

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

*Einfluss eines 30-Hz-Vibrationstrainings
in Kombination mit verschiedenen Isoflavonen
auf die proximale Tibiametaphyse der ovariectomierten Ratte*

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Fabian Sandmann

aus

Minden

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. H. Siggelkow

III. Berichterstatter/in: -

Tag der mündlichen Prüfung: 8. November 2011

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	Osteoporose	7
1.1.1	<i>Prophylaxe und Therapie der Osteoporose</i>	8
1.1.2	<i>Mikroarchitektonische Veränderungen osteoporotischer Knochen</i>	9
1.1.3	<i>Das Osteoporose-Modell der ovariectomierten Ratte</i>	11
1.1.4	<i>Postmenopausale Östrogen-Substitution und Östrogenrezeptoren im Knochen</i>	12
1.1.5	<i>Hormontherapie, SERMs und Phytoöstrogene</i>	13
1.2	Isoflavone in der Osteoporoseprophylaxe	16
1.2.1	<i>Equol</i>	17
1.2.2	<i>Genistein</i>	18
1.2.3	<i>Puerarin</i>	19
1.3	Knochenadaptation auf mechanische Stimulation	20
1.3.1	<i>Körperliche Trainingsprogramme in der Osteoporoseprophylaxe</i>	22
1.3.2	<i>Vibrationstraining</i>	23
1.4	Pro und Contra: Kombinierte mechanische und östrogene Knochenstimulation	25
1.5	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	27
2	MATERIAL UND METHODEN	28
2.1	Tierversuch	28
2.1.1	<i>Versuchstiere und Haltungsbedingungen</i>	28
2.1.2	<i>Ovariectomie</i>	28
2.1.3	<i>Testsubstanzen</i>	28
2.1.4	<i>Vibrationstraining</i>	29
2.1.5	<i>Versuchsablauf</i>	30
2.2	Herstellung der Knochenpräparate	30
2.2.1	<i>Acrylat-Einbettung</i>	30
2.2.2	<i>Schneiden der Acrylat-Blöcke und Objektträgerbeschichtung</i>	31
2.2.3	<i>Goldner-Färbung</i>	31
2.3	Bestimmung histomorphometrischer Parameter	32
2.3.1	<i>Spongioser Knochenanteil (BV/TV) und intramedullärer Adipozytenanteil (AV/TV)</i>	32
2.3.2	<i>Trabekeldurchmesser (Tb.Dm)</i>	34
2.3.3	<i>Trabekelkonnektivität (N/T)</i>	35
2.3.4	<i>Kortikalisdicke (Ct.Th)</i>	36
2.4	Bestimmung der spongiösen Knochendichte (Tr.D)	37
2.5	Statistische Auswertung	38

3	ERGEBNISSE	39
3.1	Futter- und Substanzaufnahme	39
3.2	Körpergewichtszunahme	40
3.3	Spongiöser Knochenanteil (BV/TV)	41
3.4	Trabekeldurchmesser (Tb.Dm)	42
3.5	Trabekelkonnektivität (N/T)	43
3.6	Kortikalisdicke (Ct.Th)	44
3.7	Intramedullärer Adipozytenanteil (AV/TV)	45
3.8	Spongiöse Knochendichte (Tr.D)	46
3.9	Korrelation der spongiösen Knochendichte (Tr.D) mit den korrespondierenden histomorphometrisch erhobenen Parametern des spongiösen Knochens	47
4	DISKUSSION	48
4.1	Einleitung	48
4.2	Futter- und Substanzaufnahme	49
4.3	Körpergewichtszunahme	50
4.4	Vibrationstraining	51
4.4.1	<i>Auswirkungen auf den spongiösen Knochen</i>	<i>52</i>
4.4.2	<i>Auswirkungen auf den kortikalen Knochen</i>	<i>53</i>
4.5	Isoflavone	55
4.6	Intramedullärer Adipozytenanteil	57
4.7	PQCT-Messung der spongiösen Knochendichte	58
5	ZUSAMMENFASSUNG	61
6	ANHANG	62
6.1	Abbildungsverzeichnis	62
6.2	Tabellenverzeichnis	63
7	LITERATURVERZEICHNIS	64

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> , Varianzanalyse
ASBMR	<i>American Society for Bone and Mineral Research</i>
AV/TV	<i>Adipose Tissue Volume / Total Tissue Volume</i> , Intramedullärer Adipozytenanteil
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BV/TV	<i>Trabecular Bone Volume / Total Tissue Volume</i> , Spongöser Knochenanteil
CO₂	Kohlendioxid
Co-SF	Sojafrei ernährte Kontrollgruppe
Ct.Th	<i>Cortical Thickness</i> , Kortikalisdicke
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
DVO	Dachverband Osteologie
DXA	<i>Dual Energy X-ray Absorptiometry</i> , Dualenergie-Röntgenabsorptiometrie
E	<i>Strain</i> , relative elastische Knochenverformung ($\Delta l/l$)
E2	Östradiol, 17 β -Östradiol, Estradiol
ER	Östrogenrezeptor
ERα	Östrogenrezeptor α
ERβ	Östrogenrezeptor β
g	Erdbeschleunigung (Mittelwert: 9,81 m/s ²)
g	Gramm
HT	Hormontherapie, Hormonersatztherapie
Hz	Hertz (1/s)
IMS	<i>International Menopause Society</i> , Internationale Menopausen Gesellschaft
LWS	Lendenwirbelsäule
MMA	Methylmethacrylat
NIH	<i>National Institutes of Health</i> , Nationale US-amerikanische Gesundheitsbehörde
Non-Vibro	Versuchsgruppen ohne Vibrationstraining

N/T	<i>Nodes / Termini,</i> Quotient zur Beurteilung der Trabekelkonnektivität
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development,</i> Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
OPG	Osteoprotegerin
p	Signifikanzniveau
PPARγ2	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ 2
pQCT	Periphere quantitative Computertomographie
r	Korrelationskoeffizient (nach Pearson)
RANK	<i>Receptor Activator of NF κB</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF κB Ligand</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean,</i> Standardfehler
SERM	<i>Selective Estrogen Receptor Modulator,</i> Selektiver Östrogenrezeptor-Modulator
SHBG	<i>Sex Hormone Binding Globulin,</i> Sexualhormon-bindendes Globulin
Tab.	Tabelle
Tb.Dm	<i>Trabecular Diameter,</i> Trabekeldurchmesser
Tr.D	<i>Trabecular Density,</i> spongiöse Knochendichte
Vibro	Versuchsgruppen mit Vibrationstraining
WBV	<i>Whole Body Vibration,</i> Ganzkörpervibration
WHI	<i>Women's Health Initiative,</i> US-amerikanische Frauengesundheitsinitiative
WHO	<i>World Health Organization,</i> Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Osteoporose

Osteoporose wird vom Dachverband Osteologie definiert als systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine mikroarchitektonische Verschlechterung des Knochengewebes charakterisiert ist (DVO 2009). Als Folge kommt es zu einem Anstieg der Knochenfragilität mit der Neigung zu Frakturen. Von einer manifesten Osteoporose spricht man beim Vorliegen von mindestens einer Osteoporose-bedingten Fraktur.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert die Osteoporose aus diagnostischer Sicht über die Knochendichtemessung mit der Dualenergie-Röntgenabsorptiometrie (DXA) (Kanis 1994). Die DXA-Messung beschreibt den Mineralgehalt des Knochens pro Fläche und wird routinemäßig an der Lendenwirbelsäule und dem proximalen Femur bestimmt. Der ermittelte T-Wert gibt die in Standardabweichungen angegebene Differenz von der durchschnittlichen Knochendichte eines gleichgeschlechtlichen Kollektivs junger gesunder Menschen im Alter von 30 Jahren an, ein T-Wert $\leq -2,5$ gilt definitionsgemäß als Osteoporose. Die zur reduzierten Knochenstabilität ebenfalls beitragende architektonische Komponente der Osteoporose ist in der klinischen Praxis schwer zu erfassen. Das Frakturrisiko wird zudem durch zahlreiche extraskelettale Faktoren mitbeeinflusst, dazu zählen Muskelkraft, Koordinations- und Sehfähigkeit sowie die allgemeine Sturzneigung (North-American-Menopause-Society 2006, Pfeilschifter 2006).

Sowohl Frauen als auch Männer entwickeln ihre maximale Knochenmasse (*Peak Bone Mass*) zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr (Bonjour et al. 1994). Diese fällt bei Frauen aufgrund kleinerer Knochendurchmesser und Kortikalisdicken geringer aus (Compston 2001). Nach Erreichen der maximalen Knochenmasse setzt ein allmählicher Rückgang ein. Frauen durchlaufen nach der Menopause einen beschleunigten Knochenmasseverlust für die Dauer von 5 bis 10 Jahren, welcher auf den reduzierten Einfluss der weiblichen Sexualhormone mit Sistieren der ovariellen Östrogensynthese zurückgeführt wird (Manolagas 2000, Compston 2001). Der durchschnittliche Knochenmasseverlust beträgt häufig mehr als 2 % jährlich und betrifft vor allem den spongiösen Knochen (*Fast-loser*, typisch für die frühe postmenopausale Osteoporose, auch Typ-I-Osteoporose). An die frühe postmenopausale Phase schließt sich ein langsamerer, kontinuierlicher Knochenmasseverlust an. Dieser betrifft spongiösen und kortikalen Knochen gleichmäßiger und wird auch bei Männern beobachtet (*Slow-loser*, typisch für die senile Osteoporose, auch Typ-II-Osteoporose). Ätiologisch stehen hier körperliche Inaktivität, nutritiver Kalzium- und Vitamin-D-Mangel sowie -Synthesestörungen mit dem daraus resultierenden sekundären

Hyperparathyreoidismus im Vordergrund. Wahrscheinlich trägt auch der reduzierte östrogene Einfluss auf den extraskelettalen Kalziummetabolismus ursächlich mit bei (Riggs et al. 1998). Neben der primären Osteoporose existieren verschiedene sekundäre Osteoporoseformen, die etwa 5 % aller Osteoporosen ausmachen. Als Ursachen stehen die Behandlung mit Glucocorticoiden und Immobilisation im Vordergrund, daneben können auch ein Malabsorptionssyndrom und zahlreiche endokrine Störungen mit einer sekundären Osteoporose assoziiert sein.

Osteoporose gilt als eine der häufigsten Erkrankungen des höheren Lebensalters. Gemessen an der WHO-Definition steigt die Prävalenz der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen in Deutschland von etwa 7 % im Alter von 55 Jahren auf 19 % im Alter von 80 Jahren an (Gluer et al. 2004). Die Inzidenz osteoporotischer Frakturen nimmt mit dem Lebensalter exponentiell zu (Pfeilschifter 2006).

Frakturen als Folge geringer Traumata oder ohne erkennbare Ursache (pathologische Frakturen, Spontanfrakturen) führen charakteristischerweise zur klinischen Manifestation der Osteoporose. Typisch sind Sinterungsfrakturen der Wirbelkörper und periphere Frakturen am Schenkelhals oder Vorderarm. Diese können durch akute und chronische Schmerzen sowie funktionelle Einschränkungen eine deutliche Reduktion der Lebensqualität und den Verlust persönlicher Autonomie verursachen (North-American-Menopause-Society 2006, DVO 2009). Insbesondere hüftgelenksnahe Frakturen gehen mit einer erhöhten Mortalität einher (Pfeilschifter 2006). Nach der vom Institut für Gesundheits- und Sozialforschung veröffentlichten *BoneEVA*-Studie kam es in Deutschland im Jahr 2003 zu geschätzten 333.322 Osteoporose-bedingten Frakturen, darunter am häufigsten hüftgelenksnahe Frakturen (99.973), gefolgt von Handgelenksfrakturen (42.242) und Wirbelkörperfrakturen (40.741) (Haussler et al. 2007). Diese verursachten den Großteil der direkt der Osteoporose zugeschriebenen Ausgaben von 5,4 Milliarden €/Jahr. Osteoporose gilt daher auch als sozioökonomisch bedeutsame Volkskrankheit (WHO-Scientific-Group 2003). Nach Einschätzung des Dachverbandes Osteologie ist die Diagnostik und Therapie von Osteoporose-Risikopatienten in Deutschland derzeit unzureichend (DVO 2009).

1.1.1 Prophylaxe und Therapie der Osteoporose

Ziel aller prophylaktischen und therapeutischen Bemühungen ist die Reduktion des Frakturrisikos. Der Dachverband Osteologie empfiehlt verschiedene Basismaßnahmen, welche von der Primär- bis zur Tertiärprophylaxe umgesetzt werden sollten. Dazu gehören regelmäßige körperliche Aktivität zur Förderung von Muskelkraft und Koordination sowie die Vermeidung von Immobilisation. Die Zufuhr von Kalzium und Vitamin D sollte gegebenenfalls durch medikamentöse Supplementierung sichergestellt werden. Es wird empfohlen, die Versorgung mit Vitamin B₁₂ und Folsäure durch die Nahrung zu gewährleisten und auf eine

ausreichende kalorische Ernährung zu achten. Von Nikotinkonsum wird abgeraten. Medikamente mit Einfluss auf den Knochenstoffwechsel und/oder die Sturzrate sollten regelmäßig kritisch hinsichtlich Dosis und Notwendigkeit überprüft werden. Es gibt keine Hinweise auf eine persistierende Langzeitwirkung prophylaktischer Maßnahmen, so dass deren Wirksamkeit auf eine dauerhafte Anwendung angewiesen ist (DVO 2009).

Daneben existieren spezifische medikamentöse Therapiestrategien. Für postmenopausale Frauen am besten belegt sind die fraktursenkenden Wirkungen von Alendronat, Ibandronat, Risedronat, Zoledronat, Teriparatid, Parathyroidhormon, Strontiumranelat, Raloxifen und Östrogenen. Der Dachverband Osteologie empfiehlt eine spezifische medikamentöse Therapie bei hohem Risiko für Wirbelkörper- und proximale Femurfrakturen (geschätztes 10-Jahresrisiko > 30 %). Zur Beurteilung des Frakturrisikos gibt der DVO geschlechts- und altersabhängige T-Schwellenwerte an. Diese können bei Vorliegen von einem oder mehreren spezifischen Risikofaktoren bis zu einem T-Wert von maximal -2,0 angehoben werden. Die Wirksamkeit einer spezifischen medikamentösen Therapie ist für T-Werte > -2,0 nicht belegt (DVO 2009). Aufgrund des hohen Frakturrisikos werden nach inadäquater singulärer oder nach multiplen Wirbelkörperfrakturen sowie für die Hochdosistherapie mit oralen Glucocorticoiden gesonderte Therapieempfehlungen abgegeben.

