Zellen gehören zum Monozyten-Phagozyten-System und sind in der Lage, mineralisierten Knochen zu resorbieren.

Physiologischerweise besteht ein Gleichgewicht zwischen Knochenformation durch die Osteoblasten und Knochenresorption durch die Osteoklasten. Eine Dysbalance in diesem System geht mit Alteration der Knochenmasse, -struktur und -funktion einher. Diese Dysbalance kommt beim Menschen am häufigsten im Rahmen der Osteoporose vor. Die häufigste Ursache für die Entstehung einer Osteoporose ist ein Estradiol-Mangel, der in der Postmenopause der Frau auftritt.

Dieser Estradiol-Mangel bewirkt über bestimmte Mechanismen eine verstärkte Stimulation von Osteoklasten und führt somit zu einer vermehrten Knochenresorption. Estradiol ist ebenso für die Aufrechterhaltung der Knochenmasse wie auch für die Entwicklung des Knochens und das Erreichen der maximalen Knochenmasse (sog. 'peak bone mass') zuständig. Diese Tatsache wird dadurch belegt, dass Individuen mit einem Defekt des im Knochen dominierenden Östrogenrezeptors α ($ER\alpha$) eine geringere Knochenmasse entwickeln (Smith et al. 1994). Ebenso konnte bei Männern mit einem Defekt der Aromatase, einem Enzym, welches Testosteron (T) in Estradiol umwandelt, eine verminderte Knochenmasse festgestellt und erfolgreich durch Estradiol-Gabe therapiert werden (Morishima et al. 1995). Die zentrale Bedeutung von Estradiol auf den Knochen ist also für beide Geschlechter gültig.

Beim Mann hat aber auch das männliche Geschlechtshormon Testosteron eine wichtige Funktion für den Knochen, da es als Substrat für die Aromatase fungiert und somit in Estradiol umgewandelt wird.

Neben den gonadalen Steroiden sind aber auch weitere Determinanten wie genetische Faktoren, Ernährung, Umwelteinflüsse und körperliche Betätigung für die Knochenentwicklung mitverantwortlich (Henri und Norman 2003).

1.3 Osteoporose

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist, was in der Folge mit vermehrter Knochenbrüchigkeit einhergeht. Sind bereits eine oder mehrere Frakturen als Folge der Osteoporose aufgetreten, spricht man von einer manifesten Osteoporose (DVO-Leitlinie 2006).

1.3.1 Osteoporose beim Mann

Die Osteoporose des Mannes ist nach wie vor ein wenig erforschtes Thema, obwohl ein Drittel aller Hüftfrakturen weltweit bei Männern auftreten (Gullberg et al. 1997) und bei etwa jedem zehnten älteren Mann atraumatische Osteoporose-bedingte Wirbelkörperdeformierungen nachgewiesen werden können (Drinka et al. 1987).

Aufgrund der Ätiologie unterscheidet man eine primäre und eine sekundäre Osteoporose (Herold 2007):

Zu den Formen der primären Osteoporose zählen:

- die idiopathische Osteoporose, die schon bei jungen Menschen auftritt (selten)
- die postmenopausale Osteoporose der Frau (Typ-I-Osteoporose)
- die senile Osteoporose, die bei beiden Geschlechtern auftritt (Typ-II-Osteoporose)

Unter dem Begriff der sekundären Osteoporose fasst man alle Arten von Osteoporose zusammen, die nicht unter primärer Osteoporose definiert sind und die auf sekundären Ursachen, wie z.B. einer Glukokortikoid-Medikation oder chronischem Alkoholabusus beruhen (Ebeling 2008). Die sekundäre Osteoporose tritt beim Mann mit 60% gegenüber der primären Osteoporose gehäuft auf.

Nachfolgend soll genauer auf die Pathogenese der Altersosteoporose beim Mann eingegangen werden, weil in dieser Studie am Tiermodell der orx S.D.-Ratte mögliche Therapeutika gegen diese Form der Osteoporose untersucht wurden.

1.3.2 Pathogenese der Osteoporose beim Mann

Beim Mann wird bei Abwesenheit anderer Ursachen für eine Osteoporose ab einem Alter von 60 Jahren von einer senilen Osteoporose (Typ-II-Osteoporose) gesprochen. Aufgrund der abnehmenden Bioverfügbarkeit von Geschlechtshormonen im Alter kommt es zu einer vermehrten Knochenresorption und verminderten Knochenformation. Auf diese Weise tritt ein Ungleichgewicht ein, was mit der Zeit zum Krankheitsbild der Altersosteoporose führt.

Greendale et al. konnten beim alternden Mann einen direkten Zusammenhang zwischen Knochendichte beziehungsweise (bzw.) der Rate des Knochenabbaus und der Bioverfügbarkeit von Testosteron und vor allem von Estradiol zeigen (Greendale et al. 1997).

Ein wichtiger Unterschied zwischen der postmenopausalen Osteoporose der Frau, bei der es zum Verlust von trabekulärem Knochen kommt, ist, dass es beim Mann lediglich zu einer Verdünnung der trabekulären Knochenstruktur als Folge einer verminderten Knochenformation kommt, wohingegen die Anzahl der trabekulären Strukturen beim Mann erhalten bleibt (Khosla et al. 2006). Die Tatsache, dass die Trabekelanzahl einen höheren Einfluss auf die Knochenfestigkeit hat als die Trabekeldicke wird durch die geringere Frakturanfälligkeit von Männern im Rahmen der Osteoporose belegt (Khosla et al. 2006).

1.3.3 Diagnostik der Osteoporose

An das Vorliegen einer Osteoporose muss stets gedacht werden, wenn Symptome wie Knochenschmerzen, Körpergrößenabnahme und Frakturen ohne adäquates Trauma vorliegen (Herold 2007). Dieser klinisch manifesten Phase der Osteoporose geht eine asymptomatische, präklinische Phase voraus, die bereits durch Strukturveränderungen des Knochens charakterisiert ist.

Zur Diagnostik der Osteoporose wird eine Knochendichtemessung, eine sog. Densitometrie, durchgeführt. Beim Menschen gilt als Methode der Wahl die Dual X-ray-Absorptiometrie (DXA), bei der eine Messung der Flächendichte des Knochenmineralgehaltes (g/cm^2) am ersten bis vierten Lendenwirbelkörper und am proximalen Femur durchgeführt wird (Herold 2007). Weitere Möglichkeiten der Diagnostik stellen der quantitative Ultraschall sowie die periphere quantitative Computertomographie (pQCT) dar, welche in dieser Studie die Methode der Wahl war.

Bei Vorliegen einer Osteoporose ergibt sich in der Densitometrie eine verminderte Knochenmineraldichte und im Verlauf ein erhöhter Verlust an Knochenmasse. Der Richtwert für die Diagnose der Osteoporose ist der T-Score.

Dabei handelt es sich um die Standardabweichung (SD) unterhalb eines Mittelwertes der Knochendichte gesunder Menschen im Alter von 30 Jahren, die ihre maximale Knochenmasse erreicht haben. Per Definition wird ab einem T-Score kleiner als ($<$) -2,5 SD von Osteoporose gesprochen.

Bisher gibt es in Deutschland keine Maßnahmen zur frühzeitigen Diagnose der Osteoporose beim Mann.

1.3.4 Therapie der Osteoporose

Als Indikation für eine medikamentöse Behandlung gilt bereits ein T-Score $<$ -2,0 SD. Die Therapie erfolgt den Leitlinien entsprechend abhängig von der Ätiologie und dem Schweregrad der Osteoporose (DVO-Leitlinie 2006). Zur Verfügung stehen u.a. die orale Supplementierung von Kalzium und Vitamin D sowie der Einsatz von Bisphosphonaten, Strontiumranelat oder Teriparatid (Parathormon).

Reine Steroid-Hormone, die eine effektive Therapie gegen Osteoporose darstellen und die Inzidenz von Oberschenkel- und Wirbelfrakturen nachweislich senken konnten, werden aufgrund ihrer Nebenwirkungen, nämlich der kanzerogenen Wirkung auf die Brustdrüse der Frau bzw. auf Samenblase und Prostata beim Mann sowie dem allgemein gehäuften Auftreten von Arteriosklerose und Schlaganfällen, heutzutage nicht mehr zur Therapie eingesetzt (Rossouw et al. 2002).

Aktuell wird der Einsatz von Phytoöstrogenen als eine Therapieoption diskutiert. Bei Phytoöstrogenen handelt es sich um phenolische Verbindungen, die aus Pflanzen stammen und als sog. selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator (SERM) wirken (Brandi 1997). Der Terminus SERM bedeutet, dass eine Substanz Organ-selektiv an den verschiedenen Subtypen des Östrogenrezeptors (ER) ER α und Östrogenrezeptor β (ER β), wirkt (Kuiper et al. 1996).

1.4 Steroidhormone

Steroidhormone sind eine Gruppe von Hormonen, die alle Abkömmlinge des Cholesterins sind und sich durch ein Steran-Gerüst auszeichnen. Steroidhormone sind lipophil und müssen daher mit Hilfe von Transport-Proteinen im Blut transportiert werden. Im Falle der Sexualsteroiden handelt es sich um das bereits oben erwähnte SHBG. Steroide binden, nachdem sie die hydrophobe Membran der Zielzelle passiert haben, an einen intrazellulären Rezeptor, der sich im Zytosol befindet. Im inaktiven Zustand ist der Rezeptor an Hitzeschockproteine (HSP) gebunden, die als Chaperone fungieren. Nach der Bindung des Steroidhormons werden die HSP abgespalten und der durch Konformationsänderung nun aktive Hormon-Rezeptor-Komplex wandert in den Zellkern und bindet dort an Hormon-responsive Elemente im Bereich der Promotorregion des Zielgens, wodurch die Transkription bestimmter Gene aktiviert oder inaktiviert werden kann (Löffler und Petrides 2007).

1.4.1 Sexualsteroiden

Östrogene und Androgene sind sowohl beim Mann als auch bei der Frau die physiologisch wichtigen Sexualsteroiden. Das wichtigste Östrogen ist das 17β -Estradiol, welches einen aromatischen A-Ring sowie eine Hydroxylgruppe in 17β -Position besitzt. Das wichtigste Androgen ist Testosteron, welches durch das Enzym 5α -Reduktase zu 5α -Dihydrotestosteron (DHT) reduziert wird, das eine höhere biologische Wirksamkeit besitzt. T dient darüber hinaus als Prohormon für die Estradiol-Biosynthese. Es ist Substrat des Enzyms Aromatase, welche von Testosteron die Methylgruppe C19 abspaltet und den A-Ring aromatisiert, wodurch Estradiol entsteht. Dihydrotestosteron ist im Gegensatz zu Testosteron kein Substrat der Aromatase (Vanderschueren et al. 2006), d.h. es kann nicht in Estradiol umgewandelt werden. Die Aromatase kommt bei Frauen in den Granulosazellen des Ovars vor, wo sie im Rahmen der Estradiol-Synthese benötigt wird. Bei beiden Geschlechtern wird die Aromatase in Knochen, Fettgewebe, Haut und Gehirn exprimiert (Brodie 1979).

Die Synthese der Sexualhormone wird von der hypothalamisch-hypophysären Achse reguliert. Der Hypothalamus sezerniert Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH), welches an der Hypophyse die Ausschüttung von follikelstimulierendem Hormon (FSH) und luteinisierendem Hormon (LH) bewirkt. Beim Mann stimuliert FSH die Sertoli-Zellen und initiiert somit die Spermiogenese, während LH auf die im Hoden gelegenen Leydig-Zellen wirkt, die daraufhin Testosteron produzieren. Testosteron hemmt wiederum auf Hypothalamusebene die GnRH-Ausschüttung im Sinne einer negativen Rückkopplung. Die Estradiol-Biosynthese erfolgt beim Mann über den oben genannten Mechanismus mittels der Aromatase.

1.4.2 Rezeptoren der Sexualsteroid

Östrogene binden an einen intrazellulär gelegenen Östrogenrezeptor. Bisher ist das Vorliegen von zwei verschiedenen ER, einem ER α und einem ER β , nachgewiesen worden (Kuiper et al. 1996). Wie alle Steroidrezeptoren zählt auch der ER zu den ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren, da er seine Wirkung über die Aktivierung bzw. Inaktivierung der Transkription bestimmter Gene entfaltet (Lindberg et al. 2003). Eine Modulation der Estradiol-Wirkung wird durch verschiedene Mechanismen erreicht. Erstens besitzt Estradiol zwar die gleiche Affinität zu den beiden ER-Subtypen α und β , allerdings erfolgt durch lokal unterschiedlich stark exprimierte Cofaktoren eine Wirkungsmodulation im Sinne einer Verstärkung oder Abschwächung (Riggs et al. 2002). Zweitens besitzen ER α und ER β unterschiedliche Verteilungsmuster in den verschiedenen Organen (Kuiper et al. 1997). Diese gewebsspezifische Estradiol-Wirkung bildet die Grundlage für die Anwendung von SERM.

Ebenso wie beim ER handelt es sich beim Androgenrezeptor (AR) um einen ligandenaktivierten Transkriptionsfaktor. Den AR findet man beim Mann in den androgenabhängigen Geweben (Prostata, Samenblase, Hoden und Nebenhoden) und bei der Frau in den Ovarien. Auch im Knochen ist der AR beschrieben worden, dem eine Rolle in der Osteoblastenproliferation und -differenzierung zukommt. Ebenso konnte ein Mangel an AR als Ursache für Osteoporose nachgewiesen werden (Riggs et al. 2002).

1.5 Phytoöstrogene

Die Phytoöstrogene Genistein und Equol, die in dieser Studie untersucht wurden, gehören beide zur Gruppe der Isoflavone, die als ein Bestandteil der Soja-Bohne bekannt sind. Im Moment richtet die Forschung verstärkt ihre Aufmerksamkeit auf diese Isoflavone bzw. auf deren Inhaltsstoffe, die Phytoöstrogene, weil sie als eine nebenwirkungsarme Alternative zur pharmakologischen HRT gelten (Sehmisch et al. 2008). Im Rahmen der Osteoporose-Forschung konnte bei der postmenopausalen Frau bisher ein positiver Effekt von Phytoöstrogenen an der Lendenwirbelsäule festgestellt werden (Anderson und Garner 1998).

Auch in zahlreichen Versuchen am ovariectomierten (ovx) bzw. orx Tiermodell wurde die präventive Wirkung der Phytohormone auf die Osteoporose mit unterschiedlichen Ergebnissen untersucht (Fanti et al. 1998; Fujioka et al. 2004; Rachon et al. 2007). Hier soll daher erstmalig die therapeutische Wirkung von Genistein und Equol am osteoporotischen Knochen der orx S.D.-Ratte untersucht werden. Die Ratte stellt insofern ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung der Phytoöstrogene dar, weil sich bei Ratten und Menschen vergleichbare Plasmakonzentrationen der Isoflavone ergeben (Picherit et al. 2000).

Bei beiden Isoflavonen Genistein und Equol handelt es sich um nicht-steroidale Östrogene, die aufgrund ihrer zu Estradiol stereochemisch analogen Hydroxylgruppe in der Lage sind, an den ER zu binden (Picherit et al. 2000). Sowohl für Genistein als auch für Daidzein, dessen Metabolit das hier untersuchte Equol ist, wurde bereits eine östrogenartige Wirkung nachgewiesen (Farmakalidis et al. 1985). Sie besitzen jedoch eine 10^{-3} bis 10^{-5} geringere Affinität zum ER gegenüber Estradiol selbst und wirken jeweils unterschiedlich stark am ER α bzw. ER β (Kuiper et al. 1997; Miksicek 1994).

Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit Estradiol, die eine agonistische oder antagonistische Interaktion mit dem ER ermöglicht, nimmt man eine Wirkung der Phytoöstrogene als SERM an. Neben einer Wirkung an einem intrazellulären ER und konsekutiver Veränderung der Genexpression wird darüber hinaus vermutet, dass Isoflavone auch nicht-genomisch über einen membranständigen ER und über eine Inhibition von Enzymaktivitäten wirken könnten (Anderson et al. 1999; Brandi 1997).

1.5.1 Genistein

Genistein ähnelt in seiner Struktur dem Östrogen (Picherit et al. 2000). Nach oraler Aufnahme wird Genistein durch die Mikroflora des Darms gespalten, wodurch die Bioverfügbarkeit bestimmt wird (Xu et al. 1995). Es hat eine hohe Bioverfügbarkeit, weil es gut aus dem Darm ins Blut resorbiert wird und im enterohepatischen Kreislauf zirkuliert (Sfakianos et al. 1997). Die Ausscheidung erfolgt über den Urin. Genistein bindet an den ER mit verstärkter Affinität zum ER β (Kuiper et al. 1997).

Die Wirkung der Substanz Genistein am Knochen wurde bereits in vielen Studien untersucht, allerdings wurde zumeist der präventive Effekt von Genistein erforscht. An weiblichen Tieren konnte eine präventive Wirkung von Genistein auf den Knochen nachgewiesen werden (Fanti et al. 1998). In Studien an männlichen Tieren von Wu et al. und Ishimi et al. konnte zum Teil (z.T.) ein präventiver Effekt von Genistein auf den Erhalt der Knochenmineraldichte nach Orchidektomie (Orx) nachgewiesen werden (Ishimi et al. 2002; Wu et al. 2003). Die Wirkung von Genistein auf die Kortikalis wurde in diesen Untersuchung als geringer gegenüber der Wirkung auf die Spongiosa beschrieben (Ishimi et al. 2002). Darüber hinaus geht aus diesen Studien hervor, dass Genistein seine knochen-protectiven Eigenschaften, im Gegensatz zu Estradiol, nicht über eine Inhibition der Knochenresorption ausübt, sondern eher über eine Stimulation des Knochenaufbaus (Fanti et al. 1998). Diese Stimulation des Knochenaufbaus durch Genistein erfolgt vermutlich über die verstärkte Bindung von Genistein an den ER β an Osteoblasten (Kostelac et al. 2003; Onoe et al. 1997).

Aufgrund dieser Wirkungen wird Genistein als mögliches Präparat zur HRT bei Osteoporose diskutiert und soll in dieser Studie erstmalig bezüglich seiner therapeutischen Wirkung auf den osteoporotischen Knochen der männlichen S.D.-Ratte untersucht werden.

1.5.2 Equol

Equol entsteht nach Metabolisierung von Daidzein, einem Phytoöstrogen der Soja-Bohne. Die Metabolisierung erfolgt nach oraler Aufnahme von Daidzein durch die Mikroflora des Darms (Axelson et al. 1984). Ein Nachteil bei der Anwendung von Daidzein als natürliche Quelle des Equol ist, dass nicht jedes Individuum, aufgrund des unterschiedlichen Vorkommens von Equol-produzierenden Bakterien im Darm, in der Lage ist, in gleicher Menge Equol zu produzieren (Setchell et al. 2002). Daher wurde in unserem Versuch den Tieren synthetisches Equol zugeführt. Der Resorptionsmechanismus und die Ausscheidung von Equol erfolgen identisch zu Genistein. Equol besitzt eine stärkere östrogenartige Wirkung als Genistein und Daidzein selbst (Fonseca und Ward 2004). Es bindet an beide ER, jedoch mit höherer Affinität an den ER α (Kostelac et al. 2003; Setchell et al. 2002).

Am Knochen konnte bisher folgende Wirkung von Equol beschrieben werden: In einer Studie von Picherit et al. konnte eine Inhibition des Ovx-induzierten Knochenverlustes durch Daidzein, der Vorstufe von Equol, nachgewiesen werden und es zeigte sich eine Überlegenheit gegenüber der Wirkung von Genistein auf den Knochen (Picherit et al. 2000). Eine Untersuchung von Rachon et al. belegte hingegen nur einen geringen Knochen-einsparenden Effekt von Equol an ovx Ratten (Rachon et al. 2007).

Aufgrund der dargelegten Effekte wird Equol, ebenso wie Genistein, als mögliches Präparat zur HRT bei Osteoporose diskutiert und soll in dieser Studie neben Genistein bezüglich seiner therapeutischen Wirkung auf den osteoporotischen Knochen der männlichen S.D.-Ratte untersucht werden.

Als Positivkontrolle finden in diesem Versuch die gonadalen Steroide Estradiol und Dihydrotestosteron, für die eine Wirkung am osteoporotischen Knochen als bewiesen gilt, ihre Anwendung (Vandenput et al. 2002).

Als Kontrollgruppe dient ein Kollektiv an orx Ratten, die ausschließlich soja-freies Futter zugeführt bekommen (Sfakianos et al.). Dieses Futter ist im Gegensatz zu dem üblichen Futter für Versuchstiere frei von Soja-Proteinen und somit östrogenartig wirkenden Isoflavonen.