Eine allgemeine Frakturprophylaxe mit spezifischen Osteoporosetherapeutika wird dagegen nicht empfohlen. Während die Hormontherapie mit Östrogen-Gestagen-Kombinationen oder als Östrogenmonotherapie früher auch verbreitet zur allgemeinen Frakturprophylaxe angewendet wurde, ist man in den letzten Jahren durch eine Neubewertung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses zu einer kritischeren Einschätzung gelangt. Dennoch existieren momentan unterschiedliche Empfehlungen verschiedener Fachgesellschaften (wird im Folgenden noch ausführlicher dargestellt). In Deutschland änderte das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) die Zulassung der Hormontherapie zur Osteoporoseprophylaxe nur noch auf den Ausnahmefall (BfArM 2004). Postmenopausale Frauen, die primär wegen vasomotorischer Symptome mit Östrogenen therapiert werden, benötigen meist keine zusätzliche spezifische Osteoporosetherapie (DVO 2009).

1.1.2 Mikroarchitektonische Veränderungen osteoporotischer Knochen

Die zwei Phasen des postmenopausalen Knochenmasseverlustes sind durch unterschiedliche knochenarchitektonische Veränderungen gekennzeichnet. Die frühe postmenopausale Osteoporose (Typ-I-Osteoporose) betrifft vor allem die Spongiosa und geht mit Verlusten von 20 – 30 % des spongiösen Knochengewebes einher (Riggs et al. 2002). Charakteristisch ist eine Zunahme des Knochenstoffwechsels mit gesteigerter Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität (*High Turnover*). Der gesteigerte Knochenumsatz

führt aufgrund einer überwiegenden Knochenresorption zu Knochenmasseverlusten, welche an den Knochenoberflächen lokalisiert sind und zunächst den spongiösen Knochen überproportional betreffen (Manolagas 2000, Seeman 2003). Es kommt zum Verlust von Trabekeln und deren Konnektivität (Aaron et al. 1987, van der Linden et al. 2001). In den Wirbelkörpern gehen dabei bevorzugt horizontale Trabekelverbindungen verloren (Atkinson PJ 1967, Mosekilde 1988). Mit fortschreitendem Trabekelverlust wird auch die Kortikalis zunehmend von Knochenmasseverlusten betroffen. Hier führen die Resorptionsvorgänge zur kortikalen Porosität und abnehmenden Kortikalisdicke (Brown JP et al. 1987, Foldes et al. 1991). Trotz der postmenopausal gesteigerten periostalen Knochenapposition kann der Rückgang der Kortikalisdicke nur unvollständig kompensiert werden (Duan et al. 2001, Riggs et al. 2004).

Die senile Osteoporose (Typ-II-Osteoporose) ist durch einen den spongiösen und kortikalen Knochen gleichmäßiger betreffenden Knochenmasseverlust bei reduziertem Knochenumsatz gekennzeichnet (*Low Turnover*). Die verbliebenen Trabekel werden nun eher ausgedünnt als dass sie ganz verschwinden (Riggs et al. 2002). Die kortikale Knochenresorption schreitet fort und führt zu weiter abnehmenden Kortikalisdicken bei zunehmenden Knochendurchmessern (Seeman 2003).

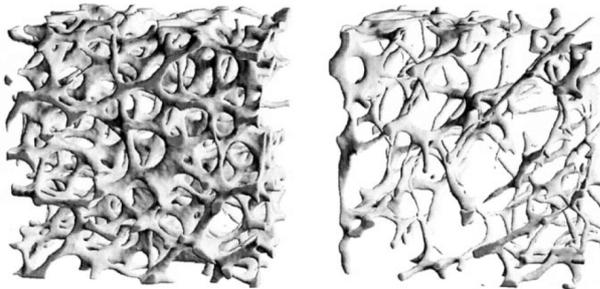


Abb. 1-1 Postmenopausale Veränderungen des spongiösen Knochens

Micro-CT-Rekonstruktion der Trabekelarchitektur eines lumbalen Wirbelkörpers einer jungen Frau (links) und einer Frau mit postmenopausaler Osteoporose (rechts). Modifiziert nach Riggs et al. (2002), Seite 282.

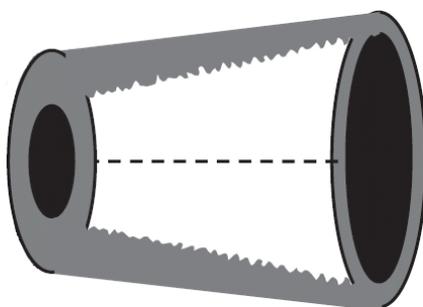


Abb. 1-2 Postmenopausale Veränderungen des kortikalen Knochens

Schematische Darstellung der postmenopausalen Entwicklung von Knochendurchmesser und Kortikalisdicke eines langen Röhrenknochens. Modifiziert nach Seeman (2008), Seite 2.

Die postmenopausalen Umbauprozesse beeinflussen die mechanische Stabilität des Knochens. Diese wird durch den Verlust der Trabekelkonnektivität reduziert (van der Linden et al. 2001). Gleichzeitig steigt die Gefahr der Akkumulation von Mikrofrakturen (Fyhrie und Schaffler 1994). Noch nicht wieder aufgefüllte Resorptionslakunen dienen als Sollbruchstellen. Neu entstandenes Knochengewebe weist eine geringere Stabilität durch die erst einsetzende Mineralisation und Ausrichtung der Kollagenfasern auf (Seeman und Delmas 2006). Die reduzierte spongiöse Knochenstabilität führt typischerweise zu Wirbelkörperfrakturen. Die steigende kortikale Porosität und abnehmende kortikale Dicke prädisponiert dagegen für Frakturen langer Röhrenknochen (Jordan et al. 2000, Bousson et al. 2001). Die postmenopausale Zunahme des Knochendurchmessers wirkt sich jedoch positiv auf die Knochenfestigkeit aus und stabilisiert gegenüber Biegekräften (Seeman 2008).

1.1.3 Das Osteoporose-Modell der ovariectomierten Ratte

Auch im Tiermodell der Ratte führt Östrogenentzug durch Ovariectomie zu einem gesteigerten Knochenumsatz mit überwiegender Knochenresorption, welche sich durch den schnellen Verlust des spongiösen Knochens bemerkbar macht (Wronski et al. 1986, Wronski et al. 1989b, Rachon et al. 2007b, Seidlova-Wuttke et al. 2008). Die Trabekelkonnektivität geht verloren, während die Trabekeldicke annähernd konstant bleibt (Dempster et al. 1995). Durch endokortikale Resorption vergrößert sich das Volumen der Tibia-Markhöhle (Kalu et al. 1989, Seidlova-Wuttke et al. 2008). Zusätzlich kommt es zur periostalen Knochenapposition (Turner RT et al. 1987).

Auch bei der Ratte beobachtet man einen zweiphasigen Knochenmasseverlust mit einer ersten schnellen Phase und einem sich anschließenden langsameren Rückgang (Wronski et al. 1989a). In der proximalen Tibiametaphyse sind erste Knochenveränderungen bereits 14 Tage nach Ovariectomie erkennbar. Der frühe, schnelle Knochenmasseverlust hält bis etwa 3 Monate nach Ovariectomie an (Wronski et al. 1988b).

Aufgrund analoger pathophysiologischer Mechanismen und vergleichbarer knochenarchitektonischer Veränderungen gilt die ovariectomierte Ratte als sehr geeignetes Modell zur Untersuchung der postmenopausalen Osteoporose (Frost und Jee 1992, Jee und Yao 2001). Die auch am menschlichen Knochen anwendbaren Analyseverfahren der Knochen-Histomorphometrie und Osteodensitometrie (DXA sowie pQCT) sind verlässlich auf die Ratte übertragbar (Jee und Yao 2001, Lelovas et al. 2008).

Einschränkungen des osteoporotischen Rattenmodells stellen der späte und teils ausbleibende Epiphysenschluss und das damit einhergehende anhaltende Längenwachstum des Rattenskeletts dar. Knochenanalysen sollten daher in ausreichendem Abstand zur Epiphysenfuge durchgeführt werden (Lelovas et al. 2008). Zudem fehlt dem kortikalen

Knochen der Ratte ein gut entwickeltes Haverssches-System wie man es beim Menschen beobachtet. Die für den Menschen typischen osteoporotischen Ermüdungsbrüche kommen bei der Ratte nicht vor. Die reduzierte Knochenstabilität lässt sich dennoch anhand von Bruchtestverfahren objektivieren (Jee und Yao 2001, Lelovas et al. 2008).

1.1.4 Postmenopausale Östrogen-Substitution und Östrogenrezeptoren im Knochen

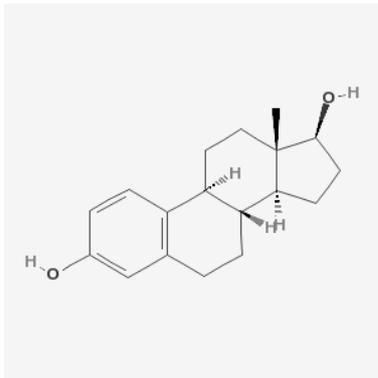


Abb. 1-3 Östradiol (E2)

Summenformel: $C_{18}H_{24}O_2$
 Molare Masse: 272,4 g/mol
 (PubChem 2010b)

Nach der Menopause fällt der Serumspiegel des Östradiols (E2), dem wichtigsten natürlichen Östrogen, auf 10 – 15 % der prämenopausalen Konzentration (Khosla et al. 1997). Die Biosynthese findet dann hauptsächlich im Fettgewebe statt (Simpson et al. 1997).

Östrogen-Substitution nach der Menopause reduziert den einsetzenden Knochenmasseverlust und wirkt protektiv auf die spongiöse Knochenarchitektur (Nachtigall et al. 1979, Vedi et al. 1996). Gleichzeitig geht das Frakturrisiko zurück (Kiel et al. 1987, Rossouw et al. 2002, Cauley et al. 2003).

Die knochenprotektiven Effekte sind nach Therapieabbruch jedoch schnell reversibel (Banks et al. 2004, Heiss et al. 2008).

1941 wurde erstmalig der Östrogenmangel als Ursache der postmenopausalen Osteoporose erkannt (Albright et al. 1941). Östrogene sind wichtige Regulatoren des Knochenstoffwechsels und gewährleisten ein ausgeglichenes Verhältnis von Knochenresorptions- zu Knochensynthesvorgängen (Manolagas 2000). Der reduzierte Knochenmasseverlust nach postmenopausaler Östrogen-Substitution wird vor allem einem antiresorptiven Effekt zugeschrieben. Östrogene hemmen die Knochenresorption durch Reduktion der Osteoklastenzahl und -aktivität (Hughes et al. 1996, Compston 2001). Zusätzlich weisen sie eine positive Beeinflussung der Osteoblastenfunktion auf (Gohel et al. 1999, Manolagas 2000). Auf molekularer Ebene konnte für Östrogene unter anderem eine Steigerung der Osteoprotegerin (OPG)-Synthese in Osteoblasten gezeigt werden (Hofbauer et al. 1999). OPG wirkt innerhalb des osteoregulatorisch wichtigen OPG/RANKL/RANK-Systems inhibitorisch auf die Osteoklastenaktivität.

Das Vorhandensein von Östrogenrezeptoren (ERs) im Knochen wurde erstmalig in Osteoblasten beschrieben und später auch in Osteoklasten und Osteozyten erkannt (Eriksen et al. 1988, Oursler et al. 1991, Tomkinson et al. 1998). ERs gehören als Steroidhormonrezeptoren zur Gruppe der intrazellulären, Liganden-regulierten Transkriptionsfaktoren. Die beiden Subtypen ER α und ER β konnten bisher identifiziert werden (Kuiper et al. 1996). Beide weisen ähnliche DNA-Bindungsdomänen auf,

unterscheiden sich jedoch deutlicher in ihren Liganden-Bindungsdomänen (Kuiper et al. 1997). Daneben kommen auch ER α /ER β -Heterodimere vor (Pettersson et al. 1997). Östradiol zeigt eine ähnlich hohe Affinität zu ER α wie zu ER β (Kuiper et al. 1997). Knochenzellen enthalten beide Subtypen des Östrogenrezeptors, allerdings ist die Verteilung innerhalb des Knochens unterschiedlich. ER α wurde vor allem im kortikalen Knochen nachgewiesen, dagegen scheint ER β im spongiösen Knochen häufiger exprimiert zu werden (Onoe et al. 1997, Bord et al. 2001). Die Rolle der Östrogenrezeptoren im Rahmen der Mechanotransduktion wird im Verlauf noch ausführlicher dargestellt.

1.1.5 Hormontherapie, SERMs und Phytoöstrogene

Neben ihrer Wirksamkeit in der Osteoporose- und Frakturprophylaxe gilt die Hormontherapie (HT, Hormonersatztherapie) mit Östrogen-Gestagen-Kombinationen oder als Östrogenmonotherapie (nur bei hysterektomierten Frauen empfohlen) als effektive Behandlungsmethode postmenopausaler vasomotorischer Symptome sowie der urogenitalen Atrophie (Pines et al. 2007, DGGG 2009). Große prospektive, randomisierte, plazebokontrollierte Studien führten zu einem kritischeren Umgang mit der HT. Die erstmals im Juli 2002 veröffentlichten Daten aus der *Women's-Health-Initiative-Studie* (WHI-Studie) zeigten im Östrogen-Gestagen-Arm ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs, Schlaganfälle, thrombembolische Ereignisse und nicht signifikant auch für kardiovaskuläre Erkrankungen (Rossouw et al. 2002). Im reinen Östrogen-Arm traten vermehrt Schlaganfälle und thrombembolische Ereignisse bei gleichbleibendem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Brustkrebs auf (Anderson GL et al. 2004). Die Internationale Menopausen Gesellschaft (IMS) kritisiert an der WHI- und weiteren vergleichbaren Studien das hohe Durchschnittsalter der untersuchten Frauen (Pines et al. 2007). Nach Einschätzung der IMS führt frühzeitige Östrogen-Substitution unter Vermeidung langjähriger Östrogendefizite zu einem überwiegenden Therapienutzen. Für jüngere perimenopausale und früh-postmenopausale Frauen wird die HT bei erhöhtem Frakturrisiko auch als Erstlinientherapie empfohlen. Der Beginn oder die Fortsetzung einer HT zur alleinigen Osteoporoseprophylaxe nach dem 60. Lebensjahr wird dagegen deutlich kritischer beurteilt (Pines et al. 2007). Die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) empfiehlt in einer interdisziplinären Leitlinie die HT zur Frakturprophylaxe nur, wenn eine Unverträglichkeit oder Kontraindikationen gegenüber anderen zur Osteoporosetherapie vorrangig empfohlenen Arzneimitteln besteht (DGGG 2009). Der Dachverband Osteologie beschränkt seine Empfehlung auf die Sekundärprävention nach sorgfältiger individueller Abwägung, wenn eine Unverträglichkeit oder Kontraindikationen gegenüber anderen zugelassenen Osteoporosetherapeutika vorliegt (DVO 2009).