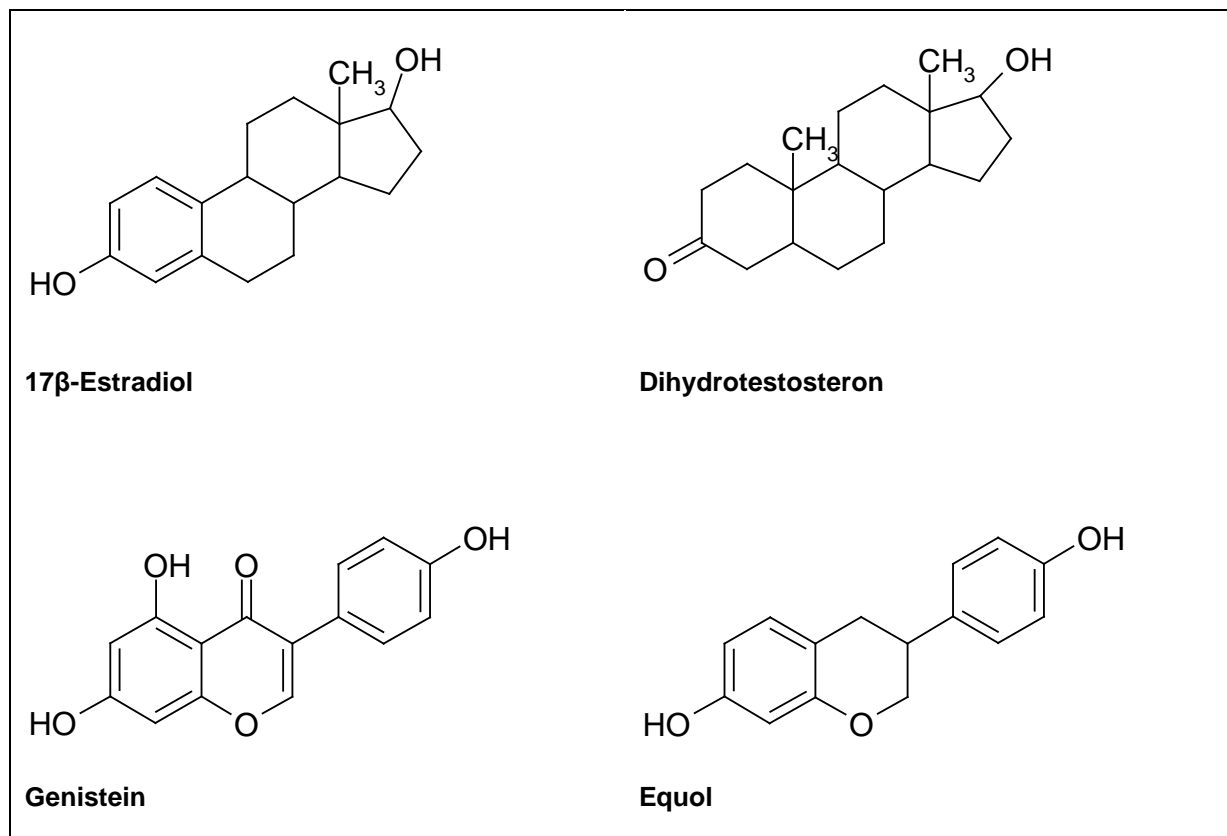


Abb. 2: Strukturformeln der untersuchten Substanzen 17β-Estradiol, Dihydrotestosteron, Genistein und Equol

1.6 Der Knochen der orchidektomierten Ratte als Osteoporosemodell

Die Grundlage für die Intaktheit des Knochens bildet die Homöostase zwischen Knochenaufbau und -abbau, die einem Gleichgewicht der Osteoblasten- und Osteoklasten-Aktivität entspricht. Bei der Ratte wird nach Ovariectomie (Ovx) bzw. Orchidektomie aufgrund des Wegfalls an gonadalen Steroiden diese Homöostase zugunsten der knochenabbauenden Osteoklasten verschoben und es entwickelt sich eine Osteoporose.

In dieser Studie wurde die senile Osteoporose beim Mann am Modell der orch S.D.-Ratte untersucht. Die S.D.-Ratte hat sich schon in diversen Studien zum Thema Osteoporose als geeignetes Tiermodell erwiesen.

Die Ratte ist schon im Alter von wenigen Monaten geschlechtsreif und stellt, weil sie nach Kastration durch Ovariectomie bzw. Orchidektomie innerhalb von 4 Wochen eine Osteoporose entwickelt, ein etabliertes Modell für Osteoporose dar (Roudebush et al. 1993; Seidlova-Wuttke et al. 2003; Sturmer et al. 2006).

Darüber hinaus ist die Reaktion der Ratte auf Hormonzufuhr auf die des Menschen übertragbar und unter ad-libitum-Bedingungen kann eine Substitutionstherapie mit durch das Futter applizierten Hormonen, wie auch in diesem Versuch erfolgt, bei der Ratte hervorragend untersucht werden (Frost und Jee 1992; Roudebush et al. 1993). Die Wirkung einer solchen Substitutionstherapie auf den Knochen wurde in dieser Studie mit Hilfe einer Knochendichtemessung durch pQCT und der Bestimmung der Knochenstoffwechselfparameter Cross-Laps und Osteocalcin im Serum untersucht. Darüber hinaus erfolgte eine Analyse des paratibialen Fettdepots und der paratibialen Muskelfläche. Als Messort für das pQCT wurde die proximale Metaphyse der Tibia gewählt, da sich bei der Ratte an dieser Lokalisation die Osteoporose stark manifestiert (Wronski et al. 1985) und ferner gezeigt werden konnte, dass der dort befindliche trabekuläre Knochen Östrogen reguliert ist (Hertrampf et al. 2006; Seidlova-Wuttke et al. 2003).

Die Methode unserer Wahl, das pQCT, bietet viele Vorteile gegenüber anderen Messmethoden: Es erlaubt die Messung der volumetrischen Knochendichte in g/cm^3 , eine Bestimmung der geometrischen Knochenparameter sowie eine Differenzierung zwischen Spongiosa und Kortikalis und die Bestimmung des paratibialen Fettdepots und der paratibialen Muskelfläche.

Die Messung der Serumparameter, welche ebenfalls im Rahmen dieser Studie erfolgt ist, entspricht einer Bestimmung der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten, die sich durch ihre Stoffwechselprodukte widerspiegelt. Nach Ovariectomie bzw. Orchidektomie nimmt die Osteoklasten-Aktivität zu, was eine Erhöhung der Serum-Cross-Laps zur Folge hat. Bei den Cross-Laps handelt es sich um Pyridinolderivate, die als Vernetzungspeptide zwischen den Kollagen-Typ-I Molekülen des Knochens fungieren und im Urin und im Serum nachweisbar sind (Garnero und Delmas 1999). Sie dienen als zuverlässiger Marker für den Knochenstoffwechsel und somit auch für die Osteoporose, da sie negativ mit der Knochenmineraldichte korrelieren (Melton et al. 1997). Als Parameter für die Aktivität der Osteoblasten dient Osteocalcin, das von den Osteoblasten produziert und in die Extrazellulär-Matrix eingebaut wird, wo es Hydroxylapatit bindet.

Sowohl beim Knochen-Aufbau als auch beim Knochen-Abbau gelangt Osteocalcin ins Serum und dient als Marker für die Mineralisation der Knochen-Matrix (Seidlova-Wuttke et al. 2003).

Durch Seidlova Wuttke et al. konnte gezeigt werden, dass die Serumspiegel von Osteocalcin und Cross-Laps durch Estradiol-Substitution bei ovx Ratten reduziert werden.

1.7 Fettgewebe

Das Fettgewebe besteht neben interstitiellem Bindegewebe und Blutgefäßen aus Adipozyten. Es ist aus zweierlei Gründen im weitesten Sinne als endokrines Organ anzusehen: Erstens besitzt es Aromatase-Aktivität und zweitens exprimiert es einen ER, vor allem den Subtyp ER α (Ohlsson et al. 2000). Ein Estradiol-Mangel führt zu einer Proliferation des Fettgewebes. Diese Tatsache erklärt die postmenopausale Adipositas der Frau (Tchernof und Poehlman 1998). Aber auch ein Androgenmangel bewirkt eine Zunahme des Fettdepots, was durch Blouin et al. für den abdominalen Fettanteil gezeigt werden konnte (Blouin et al. 2003).

In dieser Studie wurden die endokrinen Veränderungen des Fettgewebes der orx S.D.-Ratte anhand des paratibialen Fettdepots untersucht. Dieses Fettdepot konnte bereits in früheren Studien an der Ratte identifiziert und mittels pQCT untersucht werden. Das paratibiale Fettdepot reagiert auf einen Hormonmangel mit einer Proliferation. Eine Sensibilität dieses Fettanteils auf Estradiol ist beschrieben worden (Seidlova-Wuttke et al. 2003).

1.8 Muskelgewebe

Bei der in dieser Studie untersuchten paratibialen Muskulatur handelt es sich um Muskelfasern aus Skelettmuskulatur. Die Analyse dieser Muskulatur ist deshalb von Bedeutung, weil die Skelettmuskulatur bei bestehender Osteoporose über eine Stabilisierung des Knochens dem erhöhten Frakturrisiko entgegenwirkt. Die Muskelfasern der Skelettmuskulatur sind postmitotische Zellen.

Eine Zunahme von Muskelfasern erfolgt daher während der muskulären Entwicklung oder im Rahmen einer Regeneration durch eine Hypertrophie von Muskelfasern. Dafür sind Satellitenzellen notwendig. Diese Zellen sind proliferationsfähig und fusionieren mit den Muskelfasern, wodurch es zu einer Hypertrophie kommt. Dieser Vorgang ist Androgen-abhängig (Harridge 2007).

1.9 Ziel der Studie

Die Osteoporose des Mannes stellt ein bisher wenig erforschtes, jedoch bedeutendes Thema dar. Erstmals wurde in dieser Studie die therapeutische Wirkung der gonadalen Steroide Estradiol und Dihydrotestosteron vergleichend zur Wirkung der Isoflavone Genistein und Equol am stark osteoporotischen Knochen nach Orchidektomie der männlichen S.D.-Ratte untersucht. Die Phytohormone Genistein und Equol, die als natürliche Isoflavone bzw. deren Metabolit in Soja-Bohnen vorkommen, werden als mögliche Therapeutika bei Osteoporose diskutiert, weil sie als SERM wirken. In unserer Studie haben wir die therapeutische Wirkung dieser Substanzen auf die Knochenstruktur, das paratibiale Fettdepot sowie die paratibiale Muskelfläche mittels pQCT untersucht. Auch die Wirkung der Substanzen auf den Knochenstoffwechsel wurde durch Messung der spezifischen Knochenparameter Cross-Laps und Osteocalcin im Serum analysiert.

Nachfolgend sollen die therapeutischen Effekte der Substanzen Estradiol, Dihydrotestosteron, Genistein und Equol vergleichend analysiert und diskutiert werden. Als Kontrollgruppe dient ein Kollektiv an orchidektomierten S.D.-Ratten, das SF-Futter erhält (sog. SF, orx Kontrollgruppe). Schließlich soll die Frage beantwortet werden, ob die von uns untersuchten Substanzen einen therapeutischen Effekt auf den osteoporotischen Knochen der männlichen S.D.-Ratte haben.

Die Studie wurde im Rahmen des Antrages DFG Ja398/10-1 an die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) angefertigt.

2. Material und Methoden

2.1 Die Versuchstiere und ihre Haltung

In der Studie kamen 150 männliche S.D.-Ratten zum Einsatz, welche von der Firma (Fa.) Winkelmann geliefert wurden. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn 3 Monate alt und hatten ein durchschnittliches Gewicht von $350\text{g} \pm 40\text{g}$. Die Haltung erfolgte in den Tierställen des Universitätsklinikums Göttingen, wobei jeweils 5 Tiere in einem Käfig (Makrolonkäfig Typ IV, Fa. Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg) untergebracht waren. Für die Tiere bestand jederzeit freier Zugang zu Futter und frischem Trinkwasser (ad libitum). In dem Tierstall erfolgte stets eine Beleuchtung von 6 bis 18 Uhr (12h dark-light-cyclus) und die Tiere waren einer konstanten Raumtemperatur von ca. 23°C sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55% ausgesetzt.

Für diesen Tierversuch lag gemäß gesetzlicher Bestimmung die Genehmigung der Bezirksregierung Braunschweig vor (Aktenzeichen: 509.42502/01-36.03). Die Experimente wurden unter Anleitung von Dr. Dr. D. Seidlova-Wuttke durchgeführt.

2.2 Der Versuchsablauf

Anfangs erhielten die S.D.-Ratten im Rahmen einer 4-wöchigen Eingewöhnungsphase sojafreies Futter. Daraufhin erfolgte die erste CT-Messung (CT1) aller 150 Ratten, welche den Versuchsbeginn markiert. Im Anschluß an das CT1 fand die Orchidektomie sämtlicher Tiere statt.

Bis 4 Wochen nach Orchidektomie wurden alle Tiere mit SF-Futter ohne Testsubstanz ernährt, danach erfolgte käfigweise die Einteilung der Tiere in 5 verschiedene Futtergruppen: Eine Kontrollgruppe, die soja- und testsubstanzfreies Futter erhält, sowie vier weitere Gruppen, die jeweils eine der Testsubstanzen Estradiol, Dihydrotestosteron, Genistein oder Equol erhalten.

In Abständen von 6, 7 und 12 Wochen nach Orchidektomie bzw. 2, 3 und 8 Wochen nach Beginn der Applikation der Testsubstanz über das Futter erfolgte jeweils die zweite CT-Messung (CT2) von 10 Tieren aus allen fünf Futtergruppen und anschließende Obduktion.

Tab. 1: Die Untersuchungszeitpunkte

Untersuchungszeitpunkt für das CT2	Versuchsgruppe	Anzahl der Tiere (n)
6 Wochen nach Orx Substanzapplikation: 2 Wochen	SF, orx	n=10
	E2, orx	n=10
	DHT, orx	n=10
	GEN, orx	n=10
	EQ, orx	n=10
7 Wochen nach Orx Substanzapplikation: 3 Wochen	SF, orx	n=10
	E2, orx	n=10
	DHT, orx	n=10
	GEN, orx	n=10
	EQ, orx	n=10
12 Wochen nach Orx Substanzapplikation: 8 Wochen	SF, orx	n=10
	E2, orx	n=10
	DHT, orx	n=10
	GEN, orx	n=10
	EQ, orx	n=10

2.3 Die Orchidektomie

Die Orchidektomie der Ratten fand nach einer 4-wöchigen Gewöhnungsphase und nach durchgeführter pQCT-Messung (CT1) statt. Der Eingriff erfolgte unter einer kurzzeitigen Vollnarkose, die mittels CO₂-Inhalation und anschließender intraperitonealer Injektion von 2,5mg Xylocain/Tier (Rompun®, Fa. Bayer, Leverkusen), entsprechend 10mg/kg Körpergewicht (KG), und 11mg Ketamin (Hostaket®, Fa. Hoechst, Bad Soden), entsprechend 45mg/kg KG erzielt wurde.

Zum Schutz der Augen vor Austrocknung während der Operation wurde den Ratten lokal ein Feuchtigkeitsgel (Thilo Tears®, Fa. Alcon) appliziert.

Die Hoden der Ratte wurden zunächst durch Evaluierung aus der Bauchhöhle beidseits aufgesucht. Nach medialer Inzision der Skrotalhaut wurde das viszerale Peritoneum durchtrennt, um den Hoden zu präparieren. Nach Darstellung des Hodens wurden der Ductus epididymidis und die begleitenden Gefäße durch Vicryl-Fäden ligiert und anschließend entfernt. Dieses Verfahren wurde ebenfalls auf der kontralateralen Seite durchgeführt. Abschließend wurde das Operationsfeld auf Blutungsfreiheit kontrolliert und die Skrotalhaut wurde mittels Vicryl-Fäden verschlossen. Die Dauer der Narkose betrug ca. 10 bis 15 Minuten und wurde durch intraperitoneale Injektion von Antisedan® (Antipamezolhydrochlorid, Fa. Pfizer) in 10% Lösung mit NaCl beendet.

Um einer postoperativen Dehydratation vorzubeugen, wurden 5ml einer isotonen NaCl-Lösung (Fa. Braun, Melsungen) subkutan (s.c.) verabreicht.

Während der Aufwachphase standen die Tiere unter ständiger Beobachtung.

2.4 Die Tiernahrung

Die Ratten erhielten zunächst sojafreies-Pellet-Futter (V 1354, ssniff R-Z, 10 mm, phytoöstrogenarm, Fa. ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Eine Umstellung des Futters auf die Testsubstanz erfolgte 4 Wochen nach Orchidektomie. Von diesem Zeitpunkt an wurde, abgesehen von der Kontrollgruppe, die stets soja- und testsubstanzfreies Futter erhielt, dem Futter für die unterschiedlichen Gruppen durch die Fa. ssniff jeweils eine der folgenden Testsubstanzen beigefügt:

- Sojafreies und Estradiolbenzoat (E2B)-haltiges Futter (10mg/kg)
- Sojafreies und Dihydrotestosteron-haltiges Futter (1g/kg)
- Sojafreies und Genistein-haltiges Futter (1g/kg)
- Sojafreies und Equol-haltiges Futter (400mg/kg)

Die mittlere Futterraufnahme pro 100g Körpergewicht und die mittlere Substanzaufnahme pro 100g Körpergewicht sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tab. 2: Mittlere Futtermittelaufnahme pro 100g Körpergewicht (BW) pro Tier pro Tag (d) und mittlere Substanzaufnahme pro 100g Körpergewicht pro Tag

Substanzgruppe	mittlere Futtermittelaufnahme pro 100g BW/d	mittlere Substanzaufnahme pro 100g BW/d
SF, orx	4,59 g	0 mg
DHT, orx	4,84 g	4,84 mg
E2B, orx	4,34 g	43,41 µg
GEN, orx	4,85 g	4,85 mg
EQ, orx	4,84 g	1,93 mg

Die ungeöffneten Futtersäcke wurden in einem Kühlraum bei -20°C gelagert, wohingegen die geöffneten Futtersäcke bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden. Zum Selbstschutz vor Inhalation oder perkutaner Absorption wurden während des einmal wöchentlich stattfindenden Futterwiegens und Auffüllens des Tierfutters Latex-Einweghandschuhe, Schutzkittel sowie Mund- und Nasenmasken getragen. Die wöchentliche Futtermittelaufnahme pro Käfig sowie das in Intervallen ermittelte Körpergewicht der Ratten (Waage: Basic lite BL3, Fa. Sartorius) wurden protokolliert.

2.5 Die pQCT-Messung

2.5.1 Die Identifizierung der Tiere

Um eine Identifizierung der Tiere sicherstellen zu können, wurde jeder Ratte vor der ersten CT-Messung unter Narkose ein Transponder in das subkutane Fett des Nackens implantiert.

Dabei kam das Transponder-UNO Micro-ID-System mit ISO Transponder der Länge 12mm zur Anwendung, welches mit einem tragbaren Transponder-Lesegerät (Gesreder II Ge S008: ISO kompatibler Taschenleser) abgerufen werden kann.

Somit konnte jedem Tier eine Identifikationsnummer zugeordnet werden, unter welcher sämtliche in der Studie erhobenen Daten dokumentiert wurden.

2.5.2 Die Narkose

Die Narkotisierung der Tiere für die pQCT-Messung wurde durch Inhalation von Isofluran-Gas (Forene®, Firma Abbott) über eine Mund-Nasen-Maske herbeigeführt, wozu ein Kleintier-Narkosegerät in Kombination mit einem Flow-Meter (beides Fa. UNO, Zevenaar/Niederlande) benutzt wurde. Diese Apparatur erlaubt eine individuelle Narkoseanpassung durch Regulation der Menge an Narkosegas und Sauerstoff- und Luftbeimengung. Die Narkose wurde während der gesamten Dauer der CT-Messung aufrechterhalten und dauerte nicht länger als 10min.

2.5.3 Die Computertomographie

Der linke Hinterlauf der narkotisierten Ratte wurde für die CT-Messung in einer anatomisch geformten Kunststoffvorrichtung (Fa. Stratec Medizintechnik, Pforzheim) fixiert (siehe Abb. 3, rechts). Die Messungen der Knochenparameter der linken Tibia sowie des paratibialen Fettdepots und der paratibialen Muskelfläche erfolgte mit einem pQCT-Gerät (siehe Abb. 3, links: XCT-Research Bone Scanner, Fa. Stratec Medizintechnik, Pforzheim).



Abb. 3: links: pQCT-Gerät (XCT Research SA)
(Quelle: http://www.stratec-med.com/en/layout/prod_xctrsa.jpg)
rechts: Vorrichtung zur Fixation des Rattenhinterlaufes
(Quelle: <http://www.stratec-med.com/en/layout/rattenhalter.jpg>)

Dabei handelt es sich um ein vollautomatisches pQCT-Gerät, von welchem die im CT-Scan erhobenen Messdaten auf einen Computer übertragen werden. Dort erfolgt mit Hilfe eines vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software-Programms die Bearbeitung, Auswertung und Speicherung der Daten.

Die pQCT-Messung beruht auf der unterschiedlichen Absorption der Röntgenstrahlung abhängig vom durchstrahlten Objekt, wodurch ein Absorptionsprofil entsteht. Durch Verrechnung von mehreren Absorptionsprofilen aus verschiedenen Winkeln lässt sich ein Querschnittbild des Objekts erstellen.

Die Standardisierung der Messung erfolgt durch eine alle 4 Tage stattfindende Kalibrierung des Systems mit einem Prüfkörper aus Hydroxylapatit von definierter Dichte und Zusammensetzung, was die Angabe des Dichteäquivalents in mg/cm^3 ermöglicht.