Als Alternative zur klassischen HT sind in den letzten Jahren vermehrt Substanzen in den Vordergrund gerückt, die nur selektive östrogene Wirkungen an bestimmten Geweben

hervorrufen (Selektive Östrogenrezeptormodulatoren, SERMs). Synthetische SERMs sind nichtsteroidale Wirkstoffe, die je nach Gewebe partielle agonistische oder antagonistische Eigenschaften besitzen. Für den SERM Raloxifen konnte eine Risikoreduktion für postmenopausale Wirbelkörperfrakturen nachgewiesen werden (Ettinger et al. 1999, Ensrud et al. 2008). Raloxifen senkte die Rate Östrogenrezeptor-positiver Mammakarzinome bei gleichbleibendem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, andererseits fanden sich analog zur HT Risikozunahmen für thrombembolische Ereignisse und tödliche Schlaganfälle (Ettinger et al. 1999, Ensrud et al. 2008).

Beobachtungsstudien deuteten auch auf das Vorkommen natürlicher SERMs hin. Asiatinnen wiesen im Vergleich zu Frauen in westlichen Industrienationen eine geringere Inzidenz von osteoporotischen Frakturen, klimakterischen Symptomen, kardiovaskulären Erkrankungen sowie Mamma- und kolorektalen Karzinomen auf (Adlercreutz 1995, Tham et al. 1998, Glazier und Bowman 2001, Nagata et al. 2001). Nach Emigration in die USA nivellierten sich diese Unterschiede (Wu AH et al. 1998). Eine mögliche Erklärung wurde in der traditionellen asiatischen Ernährung gesehen. Der Konsum zahlreicher Sojaprodukte führt bei Asiaten zu hohen Serumkonzentrationen sogenannter Phytoöstrogene (Adlercreutz et al. 1993, Uehar et al. 2000). Dabei handelt es sich um Polyphenole, die eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Östrogenen aufweisen. Sie gehören zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und dienen unter anderem als Antioxidanzien (Chen und Anderson 2002). Als eine der Hauptgruppen werden die Isoflavone unterschieden (Limer und Speirs 2004).

Klasse	Hauptvertreter	Nahrungsmittel
Isoflavone	Genistein, Daidzein, Glycitein, Puerarin, Daidzin, Genistin, Formonentin, Biochanin A	<i>Hauptquelle:</i> Soja, Kopoubohne <i>Geringere Mengen:</i> Hülsenfrüchte, frisches Obst und Gemüse, Johannisbeeren, Nüsse, Samen, Getreide, Kaffee, Tee
Lignane	Secoisolariciresinol, Matairesinol, Pinoresinol, Lariciresinol, Syringaresinol, Arctigenin, Sesamin	<i>Hauptquelle:</i> Leinsamen <i>Geringere Mengen:</i> frisches Obst und Gemüse, Sesam, Roggen und andere Getreide, Nüsse, Kaffee, Soja
Coumestane	Coumestrol	Rotklee, Bohnensprossen, Alfalfasprossen, Hülsenfrüchte, Gemüse
Prenylierte Flavonoide	8-Prenylnaringenin Resveratrol	Hopfen (Bier) Rote Trauben

Tab. 1-1 Klassifikation der Phytoöstrogene

Einteilung der Phytoöstrogene nach Klassen mit ihren Hauptvertretern und dem Vorkommen in Nahrungsmitteln. Modifiziert nach Reinhard-Hennch et al. (2006), Seite 202.

Die Isoflavone gehören zu den am besten untersuchten Phytoöstrogenen. Wichtigste Nahrungsquelle ist die Sojabohne, in der die Isoflavone Genistein, Daidzein und Glycitein etwa im Verhältnis 10:8:1 vorkommen (Wolters und Hahn 2004). Häufig liegen Isoflavone als Zuckerkonjugate vor und werden erst nach intestinaler bakterieller Hydrolyse als Aglykone resorbiert (Setchell et al. 2002b). Im enterohepatischen Kreislauf können verschiedene weitere Metabolite in Abhängigkeit von der individuellen mikrobiologischen Flora entstehen. Isoflavone wurden im Körper in 10.000 bis 20.000fach höheren Konzentrationen als Östrogene nachgewiesen (Setchell 2001).

Als für die hormonelle Wirkung entscheidende strukturelle Eigenschaft der Isoflavone wird ein aromatischer Ring mit einer Hydroxygruppe sowie der im Vergleich zum Östradiolmolekül nahezu identische Abstand zu einer weiteren Hydroxygruppe angesehen (Setchell und Cassidy 1999). Dagegen ist die östrogene Potenz, abhängig von der Substanz und dem Rezeptorsubtyp, um mehrere Zehnerpotenzen geringer als die des Östradiols (Zand et al. 2000, Wolters und Hahn 2004). Isoflavone weisen außerdem eine höhere Affinität zu ER β als zu ER α auf (Kuiper et al. 1998, Boue et al. 2003).

Isoflavonen und anderen Phytoöstrogenen wird das Potenzial eines natürlichen SERMs zugeschrieben (Brzezinski und Debi 1999). Klassische SERMs entwickeln ihre gewebespezifische Wirkung durch die Aktivierung verschiedener Koregulatoren während der Rezeptor-Liganden-Interaktion (Smith und O'Malley 2004). Dies ist auch ein für Isoflavone diskutierter Mechanismus (An et al. 2001). Darüber hinaus bietet die bevorzugte Bindung an ER β die Möglichkeit einer gewebespezifischen Wirkung, da das Verhältnis der Rezeptorsubtypen zueinander in den Zielorganen verschieden ist und für ER β in einigen Geweben ein inhibitorischer Einfluss auf ER α angenommen wird (Oseni et al. 2008). Durch kompetitive Hemmung könnten Isoflavone bei hohem Östrogenspiegel eher antagonistisch wirken, während andernfalls eine geringere agonistische Wirkung überwiegt (Wolters und Hahn 2004). Die Induktion der Synthese des Sexualhormon-bindenden Globulins (SHBG) stellt eine weitere antiöstrogene Wirkmöglichkeit dar, da viele Isoflavone selber nur eine geringe Affinität zum SHBG aufweisen (Wuttke et al. 2002).

Zahlreiche weitere, nicht ER-vermittelte Effekte werden einigen Isoflavonen zugeschrieben. Dazu gehören die Modulation verschiedener Enzymaktivitäten, antioxidative und antithyreoidale Eigenschaften sowie die Beeinflussung der intrazellulären Signaltransduktion durch Hemmung der Tyrosinkinase (Wuttke et al. 2002, Wolters und Hahn 2004). Häufig scheinen die für diese Effekte notwendigen Substanzkonzentrationen über die normale Nahrungsaufnahme allerdings nicht erreicht werden zu können (Wuttke et al. 2007).

Obwohl Isoflavone in der Öffentlichkeit oft als wirksame und nebenwirkungsfreie Alternative zur HT propagiert werden, sind viele Wirk- und Nebeneffekte und damit verbundene

potenzielle Risiken noch nicht ausreichend bekannt (Wuttke et al. 2002, Reinwald und Weaver 2006). Langzeitstudien, die die Sicherheit dieser Substanzen belegen könnten, liegen nicht vor. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) kommt in einer aktualisierten Stellungnahme vom 29. Oktober 2007 zu dem Schluss, dass die Sicherheit von Nahrungsergänzungsmitteln mit isolierten Isoflavonen auf Soja- und Rotkleebasis nicht ausreichend belegt sei (BfR 2007). Insbesondere bestehe noch Unklarheit über die Beeinflussung von hormonabhängigen Tumoren. *In vitro* sind für Isoflavone dosisabhängig sowohl proliferative als auch antiproliferative Effekte auf Krebszellen beobachtet worden (Dampier et al. 2001). Humane Studien weisen auf östrogene Effekte am Brustdrüsengewebe und dem Endometrium hin (Petrakis et al. 1996, Hargreaves et al. 1999, Unfer et al. 2004). Schutzeffekte gegenüber hormonabhängigen Tumoren sind bisher lediglich im Zusammenhang mit sehr früher Isoflavonexposition, die bereits im Kindes- oder Jugendalter einsetzte, beschrieben (Wolters und Hahn 2004).

1.2 Isoflavone in der Osteoporoseprophylaxe

Unter den verschiedenen Substanzklassen der Phytoöstrogene wird den Isoflavonen das größte Potenzial in der postmenopausalen Osteoporoseprophylaxe zugetraut (Setchell 2001, Chilibeck und Cornish 2008). Die postulierten knochenprotektiven Effekte basieren vor allem auf Erkenntnissen aus *In-vitro*-Studien und Tierversuchen, in denen Isoflavone Östrogen-agonistische Effekte unter Beweis stellten. Dagegen ist die Studienlage bei postmenopausalen Frauen uneinheitlich.

In mehreren *In-vitro*-Studien zeigten Isoflavone Östrogen-agonistische Effekte auf Osteoblasten und Osteoklasten. Isoflavone wirkten inhibierend auf Osteoklasten und stimulierten die Osteoblastenaktivität (Anderson JJ und Garner 1998, Chen und Anderson 2002, Setchell und Lydeking-Olsen 2003). In zahlreichen Tierversuchen an ovariectomierten Ratten erwiesen sich Soja-Protein-Extrakte, kombinierte oder isolierte Isoflavone als knochenprotektiv (Arjmandi et al. 1996, Blair et al. 1996, Fanti et al. 1998, Harrison et al. 1998, Ishimi et al. 1999, Picherit et al. 2001). Im Soja-Protein-Extrakt wurden die Isoflavone als entscheidende knochenprotektive Substanz erkannt (Arjmandi et al. 1998, Picherit et al. 2001).

Dagegen führten Interventionsstudien an postmenopausalen Frauen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Nahrungsergänzungen mit Isoflavonen über einen Zeitraum von bis zu einem Jahr erwiesen sich nur teilweise als wirksam (Potter et al. 1998, Alekel et al. 2000, Morabito et al. 2002, Atkinson C et al. 2004). Andere Studien fanden dagegen keinen antiresorptiven Effekt (Dalais et al. 1998, Hsu et al. 2001, Gallagher et al. 2004, Arjmandi et al. 2005). Auch Langzeitstudien über 2 oder mehr Jahre brachten keine Klarheit. Knochenprotektiven Effekten in einigen Studien standen fehlende Wirksamkeitsnachweise in anderen gegenüber

(Alexandersen et al. 2001, Lydeking-Olsen et al. 2004, Ikeda et al. 2006, Brink et al. 2008, Wong WW et al. 2009, Alekel et al. 2010).

Erklärungen für die bisher uneinheitlichen Ergebnisse bei postmenopausalen Frauen beinhalten, dass möglicherweise nur einzelne Isoflavone knochenprotektiv wirksam waren und die Kombination verschiedener Isoflavone antagonistische Effekte hervorrief (Weaver und Cheong 2005, Geller und Studee 2006). Die Dosis-Wirkungs-Beziehung einiger Isoflavone scheint komplex zu sein. Möglicherweise aktivieren hohe Dosen nach Sättigung der ERs zusätzliche, Östrogen-antagonistische Mechanismen (Anderson JJ et al. 1998, Reinwald und Weaver 2006). Weitere diskutierte Einflussfaktoren sind die unterschiedliche Höhe der individuellen Östrogenkonzentration und die Anzahl exprimierter Östrogenrezeptoren. In viele Studien wurde nicht die Aufnahme weiterer, für den Knochenstoffwechsel essenzieller Ernährungsbestandteile wie Kalzium und Vitamin D gewährleistet. Zudem nimmt möglicherweise der individuelle intestinale Metabolismus bedeutend Einfluss auf die klinische Effektivität der Isoflavone. Dabei könnte der Daidzein-Metabolit Equol eine Schlüsselrolle spielen (Setchell et al. 2002a).

1.2.1 Equol

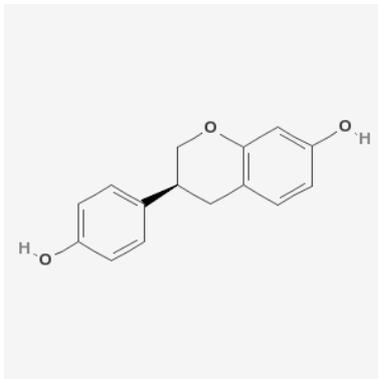


Abb. 1-4 Equol

Summenformel: $C_{15}H_{14}O_3$
Molare Masse: 242,3 g/mol

(PubChem 2010a)

Equol ist kein natürlich vorkommendes Isoflavon, sondern entsteht ausschließlich als Endprodukt des intestinalen bakteriellen Metabolismus des in der Sojabohne häufigen Isoflavons Daidzein (Setchell et al. 2002a). Equol wurde erstmalig im Urin von Stuten isoliert (Marrian und Haslewood 1932). Die östrogene Wirkung trat im Zusammenhang mit massiven Zuchtproblemen an australischen Schafen als sogenanntes *Clover Disease* in Erscheinung (Bennetts et al. 1946). Ursächlich war die Aufnahme großer Mengen isoflavonhaltigen Klees mit resultierender Infertilität. Nur etwa 30 % der Erwachsenen in westlichen Industrienationen sind in der Lage, Equol aus Daidzein zu synthetisieren (Cassidy et al. 2006, Song et al. 2006). Die dafür verantwortlichen Unterschiede in der bakteriellen Mikroflora sind nicht im Einzelnen bekannt (Setchell et al. 2002a). Equol hat eine stärkere Affinität zu den ERs als Daidzein und bindet auch an den ER α stärker als andere Isoflavone (Nagel et al. 1998, Morito et al. 2001). Es befindet sich im Serum zu fast 50 % in ungebundener Form und damit zu einem weit größeren Anteil als Daidzein (19 %) oder Östradiol (5 %) (Nagel et al. 1998). Zudem verfügt Equol über ein großes antioxidatives Potenzial (Arora et al. 1998).

Equol konnte im Tierversuch an Mäusen und Ratten den Rückgang der Knochendichte nach Ovariectomie lindern und zeigte dabei teilweise keine uterotrophen Effekte (Fujioka et al. 2004, Mathey et al. 2007, Rachon et al. 2007b). Stimulierende Effekte am Uterus der Ratte gelten nach dem *Rat Uterotrophic Bioassay* als verlässlicher Nachweis einer Östrogen-agonistischen Wirkung und schränken als Indikator einer potentiell unerwünschten Nebenwirkung die Langzeitsicherheit ein (Owens und Koeter 2003).

Es wird vermutet, dass der individuelle „Equol-Status“ eine Erklärung für die bisher uneinheitlichen Ergebnisse im Zusammenhang mit der Soja- oder Isoflavon-Substitution bei postmenopausalen Frauen darstellen könnte (Setchell et al. 2002a). Einige Studien fanden zusätzliche knochenprotektive Effekte unter Berücksichtigung des individuellen „Equol-Status“ postmenopausaler Frauen (Lydeking-Olsen et al. 2004, Frankenfeld et al. 2006, Wu J et al. 2007).

1.2.2 Genistein

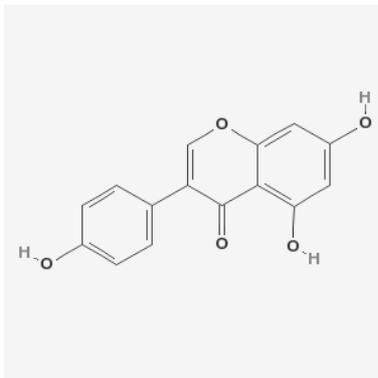


Abb. 1-5 Genistein

Summenformel: $C_{15}H_{10}O_5$
 Molare Masse: 270,2 g/mol
 (PubChem 2010c)

Genistein ist das häufigste Isoflavon in der Sojabohne und weist eine 7 – 30fach höhere Affinität zu ER β als zu ER α auf (Kuiper et al. 1998). Röntgenkristallografisch zeigte sich ein ähnliches Bindungsverhalten an den ER-Komplex wie für den SERM Raloxifen (Pike et al. 1999).

Für Genistein konnte die Inhibition von Osteoklasten und die Stimulation von Osteoblasten *in vitro* gefunden werden (Gao und Yamaguchi 2000, Sugimoto und Yamaguchi 2000). Ähnlich wie Östrogene stimulierte Genistein die Synthese des molekularen Osteoklasten-Inhibitors Osteoprotegerin in Osteoblasten (Chen et al. 2002, Viereck et al. 2002).

Daneben wurde die ER-unabhängige Beeinflussung zahlreicher intrazellulärer Prozesse gezeigt. Dazu gehören die Inhibition der Topoisomerasen I und II, der Tyrosinkinase und weiterer Transduktionsmechanismen und Ionenkanäle (Akiyama et al. 1987, Blair et al. 1996, Kim H et al. 1998, Okamoto et al. 2001).

Im Tierversuch an ovariectomierten Mäusen und Ratten zeigte Genistein knochenprotektive Effekte bei teilweise fehlender uterotropher Wirkung (Blair et al. 1996, Fanti et al. 1998, Ishimi et al. 1999, Ishimi et al. 2000). Anderson JJ et al. (1998) entdeckten zudem eine komplexe Dosis-Wirkungs-Beziehung für den antiresorptiven Effekt am Knochen.

In einer 1-jährigen Interventionsstudie an postmenopausalen Frauen konnten 54 mg Genistein/Tag die Knochendichte am Schenkelhals und der lumbalen Wirbelsäule steigern (Morabito et al. 2002). Genistein war dabei in der Effektivität der HT gleichwertig und zeigte in dieser Dosierung keine östrogenen Effekte auf den Uterus oder die Mamma.

1.2.3 Puerarin

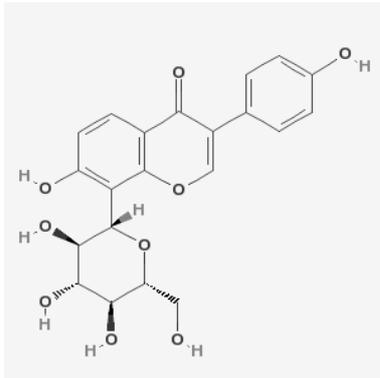


Abb. 1-6 Puerarin

Summenformel: $C_{21}H_{20}O_9$

Molare Masse: 416,4 g/mol

(PubChem 2010d)

Puerarin kommt als häufigstes Isoflavon in der Wurzel der Kopoubohne (*Pueraria lobata*, Kudzu) vor (Prasain et al. 2007, Reppert et al. 2008). Die Kopoubohne gehört zur Familie der Hülsenfrüchte und stammt ursprünglich aus Asien. Mittlerweile hat sie sich auch im Südosten der USA sprunghaft ausgebreitet (Pappert et al. 2000). Wurzelextrakte der Kopoubohne finden seit Jahrhunderten verbreitet Anwendung in der traditionellen chinesischen Medizin (Wang et al. 2003, Zhang et al. 2007). Sie erwiesen sich *in vitro* als potente ER β -Stimulatoren und zeigten eine geringere agonistische Aktivität auf ER α (Boue et al. 2003). Als Substanz mit der höchsten östrogenen Wirkung auf hormonsensitive Mammakarzinom-Zelllinien wurde Puerarin im Wurzelextrakt identifiziert. Bei Puerarin handelt es sich um die C-glykosylierte Form des Daidzein (Daidzein 8-C-Glykosid) (Reppert et al. 2008). Allgemein wird der Vorteil der Glykosylierung in einer Art Speicherfunktion gesehen, die Resorption wird verzögert und der Serumspiegel steigt vergleichsweise langsam an (Setchell et al. 2001). Im Gegensatz zu den O-glykosylierten Isoflavonen sind die C-glykosylierten Formen gegenüber der bakteriellen Hydrolyse stabiler und können zum Teil intakt resorbiert werden, wie es auch für isoliertes Puerarin gezeigt wurde (Prasain et al. 2004). Nicht eindeutig geklärt ist dagegen, wie Puerarin intrazellulär wirksam werden konnte, da es als Glykosid als vergleichsweise hydrophil gilt. Möglicherweise existieren spezifische Transportmechanismen, so wurde für Puerarin auch das Überschreiten der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen (Prasain et al. 2004).

In vitro zeigten Wurzelextrakte der Kopoubohne sowie isoliertes Puerarin stimulierende Effekte auf Osteoblasten (Huh et al. 2006, Zhang et al. 2007). An ovariectomierten Mäusen waren Wurzelextrakte der Kopoubohne knochenprotektiv und führten in hoher Dosierung sogar zu einer Zunahme der Knochendichte (Wang et al. 2003). Das Uterusgewicht wurde nicht beeinflusst. Lokal appliziertes Puerarin konnte zudem die Knochensynthese an künstlich gesetzten Knochendefekten steigern (Wong R und Rabie 2007).

1.3 Knochenadaptation auf mechanische Stimulation

Dass Knochengewebe auf mechanische Einflüsse reagiert und seine innere und äußere Struktur nach physikalischen Gesetzen ausrichtet, wurde erstmalig systematisch vom Berliner Arzt Julius Wolff im „Gesetz der Transformation der Knochen“ beschrieben (Wolff 1892). Frost entwarf das Mechanostat-Modell, nach dem Knochenadaptationsprozesse über eine negative Rückkopplung gesteuert werden (Frost 1987). Als Regelgröße werden die durch mechanische Belastung hervorgerufenen lokalen elastischen Knochenverformungen gesehen. Das Mechanostat gibt minimale und maximale Sollwerte für verschiedene mit den Knochenverformungen einhergehende Signale vor und reguliert über Adaptationsprozesse die Mikro- und Makrostruktur des Knochens. Das Modell berücksichtigt, dass sich die Knochenfestigkeit der jeweils aktuellen mechanischen Umgebung anpasst und wirksame mechanische Stimuli gewisse Schwellenwerte überschreiten müssen. Zusätzlich nehmen zahlreiche nicht mechanische Faktoren regulatorisch Einfluss.

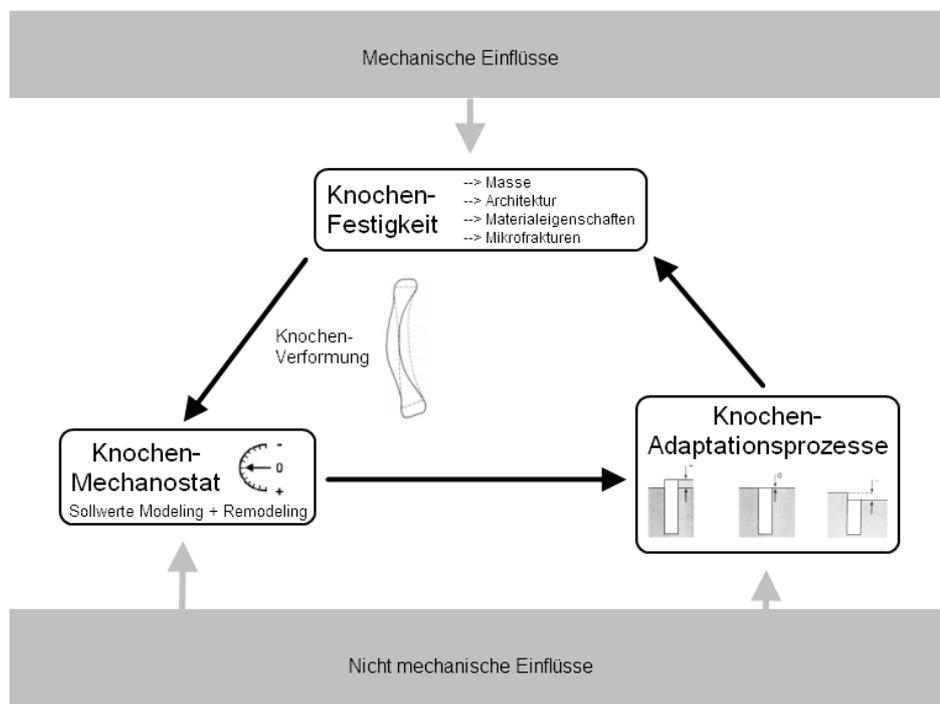


Abb. 1-7 Mechanostat-Modell nach Frost

Das Mechanostat-Modell beschreibt eine negative Rückkopplung zur Regulation der Knochenfestigkeit. Regelgröße ist die durch einwirkende mechanische Kräfte hervorgerufene Knochenverformung. Als Knochenadaptationsprozesse werden Modeling („Wachstum“, Knochenmasse \uparrow) und Remodeling („Umsatz“, Knochenmasse \leftrightarrow oder \downarrow) unterschieden. Zahlreiche nicht mechanische Faktoren fördern oder reduzieren durch direkte Beeinflussung der Adaptationsprozesse und/oder der regulatorischen Schwellenwerte die Knochenadaptation. Beispiele sind Hormone, Kalzium, Vitamine, Geschlecht, Alter und Medikamente. Modifiziert nach Frost (2003), Seiten 1085, 1086 und Frost (2004), Seite 5 und 7.

Demnach beeinflussen Östrogene neben ihrer direkten Wirkung auf die Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität auch die regulatorischen Sollwerte des Mechanostats und steigern darüber die Mechanosensitivität des Knochengewebes. Diese Hypothese wird durch die sich stark ähnelnden knochenarchitektonischen Veränderungen nach Aufhebung der mechanischen sowie der östrogenen Stimulation unterstützt (Westerlind et al. 1997, Frost 1999). Auch nach Einsetzen der Menarche finden sich Hinweise auf eine gesteigerte Mechanosensitivität des Knochengewebes, da Mädchen gegenüber Jungen plötzlich eine Zunahme der Knochenmasse relativ zur Muskelmasse aufweisen (Schiessl et al. 1998). Zudem bietet das Mechanostat-Modell eine plausible Erklärung für das plötzliche Einsetzen, den schnellen Verlust und die Selbstlimitierung der frühen Phase des postmenopausalen Knochenmasseverlustes (Frost 1999).

Als komplex haben sich die Eigenschaften knochenanaboler mechanischer Stimulationen herausgestellt. Durch mechanische Kräfte hervorgerufene elastische Knochenverformungen (angegeben als *Strain* $E = \text{Quotient aus Längenänderung } \Delta l \text{ und Länge } l$) beinhalten Stauchung, Streckung, Verdrehung und/oder Beugung. Als ein wichtiger knochenanaboler Parameter wurde deren maximaler Betrag erkannt (Rubin und Lanyon 1985). Dieser bewegt sich von $<1000 \mu\text{E}$ bei geringen körperlichen Aktivitäten bis zu etwa $4000 \mu\text{E}$ bei sehr starken körperlichen Belastungen (Frost 1997). Die knochenanabole Wirksamkeit mechanischer Stimuli wird zudem durch hohe Verformungsgeschwindigkeiten, ungewöhnliche Belastungsmuster und intermittierende Reize gesteigert (Turner CH 1998, Ehrlich und Lanyon 2002, Borer 2005).

Relativ neu ist die Erkenntnis, dass auch sehr geringe elastische Verformungen ($<10 \mu\text{E}$) knochenanaboles Potenzial besitzen können (Rubin et al. 2001b, Xie et al. 2006). Diese liegen weit unterhalb der üblicherweise mit knochenanabolen mechanischen Stimuli in Verbindung gebrachten Knochenverformungen, treten aber als Folge isometrischer Muskelaktivität ubiquitär und langanhaltend auf (Fritton et al. 2000). Interessanterweise kommt es durch den im Alter beobachteten Rückgang der Muskelmasse auch zu einem Verlust dieser Stimuli (Huang et al. 1999, Rubin et al. 2006). Damit solch geringe elastische Verformungen knochenanabol wirksam werden können, ist eine hochfrequente Applikation im Bereich von 10 – 100 Hz erforderlich (Ehrlich und Lanyon 2002, Judex et al. 2007, Judex und Rubin 2010).

Den Osteozyten und dem sie umgebenden kanälchenartigen Netzwerk werden eine entscheidende Rolle bei der Wahrnehmung mechanischer Signale zugeschrieben (Burger und Klein-Nulend 1999). Osteozyten stehen innerhalb der *Canaliculi* über *Gap Junctions* an ihren Zytoplasmafortsätzen untereinander und mit Osteoblasten in direkter Verbindung. Knochenverformungen führen zur Steigerung des extrazellulären Flüssigkeitsflusses innerhalb des kanälchenartigen Netzwerks (Piekarski und Munro 1977, Knothe Tate et al.