Der genaue Messort wird durch einen Übersichts-Scan und darauf folgende Positionierung einer Referenzlinie, welche in der Epiphysenfuge lokalisiert wird, festgelegt. Das zu messende Objekt wird dann in 0,5mm Schritten distal der Referenzlinie mäanderförmig abgescannt, wobei der Messstrahl quer zur Knochenlängsachse hindurchgeführt wird. Der Messbereich umfasst 180° , entsprechend 15 Scan-Positionen in Winkeletappen von jeweils 12° bei einem Winkelabstand von Detektor zu Quelle von 1° .

Der Computer ermittelt dann anhand der Röntgenabsorption ein CT-Bild. Die so ermittelten Dichteunterschiede ergeben ein farblich codiertes Rasterbild, in welchem verschiedene Gewebetypen anhand unterschiedlicher Graustufen differenziert werden: die Knochenanteile sind darin hell und die Weichteile (Fett und Muskulatur) sind dunkel dargestellt. Als Fett wird diejenige Fläche des Rasterbildes gewertet, welche eine Dichte $<50 \text{ mg}/\text{cm}^3$ aufweist. Die Muskulatur ist durch eine Dichte von $50\text{-}100 \text{ mg}/\text{cm}^3$ definiert. Die Unterteilung des Knochens erfolgt, ebenfalls anhand der Dichte, in Spongiosa ($260\text{-}400 \text{ mg}/\text{cm}^3$) und Kortikalis ($>710 \text{ mg}/\text{cm}^3$).

So konnten die verschiedenen Strukturen des Knochens (Spongiosa und Kortikalis) sowie das paratibiale, zwischen Musculus (lat. Muskel) gastrocnemius und Tibia gelegene Fettdepot, mittels pQCT gemessen und anschließend analysiert werden.

Die Angabe des paratibialen Fettdepots erfolgt prozentual zur Gesamtfläche des Tibiaquerschnittes. Die Muskelfläche konnte berechnet werden aus der Differenz zwischen der Gesamtfläche des Tibiaquerschnittes und der Fläche des paratibialen Fettdepots.

2.6 Serum-Analyse

Bei Tötung der Tiere durch Dekapitation konnte Blut zur Untersuchung verschiedener Serum-Parameter gewonnen werden. Osteocalcin wurde mit Hilfe des Elecsys-System (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) bestimmt.

Die Serum-Cross-Laps wurden durch ELISA (Osteometer, Bio Tech AIS, Dänemark) ermittelt.

2.7 Statistische Methoden

Die Werte für die Statistik wurden mit dem Computerprogramm Graph Pad PRISM 4® berechnet und das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Anwendung einer Varianzanalyse für wiederholte Messungen eines Faktors (ANOVA) und anschließendem Test nach Dunnett. Die Daten werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung graphisch dargestellt.

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Studie resultieren aus der Untersuchung von orx S.D.-Ratten, an welchen die Substanzen Estradiol, Dihydrotestosteron, Genistein und Equol vergleichend zu einer SF, orx Kontrollgruppe getestet wurden. In den folgenden Abbildungen werden die Veränderungen der untersuchten Parameter zu den verschiedenen Zeitpunkten 6, 7 bzw. 12 Wochen nach Orchidektomie bzw. nach 2, 3 und 8-wöchiger Substanzapplikation graphisch dargestellt.

Für die in der pQCT-Messung erhobenen Knochenparameter werden für die verschiedenen Zeitpunkte nach Orchidektomie jeweils die absoluten Werte pro 100g Körpergewicht sowie die prozentualen Änderungen dieser Werte von CT1 (prä-Orx) gegenüber CT2 gezeigt.

Eine Darstellung der verschiedenen Parameter pro 100g Körpergewicht wurde aus mehreren Gründen gewählt: Erstens besteht ein Zusammenhang zwischen dem Körpergewicht und der Knochendichte (Karasik et al. 2003; Rachon et al. 2007; Wronski et al. 1987). Zweitens sind durch die objektivierte Darstellung der Ergebnisse pro 100g Körpergewicht die Werte bei unterschiedlichem Körpergewicht der Tiere in den Behandlungsgruppen besser miteinander vergleichbar.

3.1 Die Futteraufnahme

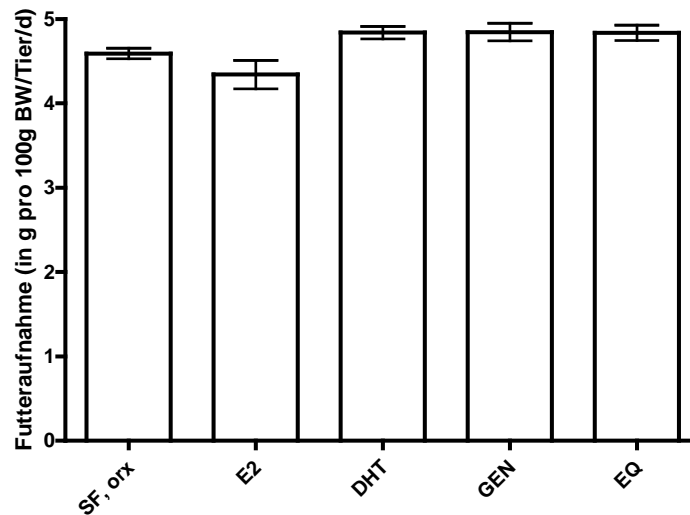


Abb. 4: Die durchschnittliche Futteraufnahme der Behandlungsgruppen nach Umstellung des Futters auf die Testsubstanzen.

Die durchschnittliche Futteraufnahme nach Orchidektomie betrug in allen Behandlungsgruppen 4-5g Futter pro 100g Körpergewicht pro Tier pro Tag.

Für die verschiedenen Behandlungsgruppen gab es keine statistisch relevanten Unterschiede in der durchschnittlichen Futteraufnahme pro 100g Körpergewicht.

3.2 Die Veränderung des Körpergewichtes

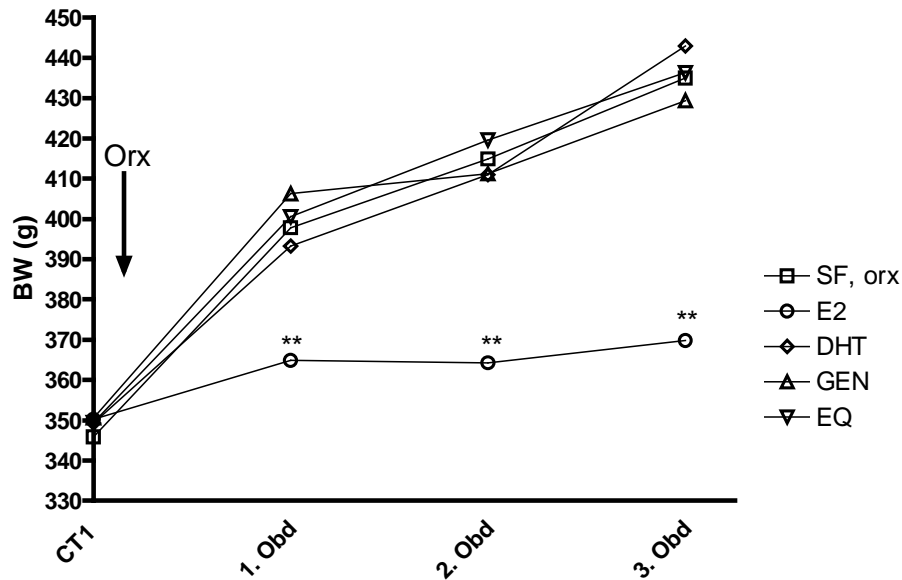


Abb. 5: Die Effekte der Orchidektomie und der Applikation von E2, DHT, GEN und EQ auf das Körpergewicht.
Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$ vs. SF, orx

Zu Versuchsbeginn (CT1) hatten die prä-Orx Tiere im Durchschnitt ein Gewicht von 350g. Nach stattgehabter CT2-Messung erfolgte eine erneute Gewichtsmessung der Tiere.

Das Gewicht der Estradiol-Behandlungsgruppe war signifikant niedriger gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

Die übrigen Gruppen haben nach Orchidektomie durchschnittlich 70-90g an Gewicht zugenommen. Dihydrotestosteron, Genistein und Equol haben keine statistische Relevanz im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt.

3.3 Serumparameter des Knochenmetabolismus

Die Veränderungen des Knochenmetabolismus lassen sich durch Analyse der Serum-Cross-Laps und des Serum-Osteocalcins untersuchen.

3.3.1 Die Veränderung der Serum-Cross-Laps

Im Zeitverlauf der Untersuchung mit Messungen 6, 7 und 12 Wochen nach Orchidektomie haben die Serum-Cross-Laps in allen Behandlungsgruppen ebenso wie in der SF, orx Kontrollgruppe abgenommen.

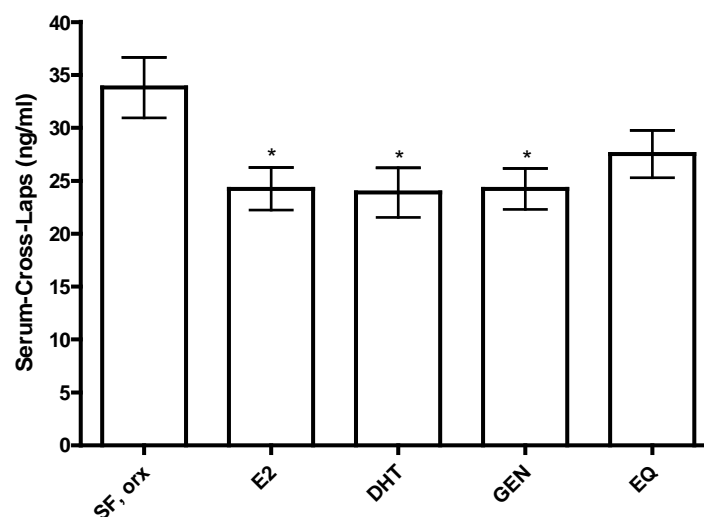


Abb. 6: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf die Serum-Cross-Laps der orx S.D.-Ratte 6 Wochen nach Orchidektomie, nach 2-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ vs. SF, orx

6 Wochen nach Orchidektomie waren die Serum-Cross-Laps in den Behandlungsgruppen Estradiol, Dihydrotestosteron und Genistein signifikant niedriger gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

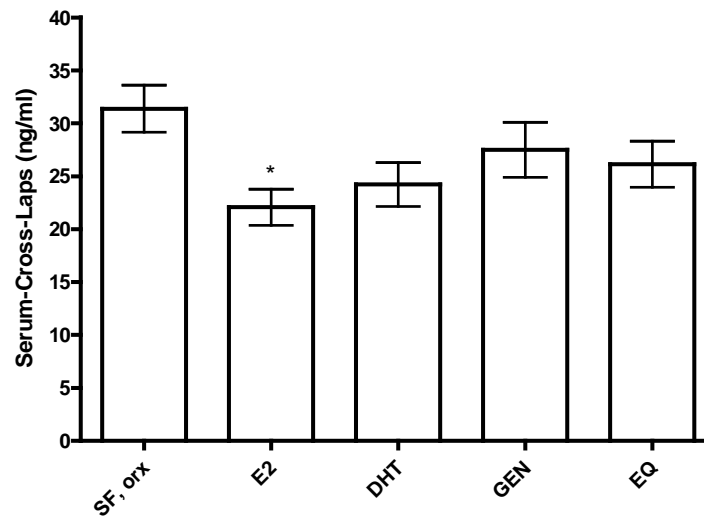


Abb. 7: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf die Serum-Cross-Laps der orx S.D.-Ratte 7 Wochen nach Orchidektomie, nach 3-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ vs. SF, orx

7 Wochen nach Orchidektomie waren die Cross-Laps in der Estradiol-Behandlungsgruppe signifikant niedriger gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

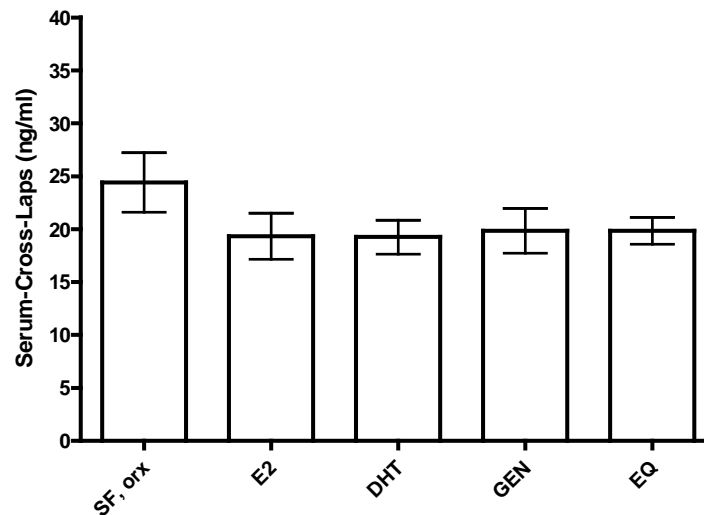


Abb. 8: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf die Serum-Cross-Laps der orx S.D.-Ratte 12 Wochen nach Orchidektomie, nach 8-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ vs. SF, orx

12 Wochen nach Orchidektomie war das Level der Serum-Cross-Laps in allen untersuchten Behandlungsgruppen auf etwa gleichem Niveau und niedriger gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

Die Serum-Cross-Laps waren in der SF, orx Kontrollgruppe zu jedem Untersuchungszeitpunkt höher als in den übrigen Behandlungsgruppen.

3.3.2 Die Veränderung des Serum-Osteocalcins

Im Zeitverlauf der Untersuchung hat das Serum-Osteocalcin in allen Behandlungsgruppen ebenso wie in der SF, orx Kontrollgruppe abgenommen.

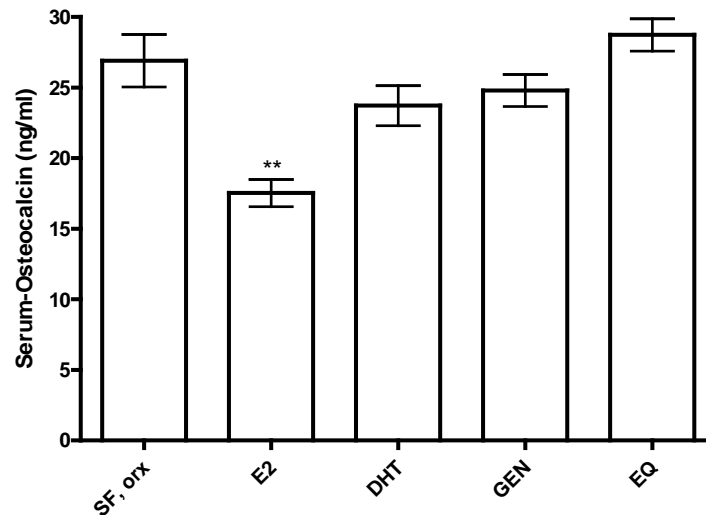


Abb. 9: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf das Serum-Osteocalcin der orx S.D.-Ratte 6 Wochen nach Orchidektomie, nach 2-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$ vs. SF, orx

6 Wochen nach Orchidektomie war Osteocalcin in der SF, orx Kontrollgruppe und in der Equol-Gruppe am höchsten.

In der Estradiol-Gruppe war Osteocalcin signifikant niedriger gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

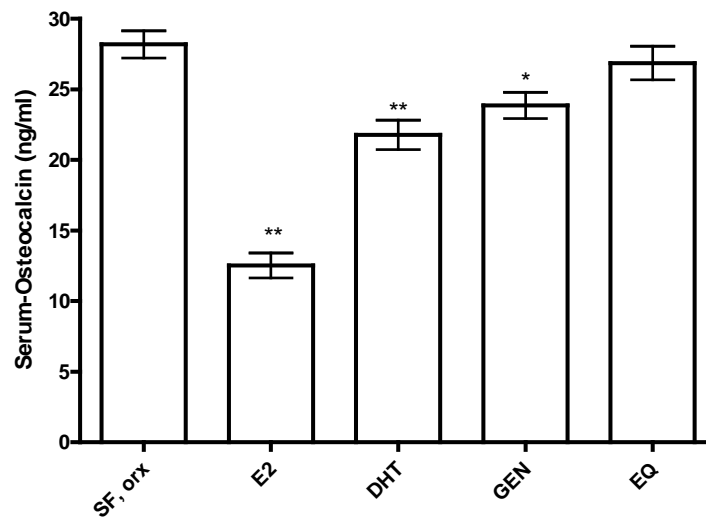


Abb. 10: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf das Serum-Osteocalcin der orx S.D.-Ratte 7 Wochen nach Orchidektomie, nach 3-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ vs. SF, orx; ** $p < 0,01$ vs. SF, orx

7 Wochen nach Orchidektomie war Osteocalcin in der SF, orx Kontrollgruppe am größten und in den Behandlungsgruppen Estradiol, Dihydrotestosteron und Genistein signifikant niedriger gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

Am geringsten war Osteocalcin in der Estradiol-Behandlungsgruppe.

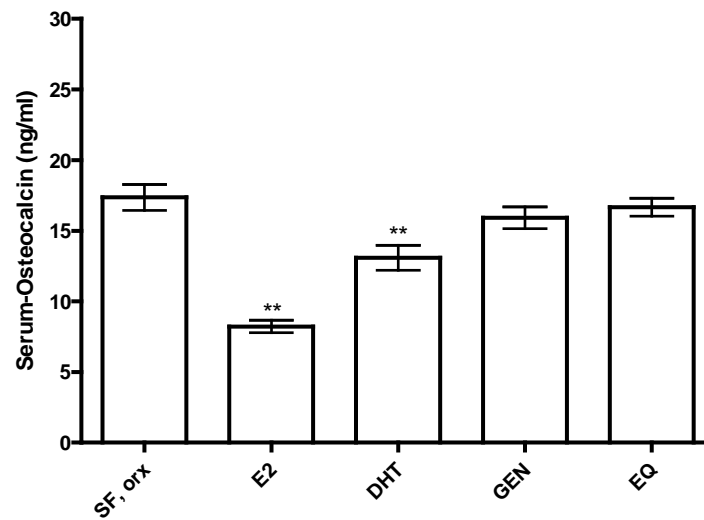


Abb. 11: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf das Serum-Osteocalcin der orx S.D.-Ratte 12 Wochen nach Orchidektomie, nach 8-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$ vs. SF, orx

12 Wochen nach Orchidektomie war Osteocalcin in den Behandlungsgruppen Estradiol und Dihydrotestosteron signifikant niedriger gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

Das geringste Serum-Osteocalcin wurde in der Estradiol- Behandlungsgruppe gemessen.

3.4 Knochen

Die folgenden strukturellen Veränderungen der Knochenparameter wurden mittels pQCT-Messung erhoben.

3.4.1 Die Veränderung der Spongiosadichte der Metaphyse der Tibia

Die Veränderung der Spongiosadichte an der Metaphyse der Tibia unter dem Einfluss der getesteten Substanzen ist ein zentrales Thema dieser Studie.

Die Spongiosadichte hat nach Orchidektomie in allen untersuchten Gruppen signifikant gegenüber den prä-Orx-Tieren abgenommen.

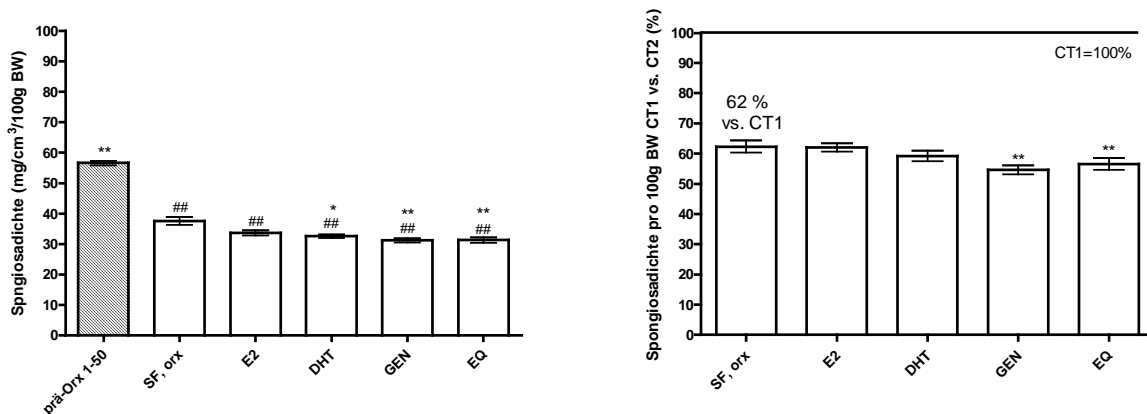


Abb. 12: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf die Spongiosadichte der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 6 Wochen nach Orchidektomie, nach 2-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ vs. SF, orx; ** $p < 0,01$ vs. SF, orx; ## $p < 0,01$ vs. prä-Orx

Nach Orchidektomie hat die Spongiosadichte signifikant abgenommen. In der SF, orx Kontrollgruppe hat die Spongiosadichte sechs Wochen nach Orchidektomie auf 62% des Ausgangswertes von CT1 abgenommen. Die Abnahme der Spongiosadichte pro 100g Körpergewicht war in den Behandlungsgruppen Dihydrotestosteron, Genistein und Equol signifikant größer gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

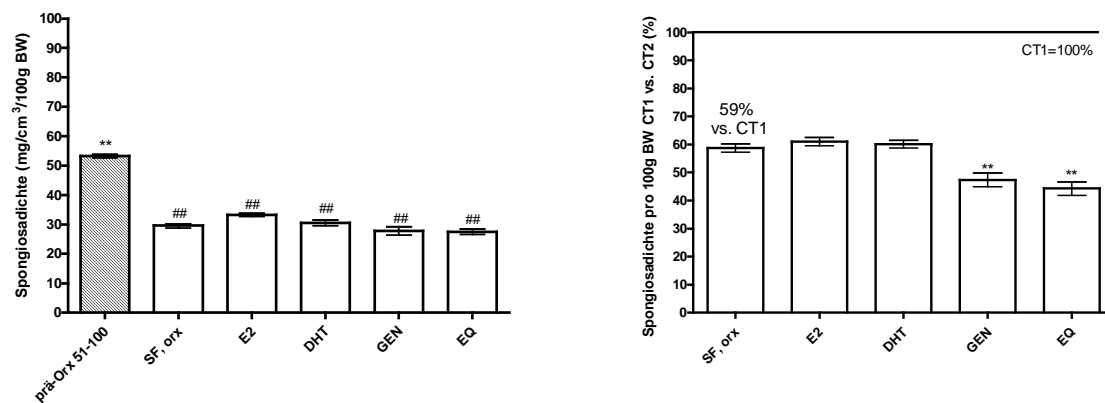


Abb. 13: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf die Spongiosadichte der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 7 Wochen nach Orchidektomie, nach 3-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$ vs. SF, orx; ## $p < 0,01$ vs. prä-Orx

7 Wochen nach Orchidektomie hat die Spongiosadichte in der SF, orx Kontrollgruppe auf 59% gegenüber den prä-Orx-Werten von CT1 abgenommen.

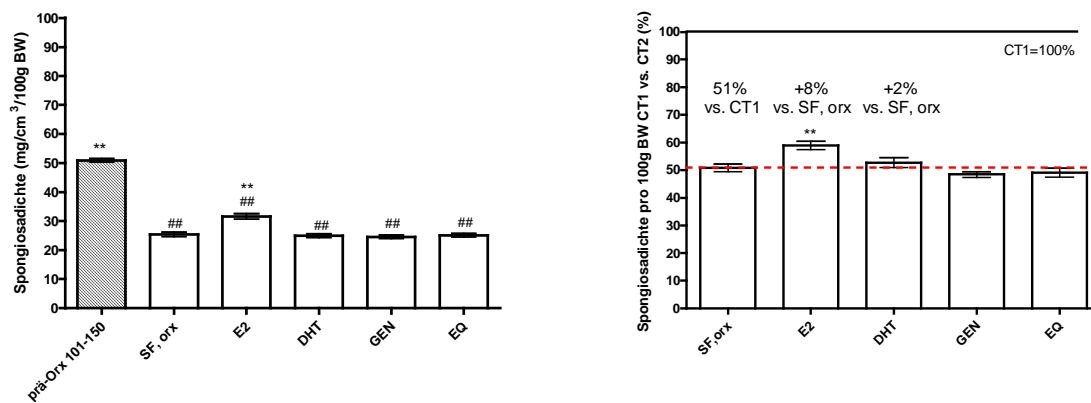


Abb. 14: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf die Spongiosadichte der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 12 Wochen nach Orchidektomie, nach 8-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$ vs. SF, orx; ## $p < 0,01$ vs. prä-Orx

12 Wochen nach Orchidektomie war in der SF, orx Kontrollgruppe 51% der Spongiosadichte im Vergleich zu den Ausgangswerten von CT1 erhalten.

Unter Estradiol konnte eine signifikant größere Spongiosadichte pro 100g Körpergewicht gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe erreicht werden.

Unter Dihydrotestosteron war die Spongiosadichte um 2% größer gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

Im Zeitverlauf von 1. bis 3. Obduktion hat eine progrediente Abnahme der Spongiosadichte stattgefunden, je länger die Orchidektomie zurückliegt. Die Abnahme der Spongiosadichte war unmittelbar nach Orchidektomie am größten. Im Verlauf von 1. bis 3. Obduktion verlangsamte sich der Verlust an Spongiosadichte. Zum Zeitpunkt der 1. Obduktion, d.h. nach 2-wöchiger Substanzapplikation, wurde unter SF Futter im Vergleich zu den untersuchten Substanzen eine höhere Spongiosadichte erreicht. Nach 3- und 8-wöchiger Substanzapplikation war die Spongiosadichte in der Estradiol-Behandlungsgruppe größer als in der SF, orx Kontrollgruppe.

3.4.2 Die Veränderung der Spongiosafläche der Metaphyse der Tibia

Nach Orchidektomie haben die Tiere signifikant an Spongiosafläche verloren.

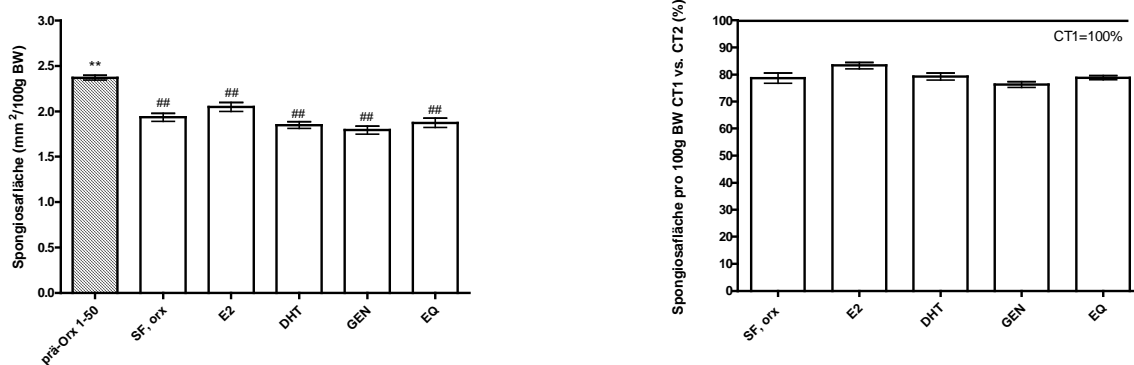


Abb. 15: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf die Spongiosafläche der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 6 Wochen nach Orchidektomie, nach 2-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$ vs. SF, orx; ## $p < 0,01$ vs. prä-Orx

6 Wochen nach Orchidektomie betrug die prozentuale Abnahme der Spongiosafläche in der SF, orx Kontrollgruppe 78% gegenüber den prä-Orx-Tieren.

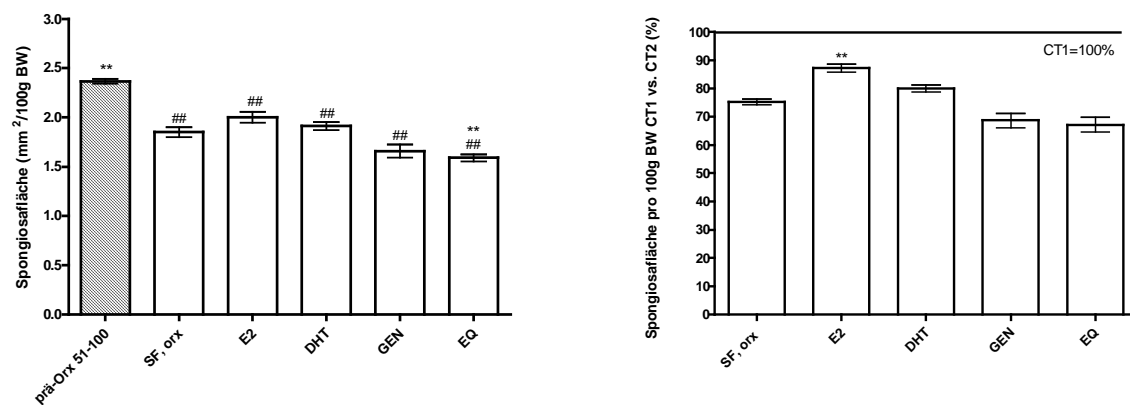


Abb. 16: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf die Spongiosafläche der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 7 Wochen nach Orchidektomie, nach 3-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$ vs. SF, orx; ## $p < 0,01$ vs. prä-Orx

7 Wochen nach Orchidektomie war die Spongiosafläche in allen Behandlungsgruppen sowie in der SF, orx Kontrollgruppe signifikant niedriger gegenüber den prä-Orx-Tieren.

Die prozentuale Abnahme der Spongiosafläche war in der Estradiol-Behandlungsgruppe signifikant niedriger gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

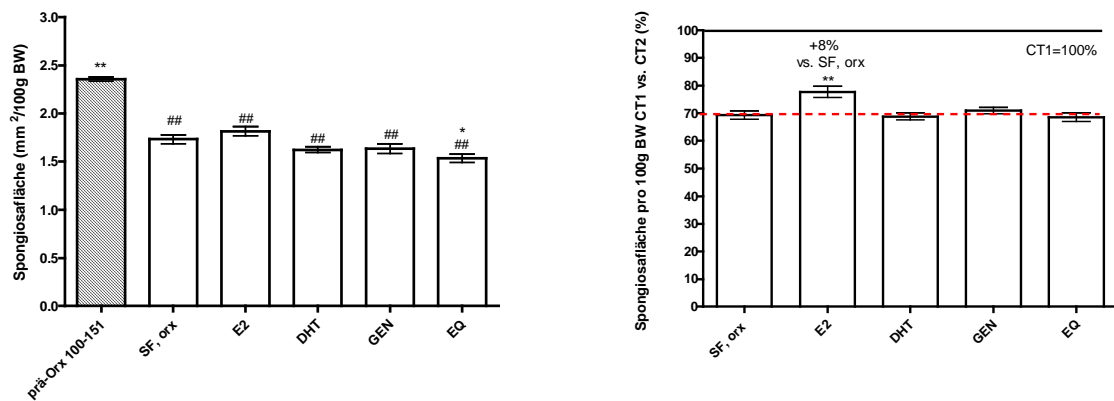


Abb. 17: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf die Spongiosafläche der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 12 Wochen nach Orchidektomie, nach 8-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ vs. SF, orx; ** $p < 0,01$ vs. SF, orx; ## $p < 0,01$ vs. prä-Orx

12 Wochen nach Orchidektomie wurde die geringste prozentuale Abnahme an Spongiosafläche in der Estradiol-Behandlungsgruppe gemessen. Dort konnte 12 Wochen nach Orchidektomie im Vergleich zur SF, orx Kontrollgruppe 8% mehr an Spongiosafläche erhalten bleiben.

Im Zeitverlauf fällt eine progrediente Abnahme der Spongiosafläche pro 100g Körpergewicht von 1. bis 3. Obduktion auf.

3.4.3 Die Veränderung der Kortikalisdichte der Metaphyse der Tibia

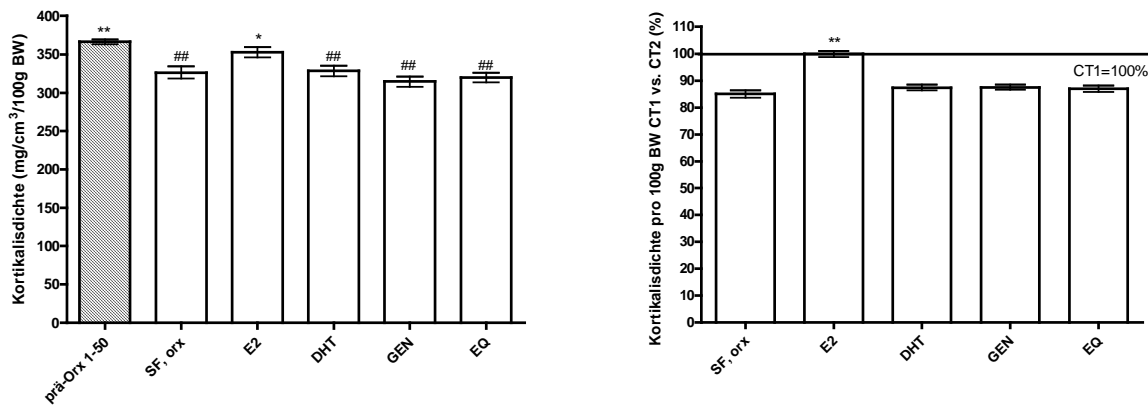


Abb. 18: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf die Kortikalisdichte der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 6 Wochen nach Orchidektomie, nach 2-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ vs. SF, orx; ** $p < 0,01$ vs. SF, orx; ## $p < 0,01$ vs. prä-Orx

6 Wochen nach Orchidektomie hat die Kortikalisdichte in der SF, orx Kontrollgruppe sowie in den Behandlungsgruppen Dihydrotestosteron, Genistein und Equol signifikant gegenüber den prä-Orx-Werten abgenommen.

Die Kortikalisdichte in der Estradiol-Behandlungsgruppe war signifikant größer gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe und auf gleichem Niveau zu der prä-Orx gemessenen Kortikalisdichte.

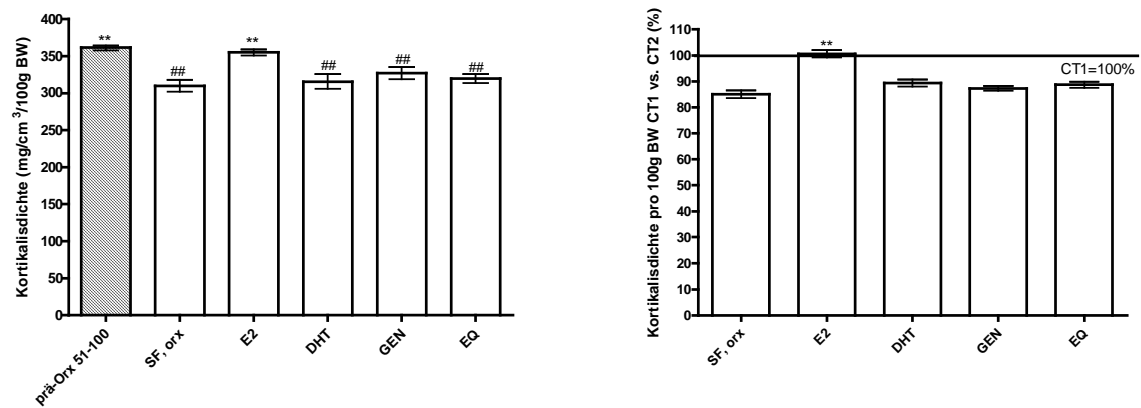


Abb. 19: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf die Kortikalisdichte der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 7 Wochen nach Orchidektomie, nach 3-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: ** p<0,01 vs. SF, orx; ## p<0,01 vs. prä-Orx

7 Wochen nach Orchidektomie waren die Werte für die Kortikalisdichte vergleichbar zur Vormessung 6 Wochen nach Orchidektomie.

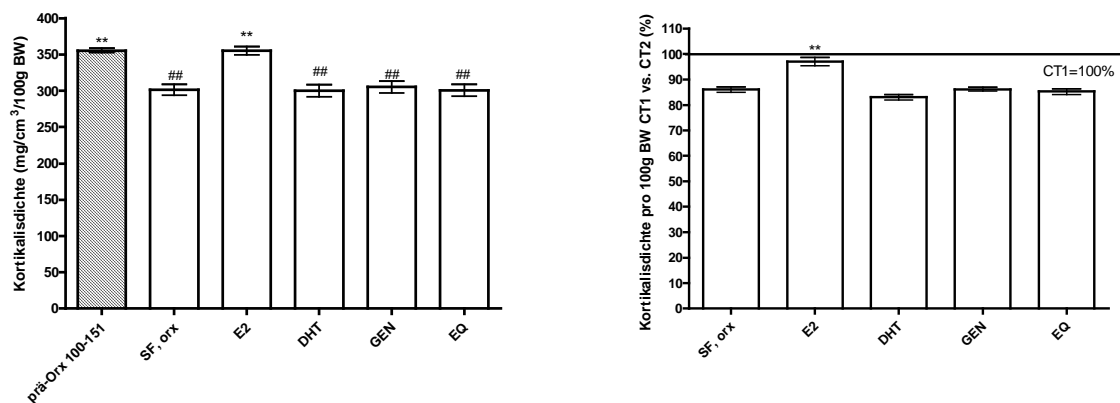


Abb. 20: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf die Kortikalisdichte der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 12 Wochen nach Orchidektomie, nach 8-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$ vs. SF, orx; ## $p < 0,01$ vs. prä-Orx

12 Wochen nach Orchidektomie ist die Kortikalisdichte, ebenso wie in den Vormessungen, in der SF, orx Kontrollgruppe sowie in den Behandlungsgruppen Dihydrotestosteron, Genistein und Equol signifikant niedriger gegenüber prä-Orx. In der Estradiol-Behandlungsgruppe war die Kortikalisdichte signifikant größer gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

3.4.4 Die Veränderung der Kortikalisfläche der Metaphyse der Tibia

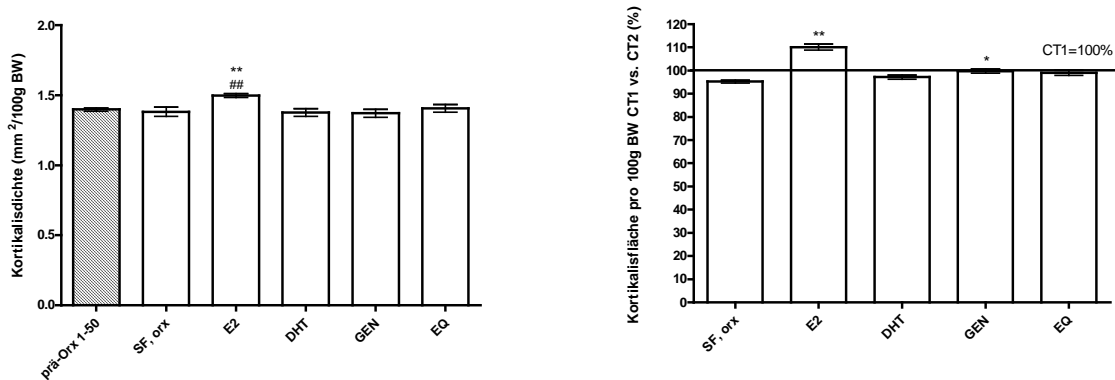


Abb. 21: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf die Kortikalisfläche der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 6 Wochen nach Orchidektomie, nach 2-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ vs. SF, orx; ** $p < 0,01$ vs. SF, orx; ## $p < 0,01$ vs. prä-Orx

6 Wochen nach Orchidektomie war die Kortikalisfläche in der SF, orx Kontrollgruppe sowie in den Behandlungsgruppen Dihydrotestosteron und Equol nicht signifikant verändert gegenüber den prä-Orx-Werten.

In der Genistein-Behandlungsgruppe war die Kortikalisfläche pro 100g Körpergewicht signifikant größer gegenüber der SF orx Kontrollgruppe.

In der Estradiol-Behandlungsgruppe war die Kortikalisfläche signifikant größer sowohl gegenüber den prä-Orx-Werten als auch gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

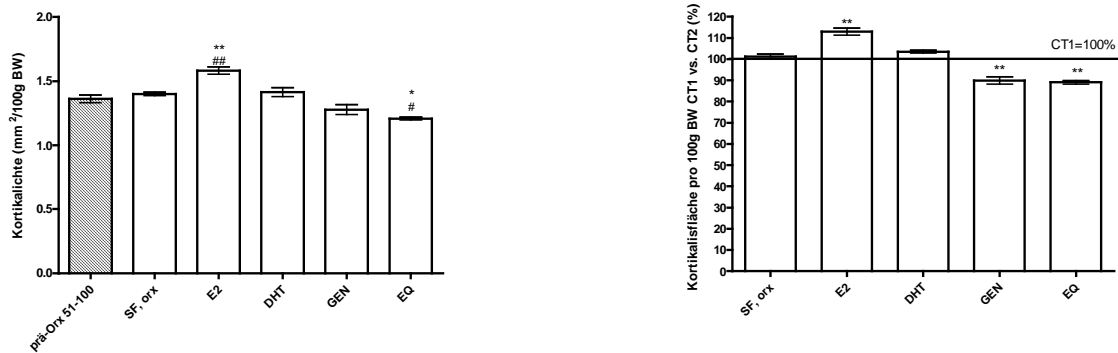


Abb. 22: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf die Kortikalisfläche der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 7 Wochen nach Orchidektomie, nach 3-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ vs. SF, orx; ** $p < 0,01$ vs. SF, orx; # $p < 0,05$ vs. prä-Orx; ## $p < 0,01$ vs. prä-Orx

Auch 7 Wochen nach Orchidektomie war die Kortikalisfläche in der Estradiol-Behandlungsgruppe signifikant größer gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe sowie gegenüber den prä-Orx-Werten. Ebenso war die prozentuale Veränderung der Kortikalisfläche in der Estradiol-Behandlungsgruppe signifikant gegenüber der SF, orx Kontrolle.

In den Behandlungsgruppen Genistein und Equol wurde im Vergleich zur Kontrolle die geringste Kortikalisfläche gemessen.