1998). Zu den sensorischen Mechanismen werden daraus resultierende Scherspannungen und elektrische Strömungspotentiale gerechnet. Daneben scheinen Osteozyten auch direkt gegenüber mechanischer Verformung sensibel zu sein (Ehrlich und Lanyon 2002). Weitgehend ungeklärt ist die Sensorik kleiner, hochfrequenter Stimuli, welche zu keinen nennenswerten Knochenverformungen führen und für die noch zusätzliche sensorische Mechanismen angenommen werden (Garman et al. 2007, Judex et al. 2007, Judex und Rubin 2010).

1.3.1 Körperliche Trainingsprogramme in der Osteoporoseprophylaxe

Von traumatischen Ereignissen abgesehen werden die stärksten auf das Skelettsystem einwirkenden Kräfte durch Muskelkontraktionen hervorgerufen und die Muskel-Knochen-Interaktion auch als funktionelle Einheit betrachtet (Schiessl et al. 1998). Folgerichtig weisen körperlich aktive Menschen höhere Knochendichten auf als inaktive (Chilibeck et al. 1995). Nach der Menopause bewirkt körperliche Aktivität einen verlangsamten Knochenmasseverlust (Kelley et al. 2001, Kelley et al. 2002). Daneben weisen körperlich aktive postmenopausale Frauen auch eine geringere Inzidenz von Frakturen auf (Gregg et al. 1998, Hoidrup et al. 2001, Feskanich et al. 2002).

Die Frakturprävention durch körperliche Aktivität scheint neben einer höheren Knochenstabilität auch durch die geringere Sturzinzidenz bedingt zu sein. Aufgrund der Verminderung von Sturzangst und dem Erhalt physischer Aktivität werden körperliche Trainingsprogramme im Rahmen der Prävention osteoporotischer Frakturen zunehmend als bedeutsam erkannt (Kohrt et al. 2004, Felsenberg und Dietzel 2008).

Wie ein optimales knochenprotektives Trainingsprogramm im Alter aussehen könnte, ist Gegenstand aktueller Forschung. Entsprechend der knochenanabolen Wirksamkeit stärkerer Knochenverformungen haben sogenannte *High-impact*-Übungen (Trainingsformen, bei denen die Füße gleichzeitig vom Boden abheben, z.B. Laufen oder Sprungelemente) bei jungen Menschen ein besonders hohes osteogenes Potenzial (Taaffe et al. 1997, Nordstrom et al. 1998). Postmenopausale Frauen scheinen dagegen geringere Knochenreaktionen auf starke Trainingsreize zu zeigen (Bassey et al. 1998). Sehr intensive Trainingsformen sind mit einem hohen Verletzungsrisiko behaftet und können durch die Akkumulation von Mikrofrakturen den Knochen schädigen (Nunamaker et al. 1990, Frost 1998). Ob Reparaturmechanismen auch im Alter ausreichend wirksam sind, ist fraglich (Rittweger 2006). Eine weitere Besonderheit älterer Menschen ist die insgesamt schlechte Trainings-Compliance, insbesondere für nicht betreute häusliche Bewegungsprogramme (Preisinger et al. 2001, Mayoux-Benhamou et al. 2005). Trainingsreize müssen jedoch dauerhaft aufrechterhalten werden, um ihre Wirksamkeit auf den Knochen nicht zu verlieren.

1.3.2 Vibrationstraining

Vibrationstraining ist eine relativ neue Methode körperlichen Trainings. Ursprünglich wurde es als Trainingsunterstützung für Sportler und Raumfahrer genutzt und zeigte in mehreren Studien positive Effekte auf die Muskelleistung (Cardinale und Bosco 2003, Gilsanz et al. 2006). Jankovich (1972) erkannte bereits früh den knochenstabilisierenden Effekt chronischer Vibrationen an Ratten.

Vibrationen werden in der Arbeitsmedizin allgemein als schädlich für das muskuloskeletale System angesehen und Expositionszeiten sind durch Normen reglementiert worden (Griffin 1998). Chronische Vibrationen werden unter anderem mit der Pathogenese lumbaler Rückenschmerzen und dem Raynaud-Syndrom in Verbindung gebracht (Dandanell und Engstrom 1986, Wilder und Pope 1996). Vibrationstraining basiert dagegen auf regelmäßigen kurzen Einheiten hochfrequenter und kleinamplitudiger Schwingungen, für die keine gesundheitschädlichen Wirkungen angenommen werden (Rubin et al. 2003). Aufgrund der vielen denkbaren Vibrationsprotokolle und der bisher geringen klinischen Erfahrung sollte deren Anwendung dennoch mit Vorsicht erfolgen (Cardinale und Wakeling 2005).

Die Intensität eines Vibrationstrainings wird durch die Parameter Frequenz und Amplitude sowie die dadurch hervorgerufene Beschleunigung bestimmt. Sinusförmige Schwingungen lassen sich durch eine über die Füße applizierte Ganzkörper-Vibration (WBV, *Whole Body Vibration*) effektiv auf das menschliche Skelettsystem übertragen (Rubin et al. 2003). Ganzkörper-Vibrationsgeräte bestehen aus einer Vibrationsplatte, die in vertikaler Richtung sinusförmig oszilliert. Dabei bewegt sich entweder die ganze Platte gleichförmig auf und ab oder sie schwingt in wechselnder vertikaler Richtung über einer zentral gelagerten Achse. Vibrationen können auf diese Weise über einen Frequenzbereich von üblicherweise 10 - 100 Hz mit Amplituden von <1 - 10 mm und maximalen Beschleunigungen von bis zu 20 g appliziert werden (Cardinale und Wakeling 2005, Judex und Rubin 2010). Zwei mögliche Erklärungsansätze unterstützen die Wirksamkeit des Vibrationstrainings auf den Knochen (Rittweger 2006).

Zum einen wird in der Muskel-Knochen-Interaktion die Grundlage des Vibrationstrainings gesehen. Vibrationen größerer Amplitude und Beschleunigung mit den durch sie hervorgerufenen Muskeigenreflexen werden daher die deutlichsten Effekte zugeschrieben (*High Magnitude Vibration*, Beschleunigung >1 g). Häufig beinhalten solche Vibrationsprotokolle zusätzliche Bewegungsübungen auf der Vibrationsplatte. An Ratten konnte ein vergleichsweise intensives Vibrationstraining (Beschleunigung von 2 g bei 50 Hz, 30 min/Tag für 5 Tage/Woche über insgesamt 12 Wochen) den Knochenmasseverlust nach Ovariectomie teilweise verhindern (Flieger et al. 1998). Als Trainingsunterstützung begrenzte Vibrationstraining den durch Schwerelosigkeit-simulierende strikte Bettruhe hervorgerufenen

Knochenmasseverlust junger Männer wirksam (Rittweger et al. 2010). Postmenopausale Frauen zeigten einen Knochenmassezugewinn am Schenkelhals nach 6-monatigem progressiven Vibrationstraining (Beschleunigung von 2,3 – 5 g bei 35 – 40 Hz, maximal 30 min/Tag an 3 Tagen/Woche), welches ein Gymnastiktraining auf der Vibrationsplatte beinhaltete (Verschueren et al. 2004). Das Vibrationstraining war dabei einem konventionellen Krafttraining überlegen und zeigte zusätzlich positive Effekte auf Muskelkraft und Gleichgewicht.

Ein zweiter Erklärungsansatz schreibt Vibrationen direkte frequenzabhängige Effekte zu, ohne dass die hervorgerufene Beschleunigung und die damit einhergehende Vibrationsintensität groß sein müssen (*Low Magnitude Vibration*, Beschleunigung <1 g). Eine 12-monatige Vibrationsbehandlung (Beschleunigung 0,3 g bei 30 Hz, 20 min/Tag für 5 Tage/Woche) der Hinterläufe von Schafen erhöhte die spongiöse pQCT-Knochendichte im proximalen Femur um 34 % (Rubin et al. 2001b). Histomorphometrische Analysen zeigten eine Vergrößerung des spongiösen Knochenvolumens und eine Zunahme der Trabekelanzahl trotz der auf der Knochenoberfläche gemessenen sehr geringen elastischen Knochenverformungen von maximal 5 μ E (Rubin et al. 2002a, Rubin et al. 2002b). Ähnlich wurden histomorphometrische Parameter ovariektomierter Ratten durch ein Vibrationstraining (Beschleunigung 0,15 g bei 90 Hz, 10 min/Tag über 28 Tage) bei ebenfalls nur minimalen elastischen Knochenverformungen beeinflusst (Judex et al. 2007). Bei Kindern mit zerebralen Bewegungsstörungen fanden sich Zunahmen der spongiösen pQCT-Knochendichte in der proximalen Tibia nach 6-monatigem Vibrationstraining (Beschleunigung 0,3 g bei 90 Hz, 10 min/Tag für 5 Tage/Woche), während die Kontrollgruppe Knochendichte verlor (Ward et al. 2004). Bei postmenopausalen Frauen konnte durch ein einjähriges Vibrationstraining geringer Intensität (Beschleunigung 0,2 g bei 30 Hz, 2 x 10 min/Tag für 7 Tage/Woche) bei guter Compliance der Knochenmasseverlust an der Lendenwirbelsäule und am Schenkelhals erfolgreich reduziert werden (Rubin et al. 2004).

Insbesondere im höheren Lebensalter könnte Vibrationstraining aufgrund der geringen Trainingsintensität und der nur kurzen Trainingseinheiten eine interessante Alternative oder Ergänzung zu klassischen Trainingsprogrammen darstellen. In einer vom Zentrum für Muskel- und Knochenforschung der Charité Berlin in Absprache mit der Leitlinien-Kommission des Dachverbandes Osteologie erarbeiteten „Leitlinie Physiotherapie und Bewegungstherapie bei Osteoporose“ wird die klinische Relevanz bisheriger Studien zur Wirksamkeit des Vibrationstrainings aufgrund kleiner Fallzahlen und unterschiedlicher Vibrationsverfahren als gering eingeschätzt (Felsenberg und Dietzel 2008). Dennoch wird ein großes Forschungspotenzial auf dem Gebiet des Vibrationstrainings gesehen und weitere Studien gefordert.

1.4 Pro und Contra: Kombinierte mechanische und östrogene Knochenstimulation

Sowohl Östrogene als auch mechanische Einflüsse gelten als wichtige Regulatoren des Knochenmetabolismus (Frost 1999, Riggs et al. 2002). Möglicherweise reduziert jedoch der geringe Östrogenspiegel nach der Menopause die Adaptationsfähigkeit des Knochens auf mechanische Stimulation (Lanyon und Skerry 2001). Entsprechend der mechanosensibilisierenden Rolle der Östrogene im Mechanostat-Modell scheint eine Kombination von mechanischer und östrogenen Stimulation sinnvoll zu sein. Mehrere Studien fanden anhand der DXA-Knochendichte für die kombinierte Anwendung von körperlichem Training und Hormontherapie die effektivste Reduktion des postmenopausalen Knochenmasseverlustes (Notelovitz et al. 1991, Kohrt et al. 1995, Kohrt et al. 1998, Milliken et al. 2003, Villareal et al. 2003).

Unter Berücksichtigung der Knochenarchitektur zeigt sich der positive Einfluss der Östrogene vor allem am spongiosen und endokortikalen Knochen (Jarvinen et al. 2003). Dagegen lassen sich bei Betrachtung des periostalen Knochens auch Unterschiede im knochenarchitektonischen Erscheinungsbild von östrogenen und mechanischer Knochenstimulation beobachten. Nur bei geringen Östrogenspiegeln finden sich als Reaktion auf mechanische Stimulation deutliche periostale Knochenzuwächse, wie sie bei Mädchen vor der Pubertät oder Männern beobachtet werden (Bass et al. 2002, Bouillon et al. 2004). Dagegen fällt mit Einsetzen der Pubertät und steigendem Östrogenspiegel die periostale Knochenapposition bei Frauen nur noch gering aus, dann dominieren endokortikale Zuwächse (Bass et al. 2002). Erst nach der Menopause lässt sich die periostale Knochenapposition wieder deutlicher stimulieren (Ahlborg et al. 2003, Uusi-Rasi et al. 2003). Diese leistet einen wichtigen Beitrag zur Knochenstabilität (Ahlborg et al. 2003, Seeman 2008). Die Suppression der periostalen Knochenapposition unter Östrogen-Substitution konnte auch am Osteoporose-Modell der ovariectomierten Ratte bestätigt werden (Turner RT et al. 1987, Kim BT et al. 2003). Während viele Tierstudien knochenarchitektonische Parameter berücksichtigten, ist die häufig an postmenopausalen Frauen angewendete DXA-Knochendichtemessung zur isolierten Beurteilung des kortikalen Knochens nicht geeignet (Schoenau et al. 2004).

Im Hinblick auf die Kombination von östrogenen und mechanischer Knochenstimulation ist auch die Beteiligung der Östrogenrezeptoren an der Mechanotransduktion interessant. Da deren Expression im Knochen positiv mit der Östrogenkonzentration korreliert, könnten östrogene und mechanische Einflüsse im Östrogenrezeptor eine wichtige Schnittstelle besitzen (Lanyon und Skerry 2001, Lee et al. 2003). Östrogene und mechanische Stimulation teilen mindestens einen gemeinsamen molekularen Transduktionsmechanismus,

welcher den ER α beinhaltet (Lee und Lanyon 2004). Die *in vitro* zu beobachtende Osteoblastenproliferation nach mechanischer Stimulation konnte durch medikamentöse ER α -Blockade reduziert werden (Damien et al. 1998, Cheng et al. 2002). Auch *in vivo* zeigten ER α -Knockout-Mäuse eine verminderte periostale Knochenapposition nach mechanischer Stimulation sowie ein reduziertes Knochenwachstum (Lindberg et al. 2001, Lee et al. 2003).