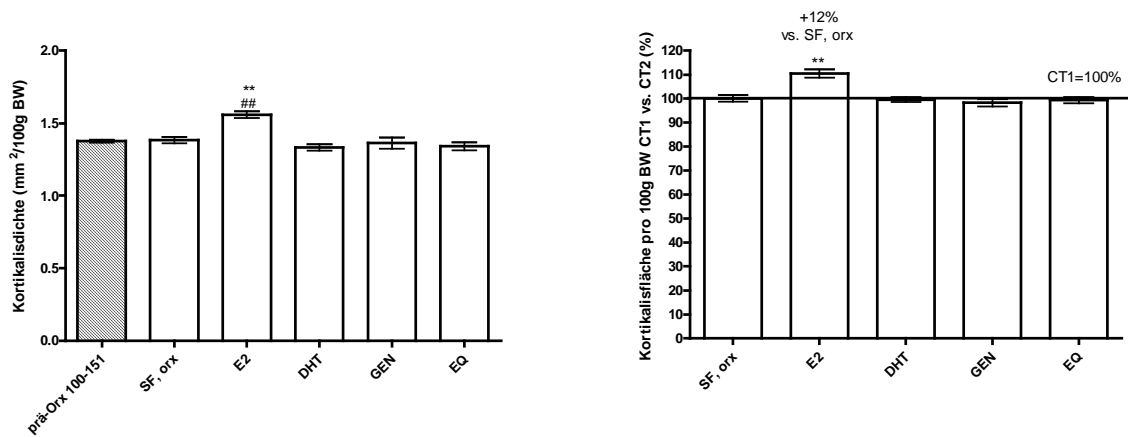


Abb. 23: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf die Kortikalisfläche der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 12 Wochen nach Orchidektomie, nach 8-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: ** p<0,01 vs. SF, orx; ## p<0,01 vs. prä-Orx

12 Wochen nach Orchidektomie wurde die größte Kortikalisfläche in der Estradiol-Behandlungsgruppe gemessen. Diese war um 12% größer gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

3.4.5 Die Veränderung des trabekulären Anteils der Metaphyse der Tibia

Nach Orchidektomie hat der trabekuläre Anteil in allen Behandlungsgruppen signifikant gegenüber den prä-Orx-Tieren abgenommen.

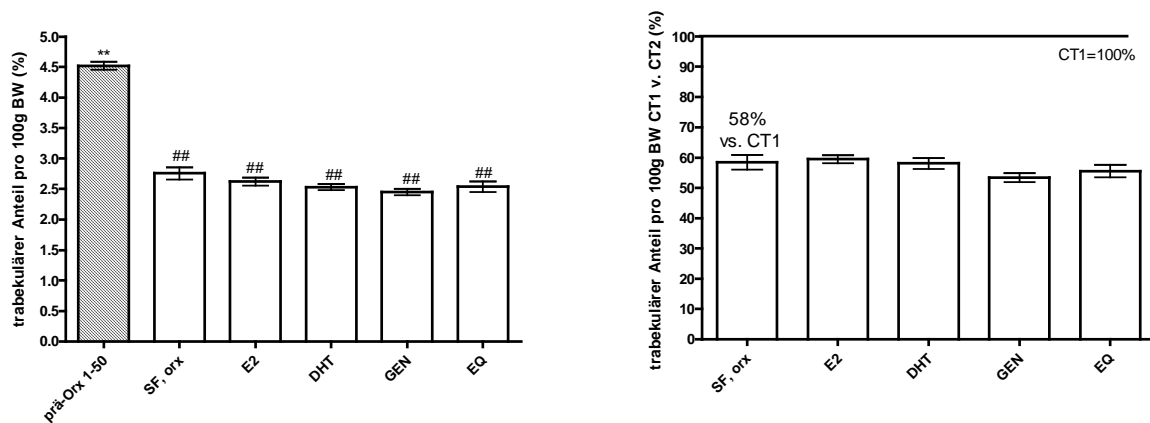


Abb. 24: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf den trabekulären Anteil der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 6 Wochen nach Orchidektomie, nach 2-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$ vs. SF, orx; ## $p < 0,01$ vs. prä-Orx

6 Wochen nach Orchidektomie betrug der trabekuläre Anteil in der SF, orx Kontrollgruppe 58% gegenüber den prä-Orx gemessenen Werten.

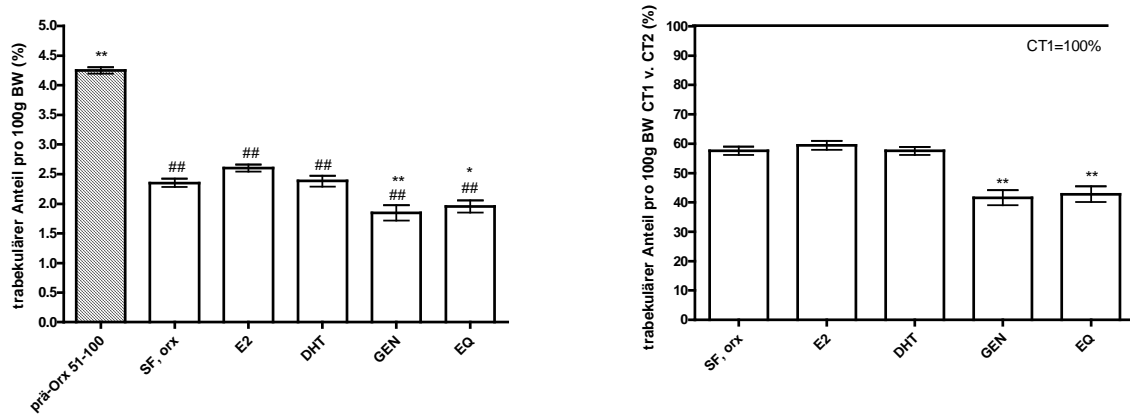


Abb. 25: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf den trabekulären Anteil der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 7 Wochen nach Orchidektomie, nach 3-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ vs. SF, orx; ** $p < 0,01$ vs. SF, orx; ## $p < 0,01$ vs. prä-Orx

7 Wochen nach Orchidektomie war der Verlust des trabekulären Anteils in den Behandlungsgruppen Genistein und Equol signifikant größer gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

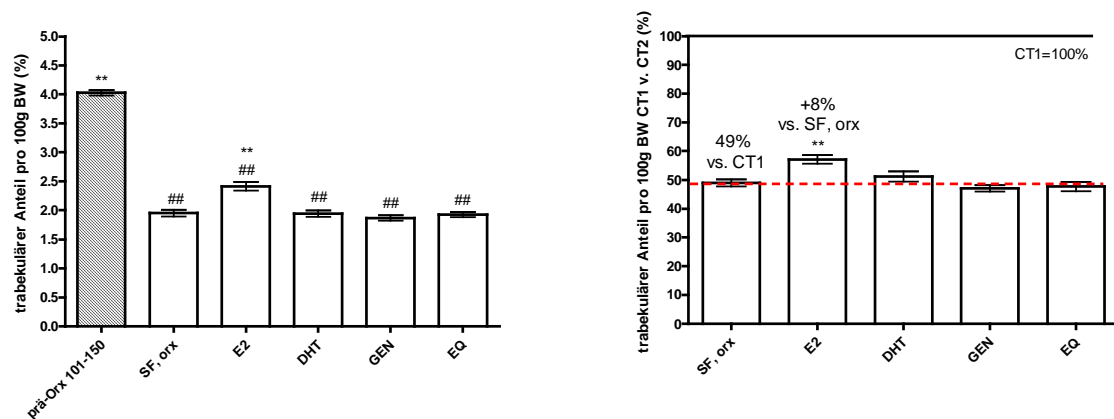


Abb. 26: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf den trabekulären Anteil der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte **12 Wochen nach Orchidektomie, nach 8-wöchiger Substanzapplikation**. Signifikanzniveau: ** p<0,01 vs. SF, orx; ## p<0,01 vs. prä-Orx

12 Wochen nach Orchidektomie betrug der trabekuläre Anteil in der SF, orx Kontrollgruppe 49% gegenüber CT1.

Der trabekuläre Anteil in der Estradiol-Behandlungsgruppe war signifikant um 8% größer und gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

3.4.6 Die Veränderung des Knochenwiderstandes der Metaphyse der Tibia

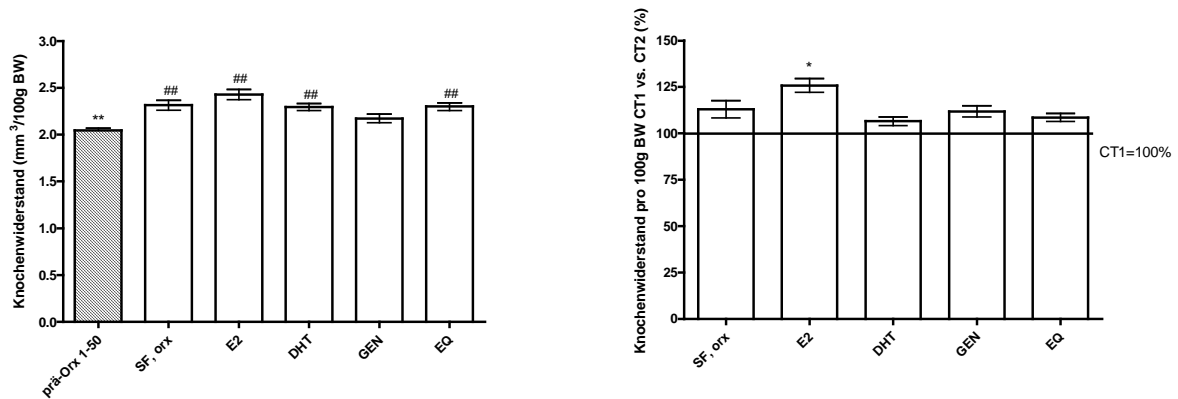


Abb. 27: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf den Knochenwiderstand der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 6 Wochen nach Orchidektomie, nach 2-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ vs. SF, orx; ** $p < 0,01$ vs. SF, orx; ## $p < 0,01$ vs. prä-Orx

6 Wochen nach Orchidektomie hat der Knochenwiderstand pro 100g Körpergewicht in den Behandlungsgruppen Estradiol, Dihydrotestosteron und Equol sowie in der SF, orx Kontrollgruppe signifikant gegenüber den prä-Orx Werten zugenommen. Die prozentuale Zunahme des Knochenwiderstandes war in der Estradiol-Behandlungsgruppe signifikant größer gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

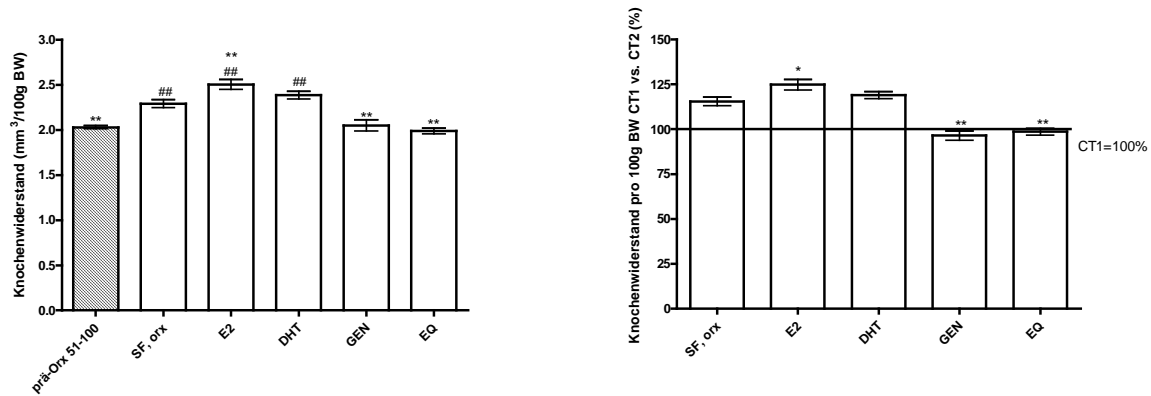


Abb. 28: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf den Knochenwiderstand der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 7 Wochen nach Orchidektomie, nach 3-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ vs. SF, orx; ** $p < 0,01$ vs. SF, orx; ## $p < 0,01$ vs. prä-Orx

7 Wochen nach Orchidektomie war der absolute Knochenwiderstand pro 100g Körpergewicht in den Behandlungsgruppen Estradiol und Dihydrotestosteron sowie in der SF, orx Kontrollgruppe signifikant größer gegenüber den prä-Orx-Werten. Der Knochenwiderstand war in der Estradiol-Behandlungsgruppe signifikant größer gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

In den Behandlungsgruppen Genistein und Equol war der Knochenwiderstand signifikant niedriger gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

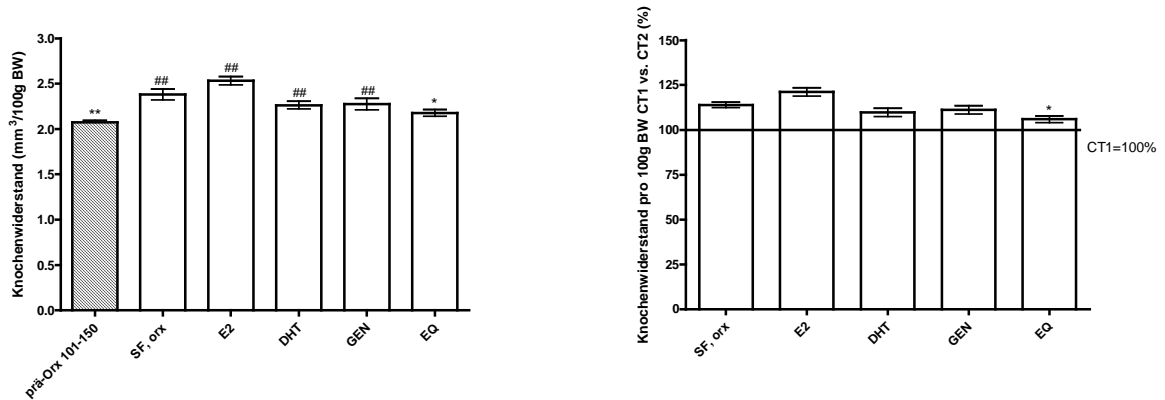


Abb. 29: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf den Knochenwiderstand der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 12 Wochen nach Orchidektomie, nach 8-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ vs. SF, orx; ** $p < 0,01$ vs. SF, orx; ## $p < 0,01$ vs. prä-Orx

12 Wochen nach Orchidektomie war der absolute Knochenwiderstand in den Behandlungsgruppen Estradiol, Dihydrotestosteron und Genistein sowie in der SF, orx Kontrollgruppe signifikant größer gegenüber den prä-Orx-Werten.

Der Knochenwiderstand in der Equol-Behandlungsgruppe war signifikant niedriger gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

3.5 Fett

An dieser Stelle können nur die Ergebnisse der 1. und 3. Obduktion präsentiert werden. Bei der 2. Obduktion war die Messung des paratibialen Fettdepots in einzelnen Behandlungsgruppen nicht möglich, weil das pQCT-Gerät defekt und anschließend in Reparatur war.

Deshalb wurde die Messung am präparierten Knochen durchgeführt, an dem Fett und Muskulatur fehlten.

Die Angabe des paratibialen Fettdepots erfolgt in Prozent (%).

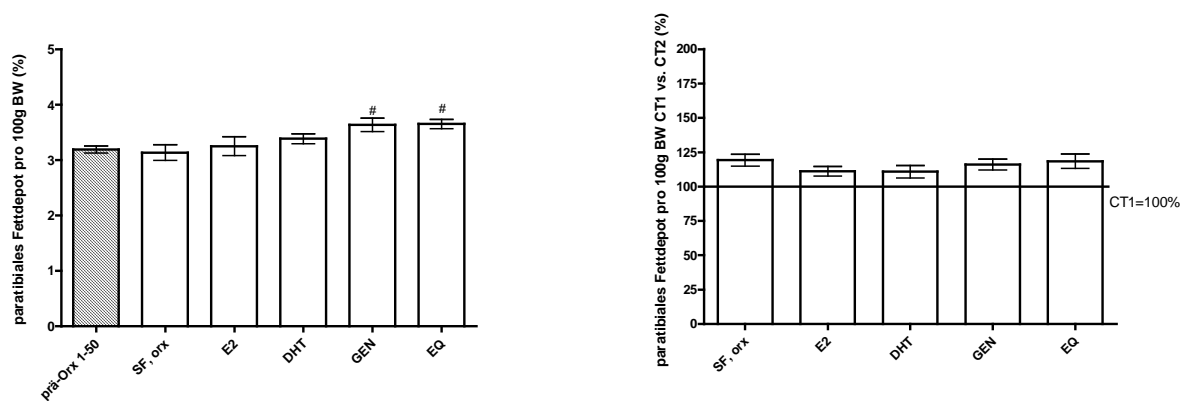


Abb. 30: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf das paratibiale Fettdepot der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte **6 Wochen nach Orchidektomie, nach 2-wöchiger Substanzapplikation**. Signifikanzniveau: # $p < 0,05$ vs. prä-Orx

6 Wochen nach Orchidektomie war der Anteil an paratibialem Fett in den Behandlungsgruppen Genistein und Equol signifikant größer gegenüber den prä-Orx-Werten. In den Behandlungsgruppen Estradiol und Dihydrotestosteron sowie in der SF, orx Kontrollgruppe ist keine signifikante Änderungen gegenüber CT1 aufgetreten.

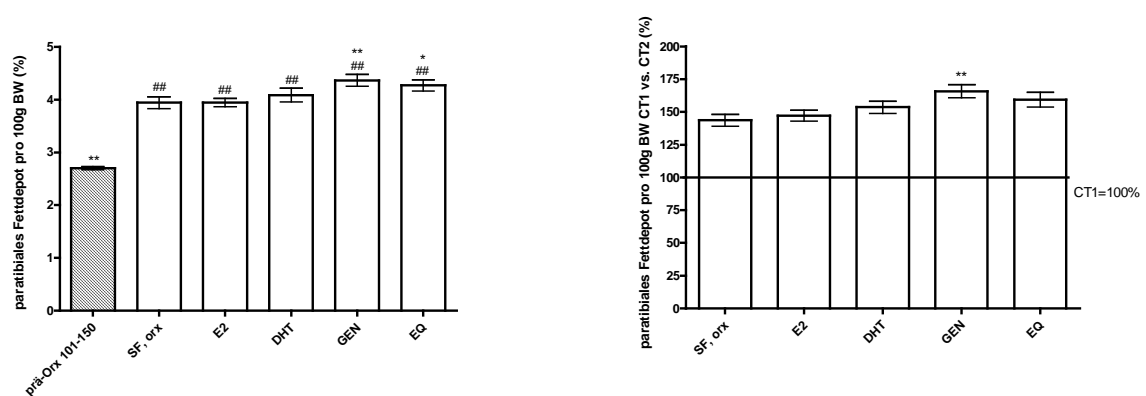


Abb. 31: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf das paratibiale Fettdepot der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 12 Wochen nach Orchidektomie, nach 8-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ vs. SF, orx; ** $p < 0,01$ vs. SF, orx; ## $p < 0,01$ vs. prä-Orx

12 Wochen nach Orchidektomie war die Zunahme des paratibialen Fettdepots in allen Behandlungsgruppen ebenso wie in der SF, orx Kontrollgruppe signifikant größer gegenüber den prä-Orx-Werten. Der größte Anteil an paratibialem Fettdepot wurde in der Genistein-Behandlungsgruppe gemessen.

Im Allgemeinen hat das paratibiale Fettdepot im Verlauf von 1. bis 3. Obduktion zugenommen.

3.6 Muskulatur

An dieser Stelle können nur die Ergebnisse der 1. und 3. Obduktion präsentiert werden. Bei der 2. Obduktion war die Messung des paratibialen Fettdepots in einzelnen Behandlungsgruppen nicht möglich, weil das pQCT-Gerät defekt und anschließend in Reparatur war.

Deshalb wurde die Messung am präparierten Knochen durchgeführt, an dem Fett und Muskulatur fehlten.

Nach Orchidektomie hat die paratibiale Muskelfläche abgenommen.

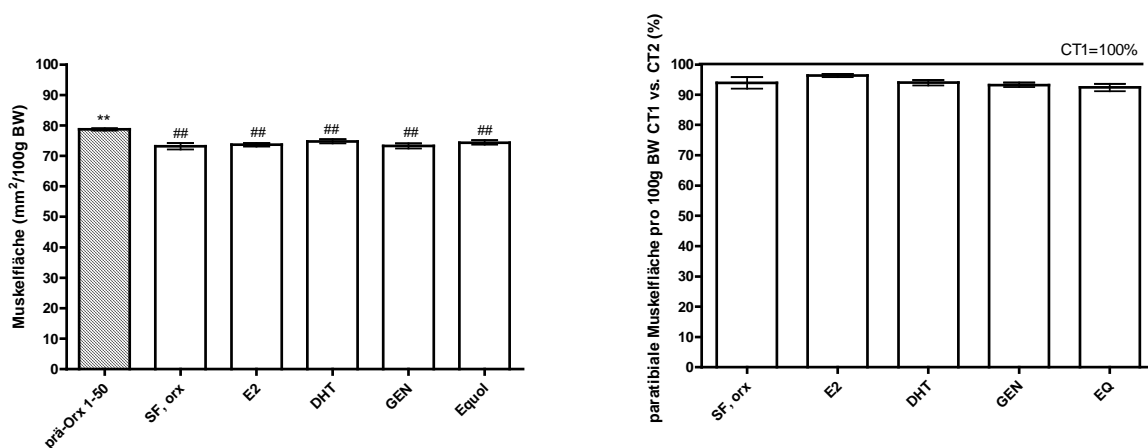


Abb. 32: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf die paratibiale Muskelfläche der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 6 Wochen nach Orchidektomie, nach 2-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$ vs. SF, orx; ## $p < 0,01$ vs. prä-Orx

6 Wochen nach Orchidektomie war die paratibiale Muskelfläche pro 100g Körpergewicht in allen Behandlungsgruppen sowie in der SF, orx Kontrollgruppe signifikant niedriger gegenüber den prä-Orx-Tieren.

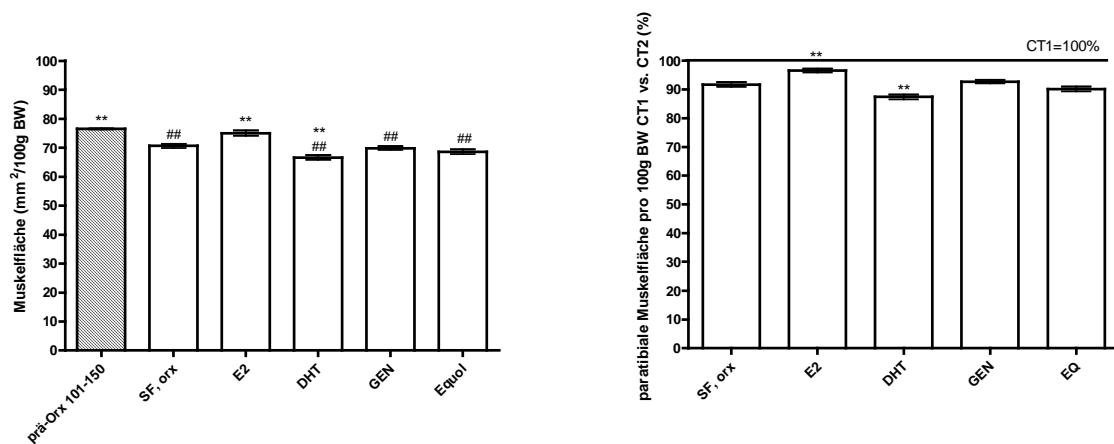


Abb. 33: Die Effekte von E2, DHT, GEN und EQ auf die paratibiale Muskelfläche der Metaphyse der Tibia der orx S.D.-Ratte 12 Wochen nach Orchidektomie, nach 8-wöchiger Substanzapplikation. Signifikanzniveau: ** p<0,01 vs. SF, orx; ## p<0,01 vs. prä-Orx

Auch 12 Wochen nach Orchidektomie war die paratibiale Muskelfläche pro 100g Körpergewicht in den Behandlungsgruppen Dihydrotestosteron, Genistein und Equol sowie in der SF, orx Kontrollgruppe signifikant niedriger gegenüber den prä-Orx-Tieren.

In der Estradiol-Behandlungsgruppe war die paratibiale Muskelfläche signifikant größer gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

In der Dihydrotestosteron-Behandlungsgruppe war die paratibiale Muskelfläche signifikant kleiner gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

4. Diskussion

4.1 Der aktuelle Forschungsstand zum Thema Osteoporose

Ein Schwerpunkt der Forschung hat bisher auf der Suche nach Therapeutika gegen die Osteoporose der Frau gelegen. Dies wurde in dieser Studie zum Anlass genommen, die Substanzen Estradiol, Dihydrotestosteron, Genistein und Equol am Tiermodell der orx S.D.-Ratte als mögliche Therapeutika gegen die Osteoporose des Mannes zu untersuchen.

Die von uns verwendeten Substanzen wurden in der Vergangenheit bereits in vielen Studien zur Osteoporose untersucht (Fanti et al. 1998; Fujioka et al. 2004; Rachon et al. 2007). Da sich ein Großteil der international publizierten Literatur jedoch mit der Wirkung dieser Substanzen auf die Osteoporose der weiblichen Ratte bzw. der Frau beschäftigt, ist ein Vergleich mit den in dieser Studie an männlichen Ratten erhobenen Ergebnissen nur bedingt möglich. Darüber hinaus wurden in anderen Studien die Substanzen oftmals unter präventiven Gesichtspunkten untersucht. Auch aus diesem Grund ist der Vergleich zu der aktuellen Literatur erschwert, aber nicht zuletzt stellt die hier durchgeführte Untersuchung des therapeutischen Effektes von Estradiol, Dihydrotestosteron, Genistein und Equol auf den osteoporotischen Knochen der männlichen S.D.-Ratte das Novum unserer Studie dar.

Der Mangel an gonadalen Steroiden gilt, wie auch bei der postmenopausalen Osteoporose der Frau, als anerkannte Ursache für die senile Osteoporose des Mannes (Greendale et al. 1997). Im Zuge der Pathogenese der Osteoporose ergeben sich hormonell bedingte Veränderungen des Knochens, in deren Fokus die Spongiosa steht. Es ist bekannt, dass in der Postmenopause der Frau bzw. nach Ovariectomie der Ratte eine sog. 'high-turnover'-Osteoporose auftritt, welche durch einen trabekulär-betonten Knochenverlust charakterisiert ist (Hernandez et al. 1996). Auch für die senile Osteoporose des Mannes ist gezeigt worden, dass durch einen Hypogonadismus, d.h. durch einen Wegfall von verfügbaren Geschlechtshormonen im Rahmen des Alterungsprozesses des Mannes bzw. durch die Orchidektomie der Ratte eine 'high-turnover'-Osteoporose auftritt (Erben et al. 2000). Die Serumparameter, deren Analyse auch Teil dieser Studie gewesen ist, spiegeln den erhöhten 'bone turnover' nach Ovariectomie bzw. Orchidektomie wieder.

Die Ursache für diese trabekulär-betonte Manifestation der Osteoporose ist die Tatsache, dass die Spongiosa als stark hormonsensitiv gilt. Besonders für die in dieser Studie untersuchte Metaphyse der Tibia konnte gezeigt werden, dass der dort befindliche trabekuläre Knochen östrogenreguliert ist (Hertrampf et al. 2006; Seidlova-Wuttke et al. 2003). Diese Feststellung hat auch Bedeutung im Rahmen der Pathogenese der Osteoporose und deren Manifestation durch Knochenfrakturen, weil vor allem der trabekuläre Knochen zur Knochenstabilität beiträgt (Seidlová-Wuttke et al. 2006).

4.2 Körpergewicht und Futteraufnahme

Das Körpergewicht und die Futteraufnahme stellen wichtige Parameter unserer Studie dar. Sie sind deshalb von Bedeutung, weil die untersuchten Veränderungen der Metaphyse der Tibia sowie des paratibialen Fettdepots und der paratibialen Muskelfläche stets im Zusammenhang mit diesen Parametern betrachtet werden müssen. Diese Notwendigkeit wird dadurch begründet, dass das Körpergewicht Einfluss auf die Knochenmineraldichte hat und eine Zunahme an Körpergewicht mit einer Zunahme der Knochendichte und -festigkeit einhergeht (Karasik et al. 2003; Rachon et al. 2007; Wronski et al. 1987). Deshalb haben wir unserer Resultate als absolute Werte pro 100g Körpergewicht sowie deren prozentuale Änderung von CT1 gegenüber CT2 dargestellt.

Es soll zunächst das Körpergewicht zu Versuchsbeginn betrachtet werden sowie die Veränderung des Körpergewichtes durch die Orchidektomie und durch die Zufuhr der unterschiedlichen Substanzen.

Zu Versuchsbeginn hatten die Tiere ein durchschnittliches Gewicht von $350\text{g} \pm 40\text{g}$. Nach Orchidektomie haben die Tiere an Körpergewicht gewonnen. Diese Gewichtszunahme ist durch das Wachstum der Tiere und durch die Unterbindung der endogenen Sexualhormonproduktion nach Orchidektomie bedingt (Shimomura et al. 2002). Die Gewichtszunahme in den Behandlungsgruppen Dihydrotestosteron, Genistein und Equol sowie in der SF, orx Kontrollgruppe war in ihrem Verlauf nahezu identisch. Das Gewicht in der Estradiol-Behandlungsgruppe war signifikant niedriger gegenüber der Kontrolle.

Ein Grund für das signifikant niedrigere Körpergewicht der Estradiol-Behandlungsgruppe ist u.a., dass Estradiol die physische Aktivität fördert und den Appetit hemmt (Hertrampf et al. 2007; Rocha et al. 2001). Es soll an dieser Stelle jedoch betont werden, dass die Tiere aus der Estradiol-Gruppe bis zum Ende des Versuches ihr Ausgangsgewicht gehalten haben.

Konträr zu der beschriebenen Estradiol-Wirkung führt Dihydrotestosteron zu einer erhöhten Futteraufnahme (Lobo et al. 1993). Das Körpergewicht der Tiere in der Genistein- und Equol-Behandlungsgruppe war auf einem mit Dihydrotestosteron vergleichbaren Niveau, was daran liegt, dass die Isoflavone bei männlichen Tieren, im Gegensatz zu deren Wirkung bei weiblichen Tieren, die Futteraufnahme nicht reduzieren (Kishida et al. 2008).

Da jedoch auch die SF, orx Kontrollgruppe an Körpergewicht gewonnen hat, muss die Zunahme des Körpergewichtes primär durch das physiologische Wachstum der Tiere und den nach Orchidektomie gesunkenen Testosteronspiegel und bedingt sein (Shimomura et al. 2002).

4.3 Die Veränderung des Knochens nach Orchidektomie

Die männliche, orx S.D.-Ratte konnte in den letzten Jahren als Modell zur Erforschung der Osteoporose des Mannes gefestigt werden (Vanderschueren et al. 1993; Verhas et al. 1986). In unserem Versuch wurde der im Alter auftretende Mangel an Geschlechtshormonen durch die Orchidektomie der S.D.-Ratten künstlich hervorgerufen, um so an unserem Tiermodell eine Osteoporose zu induzieren.

Unsere Ergebnisse belegen, dass die hier durchgeführte Orchidektomie eine Osteoporose im Sinne ihrer Definition bewirkt hat und die Tiere bereits 6 Wochen nach Orchidektomie stark osteoporotisch waren. Dies wird durch den Rückgang der Spongiosadichte deutlich, welche in der SF, orx Kontrollgruppe 6 Wochen nach Orchidektomie nur noch 62% gegenüber den prä-Orx-Tieren betragen hat. Dies entspricht einer Standardabweichung von mehr als -2,5 gegenüber den Vorwerten. Damit handelt es sich per Definition um eine Osteoporose (DVO-Leitlinie 2006).

Aufgrund des nach Orchidektomie aufgetretenen Verlusts an Knochendichte kann die orx S.D.-Ratte durch diesen Versuch erneut als Tiermodell für die Erforschung der Osteoporose bestätigt werden.

4.4 Die Veränderung der Serumparameter

Die Serumparameter Cross-Laps und Osteocalcin geben Auskunft über die Aktivität des Knochenmetabolismus nach Orchidektomie.

Generell tritt nach Orchidektomie eine temporäre Steigerung des 'bone turnovers' ein, d.h. der Knochenstoffwechsel, welcher sich durch die Aktivität von Osteoklasten auf der einen und Osteoblasten auf der anderen Seite auszeichnet, ist durch den Wegfall der gonadalen Steroide nach Orchidektomie erhöht. Dies zeigt sich in unserer Untersuchung daran, dass die Serum-Cross-Laps zunächst hoch waren und im Zeitverlauf von 6 bis 12 Wochen post-Orx abgenommen. Dies beweist, dass der Knochenabbau unmittelbar nach Orchidektomie stark erhöht ist und abnimmt, je länger die Orchidektomie zurückliegt. Diese Verlangsamung des Knochenverlustes je länger die Kastration zurückliegt wurde bereits in der Literatur beschrieben (Waarsing et al. 2006). Da dieser Rückgang der Serum-Cross-Laps unter der Zufuhr von allen untersuchten Substanzen sowie unter der Kontrolle aufgetreten ist, handelt es sich hierbei um ein Substanz-unabhängiges Phänomen. Ebenso wie der Knochenabbau hat auch der Knochenanbau, welcher durch das Serum-Osteocalcin charakterisiert ist, im Verlauf der Untersuchung von 6 bis 12 Wochen post-Orx abgenommen.

Abgesehen von der Veränderung der Serum-Parameter im zeitlichen Verlauf der Untersuchung haben auch spezifische Veränderungen in den verschiedenen Behandlungsgruppen stattgefunden.

Die Serum-Cross-Laps, als Parameter für die Osteoklastenaktivität, konnten durch Estradiol 6 und 7 Wochen nach Orchidektomie und durch Dihydrotestosteron und Genistein 6 Wochen nach Orchidektomie signifikant gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe supprimiert werden. Gleichzeitig wurde jedoch auch die Osteoblastenaktivität, widergespiegelt durch das Osteocalcin, durch Estradiol zu jedem Zeitpunkt nach Orchidektomie und durch Dihydrotestosteron und Genistein 7 Wochen nach Orchidektomie signifikant gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe reduziert. Somit hat besonders Estradiol den nach Orchidektomie erhöhten 'bone-turnover' über eine Hemmung sowohl der Osteoklasten als auch der Osteoblasten reduziert. Diese Verlangsamung sowohl des Knochenabbaus als auch des Knochenanbaus unter Estradiol-Applikation wurde bereits in vorherigen Studien beschrieben (Tivesten et al. 2004).

Estradiol kann somit als Inhibitor des Knochenumbaus beim alternden Mann betrachtet werden, dessen Wegfall die Entstehung der Osteoporose induziert (Erben et al. 2000).

In unserem Versuch hat Estradiol nach Orchidektomie die Osteoblastenaktivität stärker inhibiert als die Osteoklastenaktivität, so dass zunächst unter Estradiol-Substitution im Vergleich zur SF, orx Kontrollgruppe weniger Knochen konserviert wurde. Diese temporäre Erhöhung des Knochenabbaus nach Orchidektomie unter Estradiol erklärt auch, warum in dieser Behandlungsgruppe erst nach 8-wöchiger Substanzapplikation eine signifikant höhere Spongiosadichte gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe erreicht wurde.

Auch unter Dihydrotestosteron war eine Suppression des 'bone-turnovers' nach Orchidektomie zu beobachten, allerdings war diese Wirkung auf die Serum-Cross-Laps, also den Knochenabbau, nur 6 Wochen nach Orchidektomie signifikant gegenüber der Kontrolle, wohingegen unter Estradiol zu jedem Untersuchungszeitpunkt eine signifikante Hemmung der Serum-Cross-Laps gegenüber Kontrolle erzielt werden konnte. Im Vergleich zu Dihydrotestosteron hat Estradiol also eine stärkere Reduzierung des Knochenabbaus bei den orx S.D.-Ratten erzielt. Gleichzeitig war jedoch unter der Behandlung mit Estradiol das Level von Osteocalcin im Serum im Vergleich zu der Dihydrotestosteron-Behandlungsgruppe erniedrigt. Es muss also konstatiert werden, dass Estradiol eine stärkere Inhibition auf den nach Orchidektomie erhöhten 'bone-turnover' ausübt als Dihydrotestosteron.

Unter der Zufuhr von Genistein konnten 6 Wochen post-Orx die Serum-Cross-Laps signifikant gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe reduziert werden. Dies bestätigt die Annahme, dass Genistein die Osteoklastenaktivität hemmt (Gao und Yamaguchi 1999). Allerdings war diese Wirkung von Genistein in unserer Untersuchung geringer als der Effekt der gonadalen Steroide Estradiol und Dihydrotestosteron auf den nach Orchidektomie erhöhten Knochenabbau. Auf der anderen Seite hat unter der Substitution von Genistein im Vergleich zu den gonadalen Steroiden Estradiol und Dihydrotestosteron eine weniger starke Reduzierung des Serum-Osteocalcins stattgefunden. Diese Tatsache zeigt, dass das Isoflavon Genistein seine knochenprotektiven Eigenschaften, im Gegensatz zu Estradiol, nicht über eine Inhibition der Knochenresorption ausübt, sondern eher über eine Stimulation des Knochenaufbaus (Fanti et al. 1998).

In der Equol-Behandlungsgruppe konnte gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe keine signifikante Änderung der Serumparameter Cross-Laps und Osteocalcin gemessen werden. Equol hat also im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Einfluss auf den nach Orchidektomie erhöhten Knochenstoffwechsel gehabt. Damit gehen unsere Ergebnisse konform mit Untersuchungen an ovx Tieren, die ebenso keine signifikante Wirkung von Equol gegenüber SF-Futter auf die Serumparameter zeigten konnten (Rachon et al. 2007).

4.5 Die therapeutischen Effekte der untersuchten Substanzen auf den osteoporotischen Knochen

Im Mittelpunkt dieser Studie stand die Untersuchung der strukturellen Veränderungen des Knochens mittels pQCT in Abhängigkeit der getesteten Substanzen Estradiol, Dihydrotestosteron, Genistein und Equol. Dafür wurde ein therapeutischer Versuchsansatz gewählt d.h., dass die untersuchten Substanzen erst nach Entwicklung einer Osteoporose, in diesem Falle ab einem Zeitpunkt vier Wochen nach Orchidektomie, eingesetzt wurden (Roudebush et al. 1993). Damit ist beurteilbar, welche therapeutische Wirkung die untersuchten Substanzen auf den osteoporotischen Knochen haben. Bei der Betrachtung der therapeutischen Wirksamkeit der untersuchten Substanzen ist jedoch zu beachten, dass unsere Messergebnisse kein Heilungsergebnis darstellen. Es handelt sich bei den Ergebnissen für die pQCT-Messung des Knochens vielmehr um einen Auszug aus dem dynamischen Prozess der Knochenveränderung durch die untersuchten Substanzen, die der aktuellen Knochendichte unter dem Einfluss der laufenden Osteoporose-Therapie entsprechen.

Für die hier untersuchten gonadalen Steroide Estradiol und Dihydrotestosteron wurde bereits eine prophylaktische Wirkung gegen die Entstehung einer Osteoporose nach Kastration bewiesen (Vandenput et al. 2002). Eine Untersuchung der therapeutischen Wirkung, d.h. die Wirkung an einem schon stark osteoporotischen Knochen, ist sowohl für die gonadalen Steroide Estradiol und Dihydrotestosteron als auch für die Isoflavone Genistein und Equol an männlichen Tieren bisher nicht erfolgt.

4.5.1 Die therapeutischen Effekte der gonadalen Steroide auf den osteoporotischen Knochen

In unserer Untersuchung wurde die therapeutische Wirkung der gonadalen Steroide Estradiol und Dihydrotestosteron auf den post-Orx stark osteoporotisch gewordenen Knochen der S.D.-Ratte untersucht und deren Wirkung soll im Vergleich zueinander bewertet werden. Dabei muss beachtet werden, dass in diesem Versuch Estradiol, das wirksamste Östrogen, und Dihydrotestosteron, ein potentes Androgen, welches nicht der Aromatase zugänglich ist, vergleichend untersucht wurden. In diesem Punkt unterscheidet sich diese Studie von vielen anderen Untersuchungen, in denen T verabreicht wurde. T kann, im Gegensatz zu Dihydrotestosteron, über die Aromatase zu Östrogenen umgewandelt werden, um dann am ER zu wirken. Demnach ermöglicht unsere Studie, eine Aussage über die Bedeutung der Östrogen-Wirkung am ER bzw. der Androgen-Wirkung am AR auf den osteoporotischen Knochen der orx S.D.-Ratte zu treffen.

Die therapeutischen Effekte von Estradiol auf den osteoporotischen Knochen:

Der Estradiol-Mangel stellt den entscheidenden Faktor für die Pathogenese der Altersosteoporose des Mannes dar (Riggs et al. 2002). Darüber hinaus konnte in einem Versuch von Vandenput et al. an orx Ratten gezeigt werden, dass dem Orchidektomie-induzierten Knochenverlust durch Estradiol besser als durch Dihydrotestosteron vorgebeugt werden konnte (Vandenput et al. 2002). Auch die vorliegende Studie, welche nicht die präventive, sondern die therapeutische Wirkung von Estradiol auf den osteoporotischen Knochen an orx Ratten untersucht hat, konnte eine positive Wirkung von Estradiol auf den osteoporotischen Knochen bestätigen: so wurde nach 8-wöchiger Applikation unter Estradiol die größte Spongiosadichte pro 100g Körpergewicht gemessen und diese war mit +8% signifikant größer gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

Ebenso waren die Spongiosafläche und der trabekuläre Anteil nach 8-wöchiger Estradiol-Substitution signifikant um 8% größer gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe. Die Wirkung von Estradiol auf Kortikalisdichte und -fläche war zu jedem Zeitpunkt nach Orchidektomie signifikant besser gegenüber der SF, orx

Kontrollgruppe. Auch der Knochenwiderstand war nach 8-wöchiger Applikation von Estradiol signifikant größer gegenüber der Kontrolle. Der Knochenwiderstand, der sich als sog. Stress-Strain-Index aus dem pQCT berechnen lässt, ist von der Kortikalis abhängig (Engelke 2002), deren Verlust nach Orchidektomie in diesem Versuch unter Estradiol am stärksten vorgebeugt werden konnte. Estradiol hat also in diesem Versuch sowohl eine Stärkung des Knochenwiderstandes als auch durch eine Verbesserung der trabekulären Knochenstruktur am osteoporotischen Knochen erzielt. Durch die hier nachgewiesene Wirkung von Estradiol auf den trabekulären Knochen wird der Estradiol-Mangel als entscheidender Faktor für die Pathogenese der Osteoporose des Mannes bestätigt (Riggs et al. 2002; Vandenput et al. 2002).