Der Einfluss des ER β wird dagegen kontrovers diskutiert. ER β erwies sich *in vitro* als hinderlich auf die Osteoblastenproliferation nach mechanischer Stimulation und *in vivo* zeigten weibliche ER β -Knockout-Mäuse eine Zunahme der Knochendurchmesser (Windahl et al. 1999, Lee et al. 2004). Es ist daher vermutet worden, dass die Aktivierung des ER β die Mechanotransduktion behindern und die reduzierte periostale Knochenapposition erklären könnte (Saxon und Turner 2005). Erstaunlich ist jedoch, dass ER β überwiegend im spongiosen Knochen exprimiert wird (Onoe et al. 1997, Bord et al. 2001). Zudem finden sich auch Hinweise auf eine positive Beeinflussung der Mechanotransduktion. Nach mechanischer Stimulation zeigten ER β -Knockout-Mäuse eine ähnlich gestörte periostale Knochenapposition wie ihre ER α -Knockout-Pendants (Lee et al. 2004). Auch am spongiosen Knochen sind positive Einflüsse des ER β beschrieben (Lindberg et al. 2001).

Da die Isoflavone als bevorzugte ER β -Stimulatoren gelten, dürfte deren Einfluss auf die Knochenadaptation ebenfalls interessant sein. Bisher liegen nur wenige Erkenntnisse über eine kombinierte Anwendung von Isoflavonen und mechanischer Stimulation vor. In einer einjährigen Studie zur kombinierten Anwendung von körperlichem Training in Form eines Walking-Programms und täglicher Isoflavon-Substitution verhinderte die Kombination am wirksamsten den DXA-Knochendichteverlust postmenopausaler Frauen (Wu J et al. 2006). Studien an ovariectomierten Ratten und Mäusen kamen anhand eines Bruchtests bzw. von pQCT-Parametern zu der Einschätzung, dass die Knochenstabilität durch die Kombination von Laufradtraining und Genistein-Substitution am wirksamsten erhalten wurde (Nakajima et al. 2001, Wu J et al. 2001). Eine Behinderung der periostalen Knochenapposition ist für Isoflavone bisher nicht beschrieben worden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass östrogene Einflüsse für die Knochenadaptation am spongiosen Knochen eher förderlich, am kortikalen Knochen jedoch auch hinderlich sein können. Einer genauen knochenarchitektonischen Beurteilung kommt daher besondere Bedeutung zu. Isoflavone sind selten in Kombination mit Trainingsprogrammen untersucht worden. Jedoch deuten die wenigen vorhandenen Studien auf einen positiven Effekt hinsichtlich der Knochenstabilität hin. Die Kombination von Vibrationstraining und Isoflavon-Substitution wurde bisher nicht untersucht.

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Durch den demografischen Wandel nimmt der Anteil alter und hochaltriger Menschen in den Industrienationen stetig zu. Gleichzeitig steigt mit dem Alter die Prävalenz der Osteoporose. Frauen sind aufgrund der geringeren Knochenmasse und des schnellen postmenopausalen Knochenmasseverlustes besonders gefährdet, bereits früh Fragilitätsfrakturen zu erleiden.

Zwar existieren verschiedene spezifische Pharmaka zur Festigung des Knochens, deren Anwendung wird jedoch nur bei bereits reduzierter DXA-Knochendichte und hohem Frakturrisiko empfohlen. Zur effektiveren Vermeidung von Osteoporose-bedingten Frakturen wäre es daher wünschenswert, den postmenopausalen Knochenmasseverlust möglichst frühzeitig zu verhindern oder zu verlangsamen. Dazu werden verschiedene Basismaßnahmen empfohlen, zu denen auch regelmäßige körperliche Aktivität gehört.

Mechanische Stimuli sind wichtige Regulatoren des Knochenmetabolismus. Körperliches Training besitzt auch im Alter das Potenzial, sowohl die Knochenfestigkeit als auch das Sturzrisiko günstig zu beeinflussen. Allerdings müssen Trainingsprogramme im Alter berücksichtigen, dass das Verletzungsrisiko steigt und die Compliance meist schlecht ist. Gerade die dauerhafte Anwendung prophylaktischer Maßnahmen ist jedoch entscheidend für deren Wirksamkeit. Eine mögliche Alternative oder Ergänzung könnte ein körperlich wenig belastendes, nur kurze Trainingseinheiten erforderndes, Vibrationstraining sein. Verschiedene Vibrationsprotokolle unterschiedlicher Intensität haben sich bereits als antiresorptiv oder osteoanabol erwiesen.

Allerdings ist die Mechanosensitivität des Knochens durch den postmenopausalen Östrogenmangel möglicherweise reduziert und könnte zu einer geringeren Wirksamkeit von Trainingsprogrammen führen. Die postmenopausale Östrogen-Substitution hat sich als wirksame Frakturprophylaxe erwiesen, jedoch verhindert das mit ihr verbundene Risikoprofil eine dauerhafte Anwendung. Als mögliche Alternative gelten die Isoflavone aus der Gruppe der Phytoöstrogene. Diese besitzen zwar eine geringere östrogene Potenz, jedoch verspricht man sich eine knochenselektivere Wirkungsweise verbunden mit einem niedrigeren Risikoprofil. Die bisher vorliegenden Studien deuten auf eine positive Beeinflussung der Knochenstabilität durch zusätzliche Isoflavon-Substitution hin.

Das erhoffte Ziel dieser Arbeit war daher, mithilfe der Isoflavone den Vibrationseffekt auf den Knochen zu verbessern. Die Studie fand am gut etablierten Osteoporose-Modell der ovariectomierten Ratte statt und sollte Rückschlüsse auf die Prophylaxe der postmenopausalen Osteoporose der Frau zulassen. Der Schwerpunkt der Analyse lag in der histomorphometrischen Beurteilung der Knochenarchitektur.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuch

2.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für diesen Tierversuch in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Göttingen standen 120 weibliche Sprague-Dawley-Ratten (Züchter Winkelmann, Borchen) zur Verfügung, die zu je 6 Tieren in *Makrolon*[®]-Käfigen gehalten wurden. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn 3 Monate alt und wogen zwischen 220 und 230 g. Während des gesamten Versuchszeitraums stand ihnen Futter und Wasser zur freien Verfügung. Die Beleuchtung des Raumes erfolgte im 12-Stunden-Rhythmus von 6:00 – 18:00 Uhr. Die Raumtemperatur wurde bei 22 – 24 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 – 55 % konstant gehalten. Die Versuchstiere erhielten bis zu Versuchsbeginn soja- und isoflavonfreies Pelletfutter (*SM R/M 10 mm Pellet*, Ssniff Spezialdiäten, Soest). Soja als häufige Proteinquelle in Rattennahrung war in dieser Futtermischung durch isokalorische Kartoffel-Protein-Zugabe ersetzt worden.

Für den Versuch lag eine Genehmigung durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit vom 03.03.2006 vor (AZ 33.42502-032/06).

2.1.2 Ovarektomie

2 Tage vor Versuchsbeginn erfolgte die Ovarektomie der Tiere. Unter CO₂-Narkose wurde ein Gemisch aus Xylazin und Ketamin *intrapertoneal* gespritzt. Der Zugang zur Bauchhöhle erfolgte durch zwei etwa 1,5 cm lange Schnitte jeweils dorsokaudal des Rippenbogens. Die beiden Ovarien wurden freipräpariert, mit Hilfe eines sterilen, resorbierbaren Fadens abgebunden und mit einem Skalpell entfernt. Die eröffneten Muskelschichten wurden mit sterilem Nahtmaterial verschlossen und der Hautschnitt geklammert.

Jedes Tier erhielt zur eindeutigen Kennzeichnung einen 2 × 13 mm großer Transponder-Chip (*Micro ID*[®], UNO, Zevenaar, Holland) subkutan in der Nackenregion implantiert.

2.1.3 Testsubstanzen

Unmittelbar nach Ovarektomie wurden 10 verschiedene Gruppen zu jeweils 12 Tieren gebildet. Jeder Testsubstanz war eine Vibro-Gruppe (mit zusätzlichem Vibrationstraining) sowie eine Non-Vibro-Gruppe zugeordnet. Die zwei sojafreien Kontrollgruppen (Co-SF und Co-SF Vibro) erhielten weiterhin das soja- und isoflavonfreie Pelletfutter. Zwei weitere Gruppen dienten als positive Östradiol-Kontrollen (E2 und E2 Vibro). Das Östradiol-Futter wurde durch Beimischung von 17β-Estradiol-Benzoeat (Sigma-Aldrich Chemie, München) durch die Firma Ssniff Spezialdiäten hergestellt. Den Isoflavon-Gruppen wurden die

Substanzen Equol, Genistein und Puerarin mit dem Futter verabreicht. Die gereinigten Isoflavone wurden in Pulverform aus China importiert (Changzhou Dahua Imp. & Exp. Group, Jiangsu, China) und dann der Firma Ssniff Spezialdiäten zur Einmischung zur Verfügung gestellt.

Es ergab sich folgende Gruppeneinteilung mit den jeweiligen Substanzmengen:

Gruppe	Substanzmenge pro kg Futter
Co-SF	
Co-SF Vibro	
E2	4,3 mg
E2 Vibro	4,3 mg
Equol	400 mg
Equol Vibro	400 mg
Genistein	1000 mg
Genistein Vibro	1000 mg
Puerarin	3000 mg
Puerarin Vibro	3000 mg

Tab. 2-1 Gruppeneinteilung mit Substanzmengen

2.1.4 Vibrationstraining

Das Vibrationstraining erfolgte mit der Ganzkörper-Vibrationsplatte *SWINGVIBE® Professional* (Vertrieb: Best-Sportequipment, Weilburg). Es handelte sich um ein Vibrationsgerät, wie es für den kommerziellen Einsatz in Fitness-Studios oder Physiotherapie-Einrichtungen vertrieben wird.

Folgende Vibrationsparameter wurden verwendet:

Frequenz	30 Hz
Amplitude	2 mm (gleichförmig auslenkende Platte)
Dauer	15 min/Tag über 3 Monate (14 Wochen)

Tab. 2-2 Vibrationsparameter

Auf der aus Edelstahl gefertigten Standplatte mit einer Abmessung von 94 × 46 cm waren zwei streufreie Käfige fest und rutschsicher mit Spanngurten fixiert. Erst unmittelbar vor Vibrationsbeginn wurden die Tiere aus ihren Haltungskäfigen dorthin umgesetzt. Das Vibrationstraining fand immer in den frühen Morgenstunden zwischen 6:00 und 11:00 Uhr statt. Die Reihenfolge, nach der die verschiedenen Versuchsgruppen zum Vibrationstraining ausgewählt wurden, wechselte täglich nach einem Rotationsprinzip.

2.1.5 Versuchsablauf

Nach einer Regenerationszeit von 2 Tagen nach Ovariectomie wurde mit dem täglichen Vibrationstraining begonnen. Auch die Non-Vibro-Tiere gleicher Futtergruppe befanden sich während des Vibrationstrainings im selben Raum und waren den Begleitgeräuschen sowie dem Transport ausgesetzt. Zudem wurden sie analog zur Vibro-Gruppe in streufreie Käfige umgesetzt.

Das Verhalten der Versuchstiere während der Vibration wurde stets beobachtet. Zu Versuchsbeginn neigten die Tiere dazu, sich in einer Käfigecke zu versammeln und dort nebeneinander zu verharren oder erfolglos aufeinander zu klettern. Dieses Verhalten änderte sich innerhalb der ersten Versuchstage. Sämtliche Tiere waren nun deutlich aktiver, richteten sich am Käfiggitter auf und zeigten über die gesamte Trainingszeit einen ausgeprägten Bewegungsdrang. Dies wurde von der betreuenden Tierärztin im Sinne eines Erkundungs- und Neugierdeverhaltens gewertet. Ein ähnliches Verhalten konnte auch bei den ebenfalls anwesenden Non-Vibro-Tieren festgestellt werden.

Zweimal wöchentlich wurde die Futteraufnahme der Tiere kontrolliert und das Körpergewicht in den Versuchswochen eins, vier, sieben, zwölf und dreizehn bestimmt. In der 14. Woche erfolgte die abschließende pQCT-Messung. Zum Ende der Woche wurde das Vibrationstraining beendet und die Tiere in CO₂-Narkose durch Dekapitierung getötet. Die Tibiae wurden unmittelbar freipräpariert, entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren.

2.2 Herstellung der Knochenpräparate

2.2.1 Acrylat-Einbettung

Die aufgetauten Tibiae wurden mit Hilfe einer Kneifzange im Bereich der mittleren Diaphyse durchtrennt und zur weiteren Verarbeitung in kleinen Glasbehältern aufbewahrt. Im ersten Schritt erfolgte die Fixierung. In 70%igem Ethanol wurden die Tibiastücke 3 Tage lang aufbewahrt und anschließend für jeweils 24 Stunden in 80%igem, 90%igem und 100%igem Ethanol zunehmend entwässert. Ein Gemisch aus 100%igem Ethanol und Aceton (Verhältnis 1:1), ebenfalls für 24 Stunden, diente der Entfettung. Es folgte die Durchtränkung der Tibiae mit einem Methylmethacrylat (MMA)-Gemisch über 3 Tage nach folgender Zusammensetzung: 1000 ml Methylmethacrylat (Nr. 800590, Merck, Darmstadt), 200 ml Di-Butylphthalat (Nr. 12487, Merck, Darmstadt), 29 g Benzoylperoxid (Nr. 801641, Merck, Darmstadt). Die Durchtränkung fand bei 4 °C im Kühlschrank statt, um ein vorzeitiges Polymerisieren des MMA-Gemisches zu verhindern. Durch eine Temperaturerhöhung auf 32 °C im Wasserbad wurde dann die Polymerisation eingeleitet. Der ausgehärtete Acrylat-Block konnte durch vorsichtiges Zertrümmern des Glasgefäßes befreit werden.

2.2.2 Schneiden der Acrylat-Blöcke und Objektträgerbeschichtung

Die Objektträger wurden zunächst mit 100%igem Ethanol gesäubert und entfettet, danach mit einer auf etwa 50 °C vorgewärmten Gelatine-Chromalaunlösung dünn bestrichen (Zusammensetzung: 0,9 g Gelatine gelöst in 200 ml destilliertem Wasser zusammen mit 7,7 ml 4%iger Chromalaunlösung (Nr. 31246, Riedel de Haën, Seelze)). Die Schnittfläche des Acrylat-Blocks wurde vor dem Schneiden mit 40%igem Ethanol bepinselt, ebenso diente eine Schale mit 40%igem Ethanol zum Auffangen und Begutachten der frisch abgetrennten Schnitte. Geschnitten wurde im longitudinalen Verlauf der Tibia mit einem Mikrotom *Polycut S* (Leica, Wetzlar) bei einer Schnittdicke von 3 µm. Gelungene Schnitte wurden auf die beschichteten Objektträger aufgebracht und mit 96%igem Ethanol gestreckt. Zuletzt wurde jeder Objektträger mit einer Schutzfolie bedeckt und in einer Presse im Thermoschrank bei 37 °C für mindestens 24 Stunden getrocknet.

2.2.3 Goldner-Färbung

Verwendet wurde eine Trichrom-Färbung nach Goldner. Um überschüssiges Acrylat zu entfernen, wurden die Objektträger zunächst in ein 2-Methoxyethylacetat-Bad gegeben. Es folgten Bäder für jeweils 10 Minuten in 100%igem Ethanol.

Das eigentliche Färben erfolgte mit dem Einsetzen der Objektträger in Gefäße mit folgenden Chemikalien:

1. Weigert's Hämatoxylin (10 Minuten)
2. „Bläuen“ unter Leitungswasser (10 Minuten)
3. 2 g Ponceau de Xylidine + 1 g Säurefuchsin + 0,4 ml 1%ige Essigsäure + 200 ml destilliertes Wasser (45 Minuten)
4. Spülen in 1%iger Essigsäure (1 Minute)
5. Kurzes Abspülen mit destilliertem Wasser
6. 2 g Wolframophosphorsäure + 1 g Orange G + 200 ml destilliertes Wasser (7 Minuten)
7. Spülen mit 1%iger Essigsäure (1 Minute)
8. 0,4 g Lichtgrün + 0,4 ml Essigsäure + 200 ml destilliertes Wasser (15 Minuten)
9. Auswaschen mit 1%iger Essigsäure
10. Entwässern in 96%igem und 100%igem Ethanol, dann in Xylol (jeweils 10 Minuten).

Mit Hilfe eines Tropfens *Eukitt*[®] ließ sich zum Abschluss ein Deckglass über Präparat und Objektträger aufbringen.

2.3 Bestimmung histomorphometrischer Parameter

Alle Daten wurden ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit der Präparatenummern erhoben.

Zur Auswertung der Knochenpräparate wurde ein *Axiophot* Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) mit eingebauter Kamera und der Bildanalysesoftware *analySIS*[®] 3.0 (Soft Imaging System, Münster) an einem angeschlossenen Personal-Computer verwendet. Alle Aufnahmen erfolgten bei 4facher Vergrößerung. Der zu analysierende Bildausschnitt hatte eine Abmessung von 2,04 × 1,64 mm, was einer Fläche von etwa 3,35 mm² entsprach. Von jedem Tier wurden zwei Präparate analysiert und die Mittelwerte berechnet.

Die gemessenen und hergeleiteten Größen, Einheiten und Abkürzungen zur Beschreibung histomorphometrischer Parameter wurden nach den Empfehlungen des *American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) Histomorphometry Nomenclature Committee* verwendet (Parfitt et al. 1987). Per Konvention werden die gemessenen und abgeleiteten Größen der 2-dimensionalen Vorlage in den korrespondierenden 3-dimensionalen Einheiten angegeben. Dies geschieht unter Berücksichtigung stereologischer Überlegungen und erlaubt einen Rückschluss auf die tatsächliche Knochengeometrie.

2.3.1 Spongioser Knochenanteil (BV/TV) und intramedullärer Adipozytenanteil (AV/TV)

- Spongioser Knochenanteil (BV/TV in %) nach Parfitt et al. (1987):

$$BV/TV = 100 \times \text{Spongiose Knochenfläche} / \text{Fläche des Untersuchungsausschnitts}$$

- Intramedullärer Adipozytenanteil (AV/TV in %) nach Martin und Zissimos (1991):

$$AV/TV = 100 \times \text{Adipöse Gewebefläche} / \text{Fläche des Untersuchungsausschnitts.}$$

Ein zentral zwischen oben- und untenliegender Kortikalis, von der proximalen Epiphysenfuge etwa 0,5 mm distal gelegener Bildausschnitt wurde ausgewertet. In der Testphase hatten folgende Bildformatierungen die zuverlässigsten Ergebnisse für die spätere Phasenanalyse ergeben:

1. „Schattenkorrektur“
2. „Invertieren“
3. „Farbauszug der Farbe Rot“.

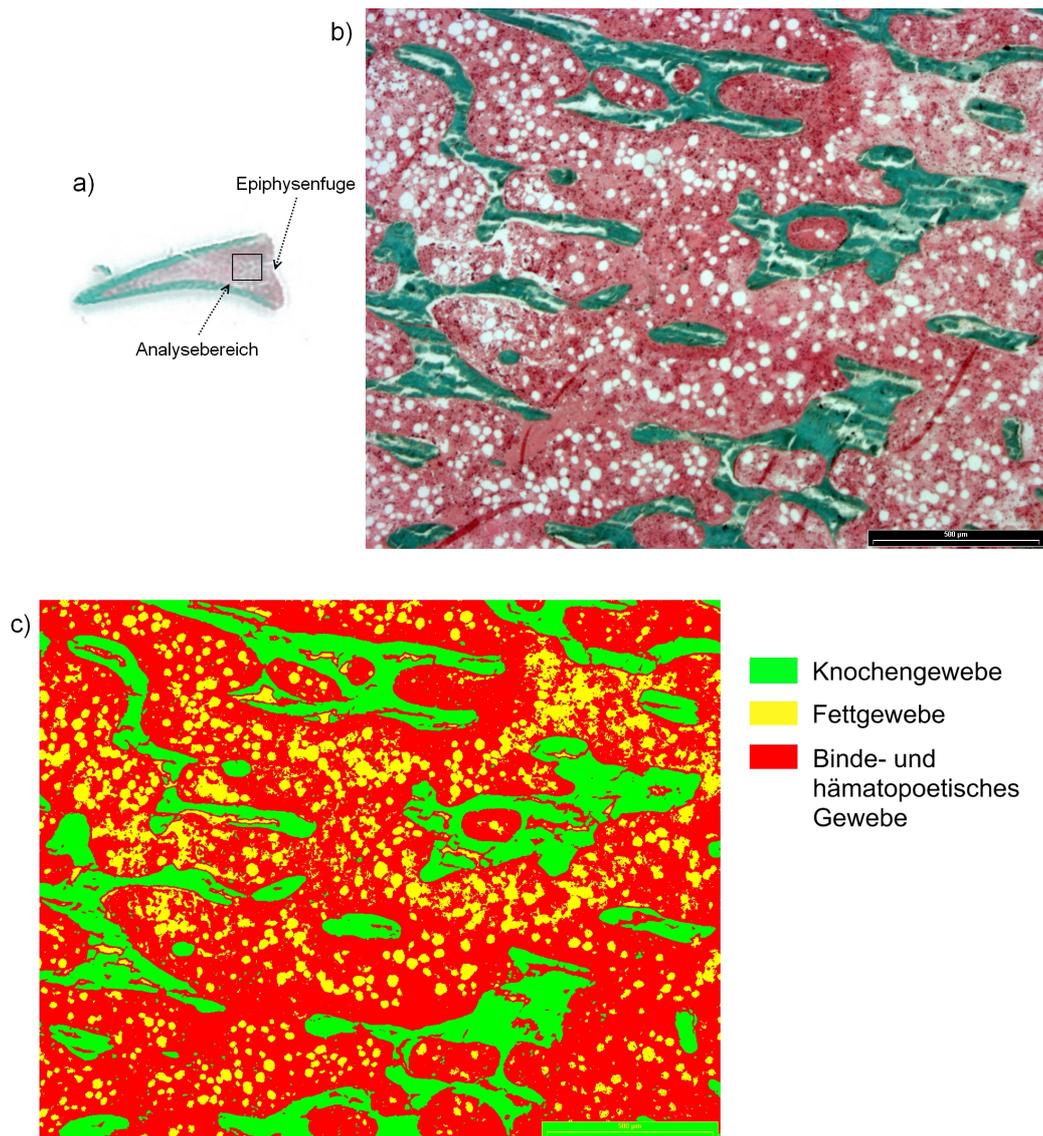


Abb. 2-1 Bestimmung des spongiösen Knochenanteils (BV/TV) und des intramedullären Adipozytenanteils (AV/TV) in der proximalen Tibiametaphyse der ovariectomierten Ratte

a) Übersichtsaufnahme mit dem Analysebereich etwa 0,5 mm distal der proximalen Epiphysenfuge der Tibia

b) Analysebereich im Echtfarbbild

c) Analysebereich nach Bildformatierung und Phasenzuordnung

Die spongiöse Knochenhistologie wurde vereinfachend auf drei Strukturen reduziert. Gut abgrenzbar waren die Knochenbälkchen des spongiösen Knochens sowie die rundlichen, ausgewaschenen Vakuolen der Adipozyten innerhalb des Knochenmarks. Das Binde- und hämatopoetische Gewebe ließ sich nicht genauer differenzieren und wurde in der Auswertung nicht weiter berücksichtigt.

Den verschiedenen histologischen Strukturen ließen sich nach der Bildformatierung zusammenhängende Grauwertbereiche (Phasen) zuordnen. Die Schwellenwerte, welche

den obersten und untersten Grauwert einer Phase definierten, wurden manuell für jede Auswertung neu kalibriert. Dazu diente das ursprüngliche Echtfarbbild auf einem zweiten Monitor als Orientierungshilfe. Die Phasenanalyse errechnete dann die jeweiligen Flächenanteile der drei definierten Strukturen. Bei Vorliegen von Präparationsdefekten wurden nur Bildausschnitte ausgewertet, die keine gestörte Gewebestruktur aufwiesen.

2.3.2 Trabekeldurchmesser (Tb.Dm)

- Trabekeldurchmesser (Tb.Dm in μm) unter Annahme einer zylinderförmigen Trabekelform nach Parfitt et al. (1987).

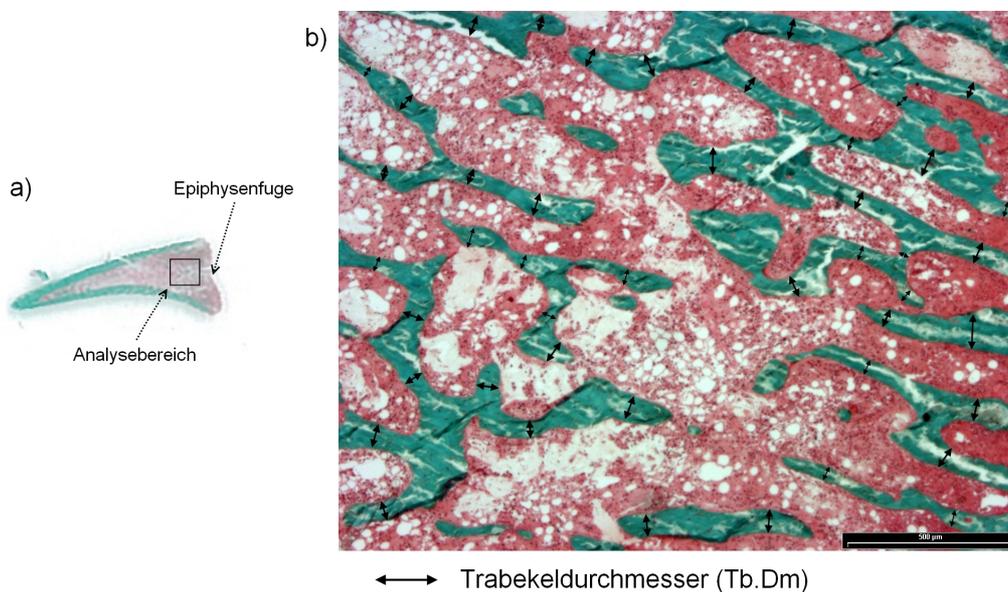


Abb. 2-2 Bestimmung des Trabekeldurchmessers (Tb.Dm) in der proximalen Tibiametaphyse der ovariectomierten Ratte

a) Übersichtsaufnahme mit dem Analysebereich etwa 0,5 mm distal der proximalen Epiphysenfuge der Tibia

b) Vermessung der Trabekel im histologischen Präparat

Die Trabekeldurchmesser wurden in den Echtfarbbildern der Aufnahmen vermessen, die mithilfe der Phasenanalyse auch der Bestimmung der spongiösen Knochen- und intramedullären Fettgewebsanteile gedient hatten. Die Trabekelform wurde vereinfachend als zylinderförmig angenommen und aus der Abstandsmessung auf den Trabekeldurchmesser geschlossen. Die Messorte waren zufällig über die gesamten Trabekelstrukturen verteilt, wobei Kreuzungspunkte von Trabekeln nicht berücksichtigt wurden. Die Messungen erfolgten manuell mit der Programmfunktion zur Abstandsmessung. Der endgültige Trabekeldurchmesser ergab sich als Mittelwert der Einzelmessungen.

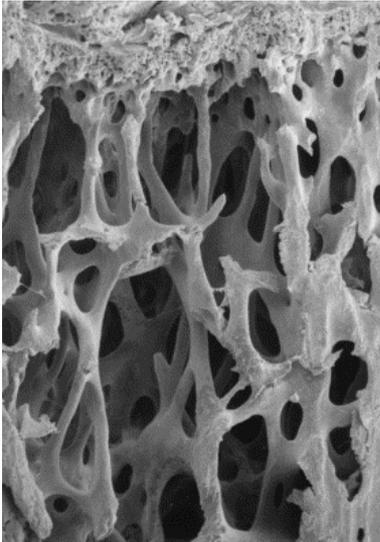


Abb. 2-3 Trabekelstruktur der proximalen Tibiametaphyse der ovariectomierten Ratte

Demonstration der überwiegend zylinderförmigen Trabekelform in der proximalen Tibiametaphyse der ovariectomierten Ratte anhand einer elektronenmikroskopischen Aufnahme (35fache Vergrößerung), aus Abe et al. (1999), Seite 592.

2.3.3 Trabekelkonnektivität (N/T)

- Trabekelkonnektivität (N/T), *Strut Analysis* nach Garrahan et al. (1986):

$N/T = \text{Anzahl Trabekel-Kreuzungspunkte (N)} / \text{Anzahl freier Trabekel-Enden (T)}$.