Zusammenfassend hat Estradiol in dieser Studie eine deutliche Hemmung des bei Osteoporose erhöhten Knochenstoffwechsels bewirkt, was anhand der Serumparameter gezeigt wurde. Auch wenn die Estradiol-Wirkung auf den osteoporotischen Knochen im Vergleich zu den anderen Substanzen am besten gewesen ist, war der Einfluss von Estradiol auf die Knochenstruktur unter therapeutischen Gesichtspunkten betrachtet nicht ausreichend. Die Struktur des osteoporotischen Knochens konnte zwar unter Estradiol gestärkt werden, jedoch konnte besonders der nach Orchidektomie eingetretene massive Verlust an spongiosen Knochen durch Estradiol nicht rückgängig gemacht werden.

Die therapeutischen Effekte von Dihydrotestosteron auf den osteoporotischen Knochen:

Nach Orchidektomie konnte unter der Substitution von Dihydrotestosteron keine signifikante Verbesserung der Spongiosadichte und -fläche sowie des trabekulären Anteils im Vergleich zur SF, orx Kontrollgruppe erreicht werden. Ebenso waren für die Kortikalis-Parameter und den Knochenwiderstand keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle feststellbar. Die Analyse der Serumparameter hat gezeigt, dass Dihydrotestosteron zwar den nach Orchidektomie erhöhten Knochenmetabolismus reduziert hat, wenn auch weniger stark als Estradiol. Allerdings konnte durch Dihydrotestosteron keine Verbesserung der Knochenstruktur im Sinne einer Therapie der Osteoporose erzielt werden.

Der Vergleich der therapeutischen Effekte von Estradiol gegenüber Dihydrotestosteron auf den osteoporotischen Knochen:

In unserer Untersuchung wurde gezeigt, dass Estradiol den nach Orchidektomie erhöhten Knochenstoffwechsel sowie die Knochenstruktur des osteoporotischen Knochens der orx S.D.-Ratte positiv moduliert. Besonders die Wirkung von Estradiol auf die Spongiosadichte, welche maßgeblich zur Knochenstabilität beiträgt, war deutlich besser als die Wirkung von Dihydrotestosteron auf ebenjene Knochenstruktur (Seidlová-Wuttke et al. 2006).

Die Tatsache, dass der trabekuläre Knochen auf die Estradiol-Substitution besser anspricht als auf die Substitution von Dihydrotestosteron, zeigt, dass der Estradiol-Mangel der entscheidende Punkt in der Pathogenese der altersbedingten, hypogonadalen Osteoporose des Mannes ist (Vandenput et al. 2002). Demnach wird Testosteron im männlichen Organismus hauptsächlich über die Aromatase enzymatisch zu Estradiol verändert, um dann über den ER am Knochen zu wirken. Damit gehen die in dieser Studie erhobenen Ergebnisse mit der gängigen wissenschaftlichen Meinung einher, dass zwar sowohl Dihydrotestosteron - als auch Estradiol-Mangel in der Pathogenese der Altersosteoporose eine Rolle spielen, aber die sinkende Bioverfügbarkeit von Estradiol determinierend für den im Alter auftretenden Knochenverlust ist (Riggs et al. 2002).

Auch wenn die Veränderungen von paratibialem Fettgewebe und paratibialer Muskelfläche bis hierhin noch nicht diskutiert worden sind, kann nichtsdestoweniger schon an dieser Stelle konstatiert werden, dass, obwohl Estradiol einen positiven Effekt auf den osteoporotischen Knochen gezeigt hat, in dieser Studie dennoch keine adäquate therapeutische Wirksamkeit der gonadalen Steroide auf den osteoporotischen Knochen der orx S.D.-Ratte nachgewiesen werden konnte, denn die Spongiosadichte als maßgeblicher Faktor für die Osteoporose konnte nicht annähernd auf das Niveau prä-Orx wiederhergestellt werden.

So lag nach 8-wöchiger Applikation von Estradiol die Spongiosadichte in dieser Behandlungsgruppe bei 59% gegenüber den in CT1 gemessenen Werten für die prä-Orx-Tiere, was per Definition eindeutig einer Osteoporose entspricht (DVO-Leitlinie 2006). Darüber hinaus war der Knochenverlust nach Therapiebeginn fortschreitend. Dies entspricht einer Progredienz der Osteoporose unter den von uns untersuchten Substanzen.

Zwar war das Fortschreiten des Knochenverlustes verlangsamt je weiter die Orchidektomie zurückliegt, allerdings steht dies am ehesten im zeitlichen Zusammenhang zur Orchidektomie und ist unabhängig von der Wirkung der untersuchten Substanzen.

Somit kann schon an dieser Stelle der Schluss gezogen werden, dass die Substitution der gonadalen Steroide, deren mangelnde Bioverfügbarkeit als Ursache der Osteoporose bewiesen ist, aufgrund ihrer zu geringen Wirksamkeit auf den Knochen als mögliche Therapie der Osteoporose beim Mann abgelehnt werden muss. Die Untersuchung zeigt darüber hinaus, dass eine einmal eingetretene Osteoporose durch die Applikation der gonadalen Steroide nicht mehr rückgängig gemacht werden kann, weswegen die Prävention der Osteoporose zunehmende Bedeutung erlangt.

4.5.2 Die therapeutischen Effekte der Phytohormone auf den osteoporotischen Knochen

In dieser Studie wurde die therapeutische Wirksamkeit der Phytohormone Genistein und Equol auf den osteoporotischen Knochen der männlichen S.D.-Ratte im Vergleich zu den gonadalen Steroiden untersucht.

Bei der Diskussion der Wirkung der Phytohormone Genistein und Equol muss beachtet werden, dass zum Messzeitpunkt 7 Wochen nach Orchidektomie ein Geräte-Defekt aufgetreten ist. Davon waren ausschließlich die Behandlungsgruppen Genistein und Equol betroffen. Deshalb erfolgte für diese beiden Gruppen die Ermittlung der Knochenwerte am präparierten Knochen und nicht wie bei allen anderen Messungen in vivo am Ratten-Hinterlauf.

Die therapeutischen Effekte von Genistein auf den osteoporotischen Knochen:

Genistein hat in diesem Versuch im Vergleich zur SF, orx Kontrolle nach 2 bzw. 3-wöchiger Applikation der Substanz einen signifikant schlechteren Effekt auf die Spongiosadichte gezeigt.

Ebenso wurden in der Genistein-Behandlungsgruppe die Kortikalisfläche nach 2- und 3-wöchiger Behandlung und der trabekuläre Anteil sowie der Knochenwiderstand nach 3-wöchiger Substitution von Genistein im Vergleich zur SF, orx Kontrollgruppe niedriger gemessen. Signifikante Effekte von Genistein auf die Spongiosafläche und die Kortikalisdichte waren nicht messbar. Demnach konnte für Genistein in dieser Untersuchung kein therapeutischer Effekt auf den osteoporotischen Knochen der orx S.D.-Ratte nachgewiesen werden.

Ein Vergleich der hier beobachteten Wirkung von Genistein mit der Literatur ist nur schwer möglich, da Genistein zumeist unter präventiven Gesichtspunkten untersucht wurde. So konnten Wu et al. in einem Versuch zur präventiven Wirkung von Genistein an der orx Maus feststellen, dass unter s.c. Applikation von Genistein die Reduktion der Knochenmineraldichte in der Messung mittels DXA nach Orchidektomie signifikant inhibiert werden konnte (Wu et al. 2003). In der Messung mittels pQCT konnte nach Orchidektomie jedoch keine Wirkung von Genistein auf die Knochenmineraldichte und den Knochenmineralgehalt nachgewiesen werden. In einer anderen Studie von Ishimi et al. wurde eine Prävention des Knochenschwundes nach Orchidektomie durch Genistein in der histomorphometrischen Analyse des Knochens beschrieben, allerdings konnte unter Genistein die Knochenmineraldichte in der Analyse mittels DXA nur als moderat erhalten gemessen werden (Ishimi et al. 2002).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Untersuchungen in der Vergangenheit zwar einen moderaten Effekt von Genistein zur Prävention der Osteoporose gezeigt haben, aber dass in dieser Studie der erhöhte Knochenstoffwechsel unter Genistein nur mäßig inhibiert werden konnte und dass ein therapeutischer Nutzen von Genistein auf die Knochenstruktur des osteoporotischen Knochen der orx S.D.-Ratte nicht bestätigt werden konnte.

Die therapeutischen Effekte von Equol auf den osteoporotischen Knochen:

Unter der Behandlung mit Equol konnte im Vergleich zur SF, orx Kontrollgruppe und zu den gonadalen Steroiden kein positiver therapeutischer Effekt dieser Substanz auf den osteoporotischen Knochen der orx S.D.-Ratte festgestellt werden.

Die Wirkung von Equol auf die Spongiosadichte war nach 2 und 3-wöchiger Applikation signifikant schlechter gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe.

Für die übrigen hier untersuchten Knochenparameter konnte unter der Substitution mit Equol ebenfalls keine signifikante Wirkung oder nur eine signifikant schlechtere Wirkung gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Diese Ergebnisse gehen einher mit den Resultaten von Rachon et al., die in einer Untersuchung an der ovx Ratte ebenso keine positive Wirkung von Equol auf Spongiosa und Kortikalis der Tibia nachweisen konnten (Rachon et al. 2007).

Zusammenfassend kann daher gesagt werden, dass Equol weder einen positiven Effekt auf den nach Orchidektomie erhöhten Knochenmetabolismus noch auf die Struktur des stark osteoporotischen Knochens der orx S.D.-Ratte gezeigt hat. Damit muss die therapeutische Wirkung von Equol auf den osteoporotischen Knochen zunächst verneint werden.

Die Effekte der Phytohormone auf den osteoporotischen Knochen der orchidektomierten S.D.-Ratte im Vergleich zum ovariectomierten Rattenmodell:

Für den Vergleich der Wirkung von Phytoöstrogenen am männlichen gegenüber dem weiblichen Knochen liegen nur wenige Studien an männlichen Ratten vor. In einer Untersuchung an orx Ratten konnte ein moderater präventiver Effekt von Isoflavonen auf den Knochen der orx Ratte gezeigt werden (Khalil et al. 2005). Da in dieser Untersuchung von Khalil et al. die Isoflavone unmittelbar nach Orchidektomie, d.h. präventiv, appliziert wurden, besteht ein wesentlicher Unterschied zu der hier vorliegenden Studie, welche die therapeutische Wirkung der Isoflavone an einem stark osteoporotischen Knochen untersucht hat. In einer anderen Studie mit einem ebenfalls präventiven Versuchsansatz konnte zwar eine Verbesserung der Mikroarchitektur durch Isoflavone beschrieben werden, allerdings waren in dieser Studie die Isoflavone nicht in der Lage, den Orchidektomie-induzierten Knochenverlust zu verhindern (Soung et al. 2006). Dieses Ergebnis geht einher mit unserer Beobachtung, dass Isoflavone nicht in der Lage sind, den Knochenverlust nach Orchidektomie zu inhibieren bzw. ihn in therapeutischem Sinne zu beeinflussen.

An weiblichen Tieren konnte eine präventive Wirkung der Phytoöstrogene nachgewiesen werden: So beschreiben Arjmandi et al., dass Isoflavone bei weiblichen Ratten den Ovx-induzierten Knochenverlust hemmen (Arjmandi et al. 1998). Weitere Studien am Tiermodell der ovx Ratte bestätigen die Prävention der Osteoporose durch Genistein und Equol (Fanti et al. 1998; Fujioka et al. 2004).

Eine weitere Studie von Devareddy et al. hat die therapeutische Wirkung von Isoflavonen als Bestandteil von Sojahaltigem Futter untersucht und festgestellt, dass durch Applikation von Soja der nach Ovx entstandene Rückgang der Knochenmineraldichte nicht mehr auf das Niveau prä-Ovx zurückgeführt werden kann (Devareddy et al. 2006). Am Tiermodell konnte die therapeutische Wirkung von Soja also nicht bestätigt werden.

In einer Untersuchung an postmenopausalen Frauen, in der Isoflavone über ein Jahr getestet wurden, konnte weder ein Effekt auf die Knochenmineraldichte des Oberschenkelknochens noch auf die Veränderung der Serumparameter festgestellt werden (Atkinson et al. 2004).

Diese oben genannten Studienergebnisse zeigen, dass die Phytoöstrogene in einem präventiven Versuchsansatz am ovx Tiermodell zwar einen positiven Effekt auf den Knochen gezeigt haben, sie jedoch nicht in der Lage sind, therapeutisch auf den osteoporotischen Knochen der ovx Ratte und der postmenopausalen Frau zu wirken. Auch in der hier vorliegenden Studie konnte kein therapeutischer Effekt der Phytoöstrogene auf den osteoporotischen Knochen der männlichen S.D.-Ratte beobachtet werden.

Die therapeutischen Effekte der Phytohormone auf den osteoporotischen Knochen im Vergleich zu den gonadalen Steroiden:

Aufgrund der in dieser Untersuchung erhobenen Ergebnisse muss festgestellt werden, dass die Phytoöstrogene keinen therapeutischen Effekt auf den osteoporotischen Knochen der männlichen S.D.-Ratte gehabt haben.

Die Osteoporose war unter Applikation der Substanzen progredient und die Wirkung der Phytoöstrogene Genistein und Equol auf den Knochen war im Allgemeinen schlechter gegenüber den als Positivkontrolle geltenden gonadalen Steroiden Dihydrotestosteron und Estradiol, obwohl bereits für diese Substanzen die

therapeutische Wirksamkeit auf den osteoporotischen Knochen nicht ausreichend war. Daher gilt auch für die Phytoöstrogene, dass sie in dieser Untersuchung keine adäquate Therapie der Osteoporose dargestellt haben. Damit wird die Wichtigkeit Prävention der Osteoporose erneut untermauert.

4.6 Die Veränderung des paratibialen Fettdepots

Neben der Untersuchung des Knochens wurde mittels des pQCT auch ein paratibiales Fettdepot der Ratte vermessen, um Aussagen über die Steroidmangelbedingte Veränderung des Fettdepots treffen zu können und um den Effekt der untersuchten Substanzen auf das Fettgewebe analysieren zu können.

In unserem Versuch haben die Tiere über einen Zeitraum von 12 Wochen, bedingt durch den Wegfall an Geschlechtshormonen nach Orchidektomie, signifikant an paratibialem Fettdepot hinzugewonnen. Dieser Gewinn an Fettgewebe war progredient, d.h. je länger die Orchidektomie zurückliegt, desto größer war das gemessene paratibiale Fettdepot.

Das paratibiale Fettdepot pro 100g Körpergewicht war in der Estradiol-Behandlungsgruppe nicht signifikant niedriger gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe, obwohl für Estradiol eine antiadipöse Eigenschaft beschrieben ist. Dieses Ergebnis für Estradiol an männlichen Tieren ist gegensätzlich zu den bereits durchgeführten Studien an weiblichen Tieren, bei welchen Estradiol eine Zunahme des Fettdepots nach Kastration gehemmt hat (Rachon et al. 2007).

Die Zufuhr von Genistein und Equol hat im Vergleich zu den anderen Substanzen die stärkste Zunahme des paratibialen Fettdepots bewirkt. Damit steht diese Beobachtung im Gegensatz zu den Ergebnissen von Untersuchungen an weiblichen Tieren, in welchen für Equol eine mit Estradiol vergleichbare Reduktion des Fettgewebes sowie des Gesamtkörpergewichtes nach Ovx festgestellt wurde (Rachon et al. 2007). Diese hier an männlichen Tieren unter der Zufuhr von Genistein bzw. Equol beobachtete Zunahme des Fettdepots ist insofern erstaunlich, als dass über diese Substanzen bekannt, dass sie östrogen-artige Wirkung besitzen und in einer Untersuchung an Ovx-Ratten einer Zunahme des Körperfettes entgegen gewirkt haben (Uesugi et al. 2001).

Ein möglicher Grund für die hier festgestellt starke Zunahme des paratibialen Fettdepots ist, dass Isoflavone bei männlichen Tieren, im Gegensatz zu weiblichen Tieren, die Futteraufnahme nicht reduzieren und man annimmt, dass dieser Effekt der Isoflavone nicht durch ihre östrogenartige Wirkung bedingt ist (Kishida et al. 2008).

4.7 Die Veränderung der paratibialen Muskelfläche

Eine Abnahme von Muskelmasse und -festigkeit und eine u.a. dadurch bedingte zunehmende Immobilisation im Rahmen des Alterungsprozesses stellen nicht zu vernachlässigende Risikofaktoren bezüglich der Pathogenese der Osteoporose dar.

Erstens wird durch eine Abnahme der Muskelmasse die Prädisposition zu Stürzen mit der Konsequenz einer Knochenfraktur beim gleichzeitigen Vorliegen einer Osteoporose erhöht, zweitens fällt die positive Modulation des Knochens durch den Muskel weg. Die Bedeutung der Knochenmodulation durch die Muskulatur im Rahmen der Pathogenese der Osteoporose wird durch die Untersuchung von Blouin et al. deutlich, die zeigen konnten, dass nach Orchidektomie und gleichzeitiger Paralyse der Oberschenkelmuskulatur durch Botulinumtoxin eine stärkerer Knochenverlust ausgelöst werden konnte als durch alleinige Orchidektomie (Blouin et al. 2007). Dies ist darauf zurückzuführen, dass der funktionierende Muskel ein 'Remodelling' des Knochens induziert, welches die Knochendichte und -festigkeit sowie die Mikroarchitektur des Knochens günstig beeinflusst (Crepaldi et al. 2007).

Diese eben dargelegte Bedeutung der Muskulatur für die Pathogenese der Osteoporose macht deutlich, dass bei der Interpretation der Wirksamkeit der in dieser Studie untersuchten Substanzen nicht nur die Effekte auf die Knochenparameter analysiert werden müssen, sondern dass auch die Effekte auf das Muskelgewebe betrachtet werden müssen, um schließlich eine Aussage über die gesamte muskulo-skelettale Einheit treffen zu können.

In unserer Studie hat 6 Wochen nach Orchidektomie die paratibiale Muskelfläche pro 100g Körpergewicht, verursacht durch den Wegfall von Geschlechtshormonen, in allen Behandlungsgruppen signifikant gegenüber den prä-Orx-Tieren abgenommen.

12 Wochen nach Orchidektomie wurde die paratibiale Muskelfläche pro 100g Körpergewicht in den Behandlungsgruppen Dihydrotestosteron, Genistein und Equol sowie in der SF, orx Kontrollgruppe signifikant niedriger gegenüber den prä-Orx-Tieren gemessen. Die paratibiale Muskelfläche pro 100g Körpergewicht in der Estradiol-Behandlungsgruppe war signifikant größer gegenüber der SF, orx Kontrollgruppe und in der Dihydrotestosteron-Behandlungsgruppe war sie signifikant niedriger gegenüber der Kontrolle. Estradiol hat also nach 6-wöchiger Zufuhr über das Futter der Abnahme der paratibialen Muskelfläche nach Orchidektomie am besten vorgebeugt. Unter Dihydrotestosteron war dies nicht zu beobachten, obwohl in der Literatur eine stärkere Zunahme der Muskulatur unter der Substitution von Androgenen (Bhasin et al. 1997; Moreau et al. 2001) beschrieben wird. Ein stimulierender Effekt auf die paratibiale Muskelfläche im Sinne einer Wiederherstellung auf das Niveau vor Orchidektomie konnte für keine der untersuchten Substanzen beobachtet werden.

Nachdem die in dieser Studie untersuchten Parameter für Knochenstoffwechsel und Knochenstruktur sowie paratibiales Fettdepot und paratibiale Muskelfläche oben diskutiert wurden, sollen abschließend unsere Ergebnisse zusammengefasst werden und eine Schlussfolgerung gezogen werden.

Davor jedoch soll an dieser Stelle als Verbesserungsvorschlag für nachfolgende Versuche erwähnt werden, dass eine Durchführung von drei CT-Messungen sinnvoll wäre: nämlich ein CT1 prä-Orx, ein CT2 post-Orx, jedoch vor dem Futterwechsel, und ein CT3 vor der jeweiligen Obduktion. Damit könnte besser zwischen den Effekten durch die Orchidektomie und den Effekten durch die Applikation der untersuchten Substanzen unterschieden werden.

Darüber hinaus wäre es interessant, die therapeutische Wirkung der Substanzen über einen längeren Zeitraum post-Orx zu untersuchen. Eventuell würde eine derartige Studie andere Ergebnisse liefern, weil die Substanzen eine längere Applikationsdauer benötigen, um die Knochenstruktur nachhaltig zu verändern.

5. Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Studie wurden die therapeutischen Effekte von Estradiol, Dihydrotestosteron, Genistein und Equol auf den osteoporotischen Knochen am Tiermodell der orchidektomierten, männlichen S.D.-Ratte untersucht. Die in Soja vorkommenden Isoflavone Genistein und Equol, die als Phytohormone wirken und verstärkt das Interesse der Forschung geweckt haben, weil sie als mögliche Alternative zur HRT bei Osteoporose gehandelt werden, wurden vergleichend zu den gonadalen Steroiden Dihydrotestosteron und Estradiol untersucht. Erstmals wurde in dieser Arbeit die therapeutische Wirkung dieser Substanzen am osteoporotischen, männlichen Knochen untersucht.

Unsere Resultate haben gezeigt, dass die Orchidektomie eine massive Osteoporose bewirkt hat. Damit bestätigt sich die orx S.D.-Ratte als Tiermodell für die Erforschung der Osteoporose.

Unter der Zufuhr von Estradiol konnte der erhöhte Knochenstoffwechsel im Rahmen der 'high-turnover'-Osteoporose im Vergleich zu den anderen untersuchten Substanzen am stärksten gehemmt werden. Eine Abnahme der paratibialen Muskelfläche nach Orchidektomie wurde durch Estradiol am stärksten inhibiert. Die Parameter für Spongiosa und Kortikalis haben unter der Substitution von Estradiol nach Orchidektomie im Vergleich zu den anderen untersuchten Substanzen am wenigsten abgenommen. Allerdings konnte selbst durch Estradiol der nach Orchidektomie aufgetretene Verlust an Knochensubstanz nicht wiederhergestellt werden, d.h. die Therapie der Osteoporose mit Estradiol war unzureichend.

Unter Dihydrotestosteron war im Vergleich zu Estradiol insgesamt eine schwächere Wirkung dieser Substanz auf den osteoporotischen Knochen der männlichen Ratte zu beobachten. Unter der Zufuhr von Dihydrotestosteron konnte der erhöhte Knochenstoffwechsel im Rahmen der 'high-turnover'-Osteoporose gehemmt werden, allerdings weniger stark als durch Estradiol. Die Struktur des osteoporotischen Knochens konnte durch Dihydrotestosteron im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verbessert werden und der Effekt von Dihydrotestosteron auf den osteoporotischen Knochen war schlechter gegenüber Estradiol und somit ebenfalls therapeutisch insuffizient.

Durch die Zufuhr von Genistein und Equol wurde der nach Orchidektomie erhöhte 'bone turnover' weniger stark gehemmt als durch die gonadalen Steroide. Auf die Knochenparameter Spongiosa und Kortikalis des osteoporotischen Knochens der männlichen Ratte konnte allgemein keine signifikant bessere Wirkung dieser Substanzen gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden.

Aufgrund der in dieser Studie erhobenen Ergebnisse muss eine therapeutische Wirkung der Isoflavone Genistein und Equol auf den osteoporotischen Knochen der männlichen Ratte verneint werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zwar alle Substanzen eine Wirkung auf den Knochenstoffwechsel gehabt haben, was sich anhand der Serumparameter zeigen lässt, allerdings konnte keine der untersuchten Substanzen die Knochenstruktur therapeutisch positiv beeinflussen.

6. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 : Die Untersuchungszeitpunkte24

Tab. 2 : Mittlere Futtermittelaufnahme pro 100g Körpergewicht (BW) pro Tier pro Tag (d)
und mittlere Substanzaufnahme pro 100g Körpergewicht pro Tag26

7. Literaturverzeichnis

- Anderson JJ, Garner SC (1998): "Phytoestrogens and bone." *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12(4): 543-557.
- Anderson JJ, Anthony M, Messina M Garner SC (1999): "Effects of phyto-oestrogens on tissues." *Nutr Res Rev* 12(1): 75-116.
- Arjmandi BH, Birnbaum R, Goyal NV, Getlinger MJ, Juma S, Alekel L, Hasler CM, Drum ML, Hollis BW Kukreja SC (1998): "Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content." *Am J Clin Nutr* 68(6): 1364S-1368.
- Atkinson C, Compston JE, Day NE, Dowsett M Bingham SA (2004): "The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial." *Am J Clin Nutr* 79(2): 326-333.
- Axelsson M, Sjoval J, Gustafsson BE Setchell KDR (1984): "Soya-a dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in man and animals." *J Endocrinol* 102(1): 49-56.
- Bhasin S, Storer TW, Berman N, Yarasheski KE, Clevenger B, Phillips J, Lee WP, Bunnell TJ Casaburi R (1997): "Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men." *J Clin Endocrinol Metab* 82(2): 407-413.
- Blouin K, Richard C, Belanger C, Dupont P, Daris M, Laberge P, Luu-The V Tchernof A (2003): "Local androgen inactivation in abdominal visceral adipose tissue." *J Clin Endocrinol Metab* 88(12): 5944-5950.
- Blouin S, Gallois Y, Moreau M, Baslé M Chappard D (2007): "Disuse and orchidectomy have additional effects on bone loss in the aged male rat." *Osteoporos Int* 18(1): 85.
- Brandi ML (1997): "Natural and Synthetic Isoflavones in the Prevention and Treatment of Chronic Diseases." *Calcif Tissue Int* 61: 5-8.
- Brodie AM (1979): "Recent advances in studies on estrogen biosynthesis." *J Endocrinol Invest* 2(4): 445-460.
- Crepaldi G, Romanato G, Tonin P Maggi S (2007): "Osteoporosis and body composition." *J Endocrinol Invest* 30(6 Suppl): 42-47.
- Dai R, Ma Y, Sheng Z, Jin Y, Zhang Y, Fang L, Fan H Liao E (2008): "Effects of genistein on vertebral trabecular bone microstructure, bone mineral density, microcracks, osteocyte density, and bone strength in ovariectomized rats." *J Bone Miner Metab* 26(4): 342.
- Devareddy L, Khalil DA, Smith BJ, Lucas EA, Soung DY, Marlow DD Arjmandi BH (2006): "Soy moderately improves microstructural properties without affecting bone mass in an ovariectomized rat model of osteoporosis." *Bone* 38(5): 686.
- Drinka P, Bauwens S DeSmet A (1987): "Atraumatic vertebral deformities in elderly males." *Calcif Tissue Int* 41(6): 299.
- DVO-Leitlinie (2006): http://www.dv-osteologie.org/uploads/leitlinien/Kurzfassung_DVO-Leitlinien_15-03-06.pdf
- Ebeling PR (2008): "Osteoporosis in Men." *N Engl J Med* 358(14): 1474-1482.
- Engelke K (2002): <http://www.kup.at/kup/pdf/1261.pdf>
- Erben RG, Eberle J, Stahr K Goldberg M (2000): "Androgen Deficiency Induces High Turnover Osteopenia in Aged Male Rats: A Sequential Histomorphometric Study." *J Bone Miner Res* 15(6): 1085-1098.
- Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D Malluche HH (1998): "The Phytoestrogen Genistein Reduces Bone Loss in Short-Term Ovariectomized Rats." *Osteoporos Int* 8(3): 274.
- Farmakalidis E, Hathcock JN Murphy PA (1985): "Oestrogenic potency of genistin and daidzin in mice." *Food Chem Toxicol* 23(8): 741-745.
- Fonseca D Ward WE (2004): "Daidzein together with high calcium preserve bone mass and biomechanical strength at multiple sites in ovariectomized mice." *Bone* 35(2): 489.
- Frost HM Jee WSS (1992): "On the rat model of human osteopenias and osteoporoses." *Bone Miner* 18(3): 227.
- Fujioka M, Uehara M, Wu J, Adlercreutz H, Suzuki K, Kanazawa K, Takeda K, Yamada K Ishimi Y (2004): "Equol, a metabolite of daidzein, inhibits bone loss in ovariectomized mice." *J Nutr* 134(10): 2623-2627.
- Gao YH Yamaguchi M (1999): "Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclasts: apoptosis is induced through Ca²⁺ signaling." *Biol Pharm Bull* 22(8): 805-809.
- Garnero P, Delmas PD (1999): "[Biochemical markers of bone turnover: clinical usefulness in osteoporosis]." *Ann Biol Clin (Paris)* 57(2): 137-148.

- Greendale GA, Edelstein S Barrett-Connor E (1997): "Endogenous sex steroids and bone mineral density in older women and men: the Rancho Bernardo Study." *J Bone Miner Res* 12(11): 1833-1843.
- Gullberg B, Johnell O Kanis JA (1997): "World-wide Projections for Hip Fracture." *Osteoporos Int* 7(5): 407.
- Harridge SD (2007): "Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function." *Exp Physiol* 92(5): 783-797.
- Henri H, Norman AW: "Encyclopedia of Hormones" Academic Pr Inc. Burlington 2003.
- Hernandez ER, Seco C, Revilla M, Villa LF, Cortes J Rico H (1996): "Changes in the cortical and trabecular bone compartments with different types of menopause measured by peripheral quantitative computed tomography." *Maturitas* 23(1): 23-29.
- Herold: "Innere Medizin." Gerd Herold. Köln 2007. 686-687.
- Hertrampf T, Degen G, Kaid AA, Laudenschlager U, Seibel J, Di Virgilio AL Diel P (2006): "Combined Effects of Physical Activity, Dietary Isoflavones and 17 β -Estradiol on Movement Drive, Body Weight and Bone Mineral Density in Ovariectomized Female Rats." *Planta Medica*(6): 484.
- Hertrampf T, Gruca MJ, Seibel J, Laudenschlager U, Fritzscheier KH Diel P (2007): "The bone-protective effect of the phytoestrogen genistein is mediated via ER alpha-dependent mechanisms and strongly enhanced by physical activity." *Bone* 40(6): 1529-1535.
- Ishimi Y, Yoshida M, Wakimoto S, Wu J, Chiba H, Wang X, Takeda K Miyaura C (2002): "Genistein, a soybean isoflavone, affects bone marrow lymphopoiesis and prevents bone loss in castrated male mice." *Bone* 31(1): 180.
- Karasik D, Cupples LA, Hannan MT Kiel DP (2003): "Age, gender, and body mass effects on quantitative trait loci for bone mineral density: the Framingham Study." *Bone* 33(3): 308-316.
- Khalil DA, Lucas EA, Smith BJ, Soung DY, Devareddy L, Juma S, Akhter MP, Recker R Arjmandi BH (2005): "Soy Isoflavones May Protect Against Orchidectomy-Induced Bone Loss in Aged Male Rats." *Calcif Tissue Int* 76(1): 56.
- Khosla S, Riggs BL, Atkinson EJ, Oberg AL, McDaniel LJ, Holets M, Peterson JM Melton LJ (2006): "Effects of Sex and Age on Bone Microstructure at the Ultradistal Radius: A Population-Based Noninvasive In Vivo Assessment." *J Bone Miner Res* 21(1): 124-131.
- Kishida T, Mizushige T, Ohtsu Y, Ishikawa S, Nagamoto M, Izumi T, Obata A Ebihara K (2008): "Dietary soy isoflavone-aglycone lowers food intake in female rats with and without ovariectomy." *Obesity (Silver Spring)* 16(2): 290-297.
- Kostelac D, Rechkemmer G Briviba K (2003): "Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element." *J Agric Food Chem* 51(26): 7632-7635.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S Gustafsson JA (1996): "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." *Proc Natl Acad Sci USA* 93(12): 5925-5930.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S Gustafsson JA (1997): "Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors α and β ." *Endocrinology* 138(3): 863-870.
- Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA Ohlsson C (2003): "Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice." *Mol Endocrinol* 17(2): 203-208.
- Lobo MJ, Remesar X Alemany M (1993): "Effect of chronic intravenous injection of steroid hormones on body weight and composition of female rats." *Biochem Mol Biol Int* 29(2): 349-358.
- Löffler G, Petrides P. "Biochemie & Pathobiochemie." Springer Verlag. Heidelberg. 2007.
- Melton LJ, Khosla S, Atkinson EJ, O'Fallon WM Riggs BL (1997): "Relationship of Bone Turnover to Bone Density and Fractures." *J Bone Miner Res* 12(7): 1083-1091.
- Miksicek RJ (1994): "Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor." *J Steroid Biochem Mol Biol* 49(2-3): 153-160.
- Moreau MF, Libouban H, Legrand E, Basle MF, Audran M Chappard D (2001): "Lean, fat and bone masses are influenced by orchidectomy in the rat. A densitometric X-ray absorptiometric study." *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1(3): 209-213.
- Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C Qin K (1995): "Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens." *J Clin Endocrinol Metab* 80(12): 3689-3698.
- Ohlsson C, Hellberg N, Parini P, Vidal O, Bohlooly YM, Rudling M, Lindberg MK, Warner M, Angelin B Gustafsson JA (2000): "Obesity and disturbed lipoprotein profile in estrogen receptor-alpha-deficient male mice." *Biochem Biophys Res Commun* 278(3): 640-645.

- Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, Nozawa S, Suda T (1997): "Expression of estrogen receptor beta in rat bone." *Endocrinology* **138**(10): 4509-4512.
- Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco M-J, Lebecque P, Barlet J-P (2000): "Daidzein Is More Efficient than Genistein in Preventing Ovariectomy-Induced Bone Loss in Rats." *J Nutr* **130**(7): 1675-1681.
- Pollähne W, Minne HW (2001): "Epidemiologie, Diagnostik und klinisches Bild der Osteoporose." *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* **44**(1): 32-36.
- Rachon D, Seidlová-Wuttke D, Vortherms T, Wuttke W (2007): "Effects of dietary equol administration on ovariectomy induced bone loss in Sprague-Dawley rats." *Maturitas* **58**(3): 308.
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ (2002): "Sex Steroids and the Construction and Conservation of the Adult Skeleton." *Endocr Rev* **23**(3): 279-302.
- Rocha M, Grueso E, Puerta M (2001): "The anorectic effect of oestradiol does not involve changes in plasma and cerebrospinal fluid leptin concentrations in the rat." *J Endocrinol* **171**(2): 349-354.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, et al. (2002): "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial." *JAMA* **288**(3): 321-333.
- Roudebush RE, Magee DE, Benslay DN, Bendele AM, Bryant HU (1993): "Effect of weight manipulation on bone loss due to ovariectomy and the protective effects of estrogen in the rat." *Calcif Tissue Int* **53**(1): 61.
- Sehmisch S, Hammer F, Christoffel J, Seidlova-Wuttke D, Tezval M, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2008): "Comparison of the phytohormones genistein, resveratrol and 8-prenylnaringenin as agents for preventing osteoporosis." *Planta Med* **74**(8): 794-801.
- Seidlova-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T, Wuttke W (2003): "Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: comparison with estradiol-17beta." *Eur J Endocrinol* **149**(4): 351-362.
- Seidlová-Wuttke D, Stürmer KM, Stürmer EK, Sehmisch S, Wuttke W (2006): "Contrasting effects of estradiol, testosterone and of a black cohosh extract on density, mechanical properties and expression of several genes in the metaphysis of the tibia and on fat tissue of orchidectomized rats." *Maturitas* **55**(Supplement 1): S64.
- Setchell KDR, Brown NM, Lydeking-Olsen E (2002): "The Clinical Importance of the Metabolite Equol-- A Clue to the Effectiveness of Soy and Its Isoflavones." *J Nutr* **132**(12): 3577-3584.
- Sfakianos J, Coward L, Kirk M, Barnes S (1997): "Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats." *J Nutr* **127**(7): 1260-1268.
- Shimomura K, Shimizu H, Tsuchiya T, Abe Y, Uehara Y, Mori M (2002): "Is leptin a key factor which develops obesity by ovariectomy?" *Endocr J* **49**(4): 417-423.
- Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS (1994): "Estrogen Resistance Caused by a Mutation in the Estrogen-Receptor Gene in a Man." *N Engl J Med* **331**(16): 1056-1061.
- Soung D, Devareddy L, Khalil D, Hooshmand S, Patade A, Lucas E, Arjmandi B (2006): "Soy Affects Trabecular Microarchitecture and Favorably Alters Select Bone-Specific Gene Expressions in a Male Rat Model of Osteoporosis." *Calcif Tissue Int* **78**(6): 385.
- Sturmer EK, Seidlova-Wuttke D, Sehmisch S, Rack T, Wille J, Frosch KH, Wuttke W, Sturmer KM (2006): "Standardized bending and breaking test for the normal and osteoporotic metaphyseal tibias of the rat: effect of estradiol, testosterone, and raloxifene." *J Bone Miner Res* **21**(1): 89-96.
- Tchernof A, Poehlman ET (1998): "Effects of the menopause transition on body fatness and body fat distribution." *Obes Res* **6**(3): 246-254.
- Tivesten A, Moverare-Skrtic S, Chagin A, Venken K, Salmon P, Vanderschueren D, Savendahl L, Holmang A, Ohlsson C (2004): "Additive protective effects of estrogen and androgen treatment on trabecular bone in ovariectomized rats." *J Bone Miner Res* **19**(11): 1833-1839.
- Uesugi T, Toda T, Tsuji K, Ishida H (2001): "Comparative study on reduction of bone loss and lipid metabolism abnormality in ovariectomized rats by soy isoflavones, daidzin, genistin, and glycitin." *Biol Pharm Bull* **24**(4): 368-372.
- Vandenput L, Boonen S, Van Herck E, Swinnen JV, Bouillon R, Vanderschueren D (2002): "Evidence From the Aged Orchidectomized Male Rat Model That 17beta-Estradiol Is a More Effective Bone-Sparing and Anabolic Agent Than 5alpha-Dihydrotestosterone." *J Bone Miner Res* **17**(11): 2080-2086.
- Vanderschueren D, Van Herck E, Schot P, Rush E, Einhorn T, Geusens P, Bouillon R (1993): "The aged male rat as a model for human osteoporosis: Evaluation by nondestructive measurements and biomechanical testing." *Calcif Tissue Int* **53**(5): 342.

- Vanderschueren D, Venken K, Ophoff J, Bouillon R, Boonen S (2006): "Sex Steroids and the Periosteum--Reconsidering the Roles of Androgens and Estrogens in Periosteal Expansion." *J Clin Endocrinol Metab* 91(2): 378-382.
- Verhas M, Schoutens A, L'Hermite-Baleriaux M, Dourov N, Verschaeren A, Mone M, Heilporn A (1986): "The effect of orchidectomy on bone metabolism in aging rats." *Calcif Tissue Int* 39(2): 74.
- Waarsing JH, Day JS, Verhaar JA, Ederveen AG, Weinans H (2006): "Bone loss dynamics result in trabecular alignment in aging and ovariectomized rats." *J Orthop Res* 24(5): 926-935.
- Wronski T, Lowry P, Walsh C, Ignaszewski L (1985): "Skeletal alterations in ovariectomized rats." *Calcif Tissue Int* 37(3): 324.
- Wronski TJ, Schenck PA, Cintron M, Walsh CC (1987): "Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats." *Calcif Tissue Int* 40(3): 155-159.
- Wu J, Wang XX, Chiba H, Higuchi M, Takasaki M, Ohta A, Ishimi Y (2003): "Combined intervention of exercise and genistein prevented androgen deficiency-induced bone loss in mice." *J Appl Physiol* 94(1): 335-342.
- Xu X, Harris KS, Wang HJ, Murphy PA, Hendrich S (1995): "Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women." *J Nutr* 125(9): 2307-2315.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. W. Wuttke danke ich für die Überlassung des Themas, die Betreuung und die Möglichkeit des experimentellen Arbeitens in seiner Abteilung.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Dr. D. Seidlova-Wuttke für die stetige Gesprächsbereitschaft und die fachlich weiterführende Unterstützung bei der Anfertigung des experimentellen und schriftlichen Teils dieser Arbeit bedanken.

Nicht minder Dank gilt den Mitarbeitern der Abteilung Klinische und Experimentelle Endokrinologie des Zentrums Frauenheilkunde der Universitätsklinik Göttingen; vor allem Dr. S. Niebert und A. Ahrbecker, die zum Gelingen dieser Arbeit in großem Maße beigetragen haben und H. Brüggemann-Meyer für die Aufarbeitung der Serumproben.

Lebenslauf

Am 7. November 1983 wurde ich, Elena Vorwerk, als erstes Kind von Iris Luise Vorwerk (geb. Kaul) und Udo Artur Vorwerk in Duisburg geboren.

Von 1990 bis 1994 besuchte ich die Gemeinschaftsgrundschule in Duisburg-Serm. Im September 1994 wechselte ich auf das Theodor-Fliedner-Gymnasium der evangelischen Kirche im Rheinland in Düsseldorf, wo ich im Juni 2003 die allgemeine Hochschulreife erlangte.

Im September 2003 habe ich mein Studium der Humanmedizin an der Université Louis Pasteur in Straßburg, Frankreich begonnen.

Ab Oktober 2004 setzte ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen fort, wo ich im Sommer 2006 den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung erfolgreich absolvierte.

Von August 2007 bis März 2008 verbrachte ich ein Semester, gefördert durch das ERASMUS-Programm, an der Medizinischen Fakultät der Universität Lille in Frankreich.

Im Frühjahr 2008 habe ich in der Abteilung Klinische und Experimentelle Endokrinologie im Zentrum Frauenheilkunde unter der Leitung von Prof. Dr. med. W. Wuttke mit der Anfertigung meiner Dissertationsarbeit begonnen.

Von August 2009 bis Juli 2010 habe ich das Praktische Jahr in Lüneburg, Bremerhaven und Neu-Delhi absolviert und werde voraussichtlich Ende 2010 mein Studium der Medizin mit Ablegen des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung beenden.