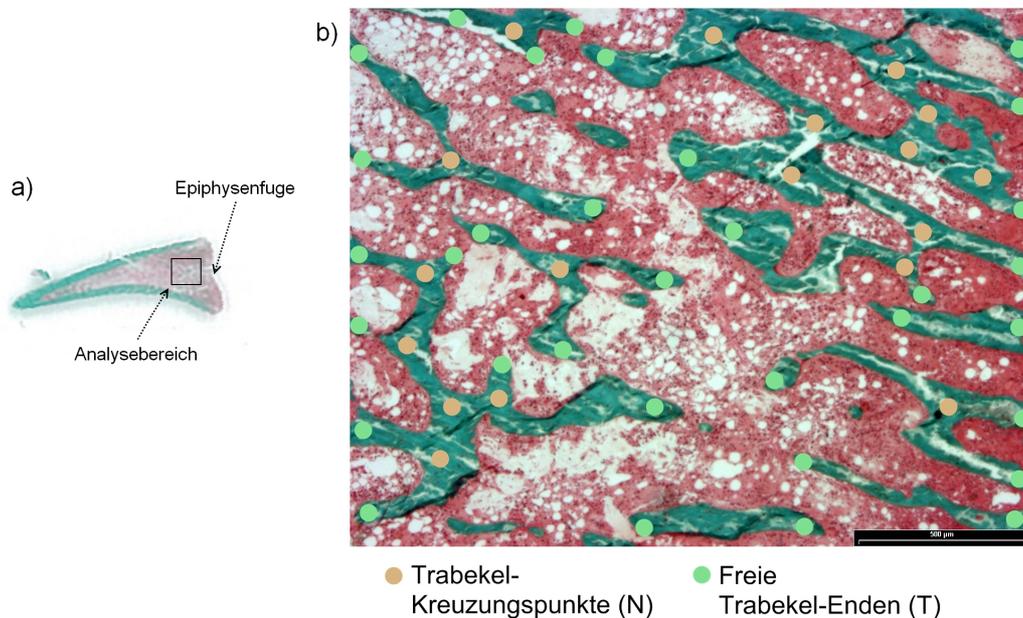


Abb. 2-4 Bestimmung der Trabekelkonnektivität (N/T) mithilfe der Strut Analysis in der proximalen Tibiametaphyse der ovariectomierten Ratte

a) Übersichtsaufnahme mit dem Analysebereich etwa 0,5 mm distal der proximalen Epiphysenfuge der Tibia

b) Kennzeichnung von Trabekel-Kreuzungspunkten (N) und freien Trabekel-Enden (T) im histologischen Präparat

Analysiert wurden die Echtfarbbilder, an denen auch die bereits beschriebenen Parameter des spongiösen Knochens bestimmt wurden.

Die Trabekelkonnektivität diente zur Beurteilung der Intaktheit des trabekulären Netzwerks. Sie wurde mithilfe der *Strut Analysis* als Quotient von Trabekel-Kreuzungspunkten zu freien Trabekel-Enden beurteilt. Ein großer Quotient sprach für zahlreiche intertrabekuläre Verbindungen und damit für ein intaktes trabekuläres Netzwerk.

2.3.4 Kortikalisdicke (Ct.Th)

- Kortikalisdicke (Ct.Th in μm) nach Parfitt et al. (1987).

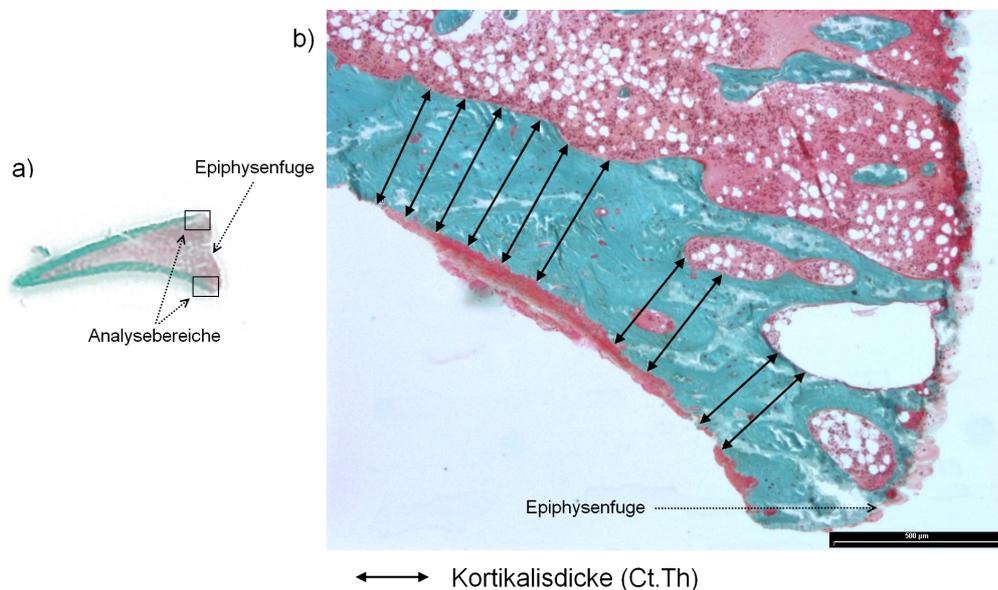


Abb. 2-5 Bestimmung der Kortikalisdicke (Ct.Th) der proximalen Tibiametaphyse der ovariectomierten Ratte

a) Übersichtsaufnahme mit den Analysebereichen distal der proximalen Epiphysenfuge der Tibia

b) Vermessung der Kortikalisdicke im histologischen Präparat

Zur Beurteilung der Kortikalisdicke wurden jeweils Aufnahmen von oben- und untenliegender Kortikalis angefertigt. Die proximale Epiphysenfuge diente als Referenzlinie. Von hier ausgehend wurden mehrere Messungen über den gesamten Bildausschnitt manuell mit der Programmfunktion zur Abstandsmessung durchgeführt. Die Messorte waren zufällig verteilt. Übergangsbereiche zu trabekulären Strukturen wurden ausgeschlossen. Die endgültige Kortikalisdicke ergab sich als Mittelwert der Einzelmessungen beider Analysebereiche.

2.4 Bestimmung der spongiösen Knochendichte (Tr.D)

- Spongiöse Knochendichte (Tr.D in mg/cm^3), pQCT-Messung.

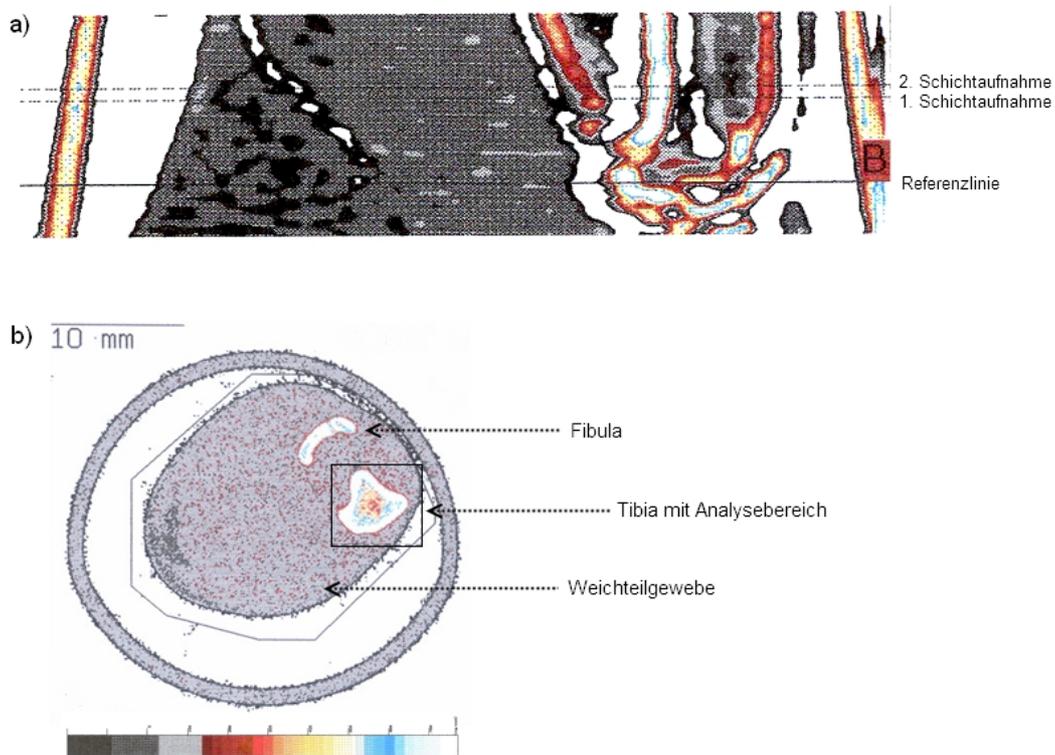


Abb. 2-6 Bestimmung der spongiösen Knochendichte (Tr.D) der proximalen Tibiametaphyse der Ratte mithilfe der pQCT

a) Planarer Übersichtsscan in Knochenlängsachse zum Kalibrieren der Messbereiche

b) Schichtaufnahme zur Bestimmung der spongiösen Knochendichte (Tr.D) der proximalen Tibiametaphyse

Die Messung der spongiösen Knochendichte (Tr.D) erfolgte mit dem *Stratec XCT Research SA+* (Stratec Medizintechnik, Pforzheim), einem speziell zur Untersuchung von Kleintieren entwickelten Gerät. Die gewonnenen Daten wurden mit der dazugehörigen Software *Stratec XCT V5.40* ausgewertet. Die pQCT-Messungen erfolgten unter Isofluran-Inhalationsnarkose mithilfe einer speziellen Mund-Nasen-Maske und eines Kleintiernarkosegerätes (UNO, Zevenaar, Holland). Das jeweils linke Bein wurde in einer trichterförmigen Haltevorrichtung fixiert und über einen Laserstrahl der Messbereich der proximalen Tibiametaphyse grob anvisiert. Zunächst erstellte das Gerät einen planaren Übersichtsscan in Knochenlängsachse zur manuellen Positionierung der Messbereiche. Als Referenzlinie diente die proximale Epiphysenfuge. Die spongiöse Knochendichte der Tibiametaphyse ergab sich als Mittelwert zweier Schichtaufnahmen im Abstand von 3,75 und 4,25 mm nach distal. Das spongiöse Knochenkompartiment wurde durch den Dichtebereich von $280 - 400 \text{ mg}/\text{cm}^3$ definiert. Die Seitenlänge eines Voxels betrug $100 \mu\text{m}$.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software *Prism 4 for Windows, Version 4.03* (GraphPad Software, San Diego, USA). Für sämtliche Messwerte wurde eine Normalverteilung angenommen und parametrische Tests zur Auswertung verwendet. Die maximal zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit (Signifikanzniveau p) betrug 5 %.

Zunächst erfolgte eine zweifaktorielle Varianzanalyse (*Analysis of Variance, ANOVA*). Als Variablen (Faktoren) wurden sowohl das Vibrationstraining als auch die verschiedenen Testsubstanzen berücksichtigt. Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Beeinflusste der erste Faktor (Vibrationstraining) systematisch das Ergebnis?
2. Beeinflusste der zweite Faktor (Testsubstanz) systematisch das Ergebnis?
3. Gab es eine Wechselwirkung beider Faktoren?

Die ermittelten p -Werte gaben Auskunft über einen signifikanten Effekt der einzelnen Faktoren oder eine mögliche Wechselwirkung beider Interventionen. Zusätzlich wurde ein Bonferroni-Posttest durchgeführt, welcher die Vibro- und Non-Vibro-Gruppen auf signifikante Unterschiede gegenüber der jeweiligen sojafreien Kontrollgruppe untersuchte.

Daneben sollten die Effekte des Vibrationstrainings innerhalb der einzelnen Substanzgruppen untersucht werden. Dazu wurden t -Tests für unabhängige Stichproben jeweils zwischen Vibro- und Non-Vibro-Tieren gleicher Futtergruppe durchgeführt.

Dargestellt sind die arithmetischen Mittel in Form von Säulendiagrammen, lediglich die Angabe der Futter- und Substanzaufnahme erfolgt in Tabellenform. Als Streuungsmaß wird der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) durch Fehlerbalken graphisch dargestellt. Bei Angabe von Mittelwerten im Text wird ebenfalls der Standardfehler erwähnt (arithmetisches Mittel \pm Standardfehler).

Signifikante Unterschiede gegenüber den Kontrollgruppen werden durch Symbole gekennzeichnet:

* vs. Non-Vibro-Kontrollgruppe (Co-SF), + vs. Vibro-Kontrollgruppe (Co-SF Vibro).

Signifikante Unterschiede der Vibro-Tiere gegenüber den Non-Vibro-Tieren gleicher Futtergruppe werden durch # kenntlich gemacht.

Zur Untersuchung der Korrelation histomorphometrisch erhobener Parametern mit der spongiösen Knochendichte (Tr.D) wurde der Korrelationskoeffizient r nach Pearson bestimmt. Die graphische Darstellung erfolgt anhand von Streudiagrammen mit dazugehöriger Regressionsgerade. Angegeben wird der jeweilige Korrelationskoeffizient r , ein * kennzeichnet die signifikante Abweichung von 0.

3 Ergebnisse

3.1 Futter- und Substanzaufnahme

Gruppe	Substanzmenge pro kg Futter	Durchschnittliche tägliche Futtermenge pro Tier	Durchschnittliche tägliche Substanzaufnahme pro Tier
Co-SF		16,7 ± 0,6 g	
Co-SF Vibro		16,5 ± 0,5 g	
E2	4,3 mg	14,1 ± 0,7 g *	0,06 ± 0,003 mg
E2 Vibro	4,3 mg	14,9 ± 0,5 g	0,06 ± 0,002 mg
Equol	400 mg	15,0 ± 0,5 g *	6,00 ± 0,2 mg
Equol Vibro	400 mg	14,6 ± 0,5 g +	5,84 ± 0,2 mg
Genistein	1000 mg	16,5 ± 0,5 g	16,5 ± 0,5 mg
Genistein Vibro	1000 mg	16,8 ± 0,5 g	16,8 ± 0,5 mg
Puerarin	3000 mg	14,7 ± 0,4 g *	44,1 ± 1,2 mg
Puerarin Vibro	3000 mg	14,3 ± 0,5 g +	42,9 ± 1,5 mg

Tab. 3-1 Tägliche Futter- und Substanzaufnahme ovariectomierter Ratten nach 3 Monaten unter sojafreiem Kontrollfutter, E2, Equol, Genistein oder Puerarin ± Vibrationstraining

Angabe des arithmetischen Mittels ± Standardfehler;

Zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Posttest, t-Test für Vibro- vs. Non-Vibro-Tiere gleicher Futtergruppe,

* $p < 0,05$ vs. Co-SF

+ $p < 0,05$ vs. Co-SF Vibro

Die höchste Futtermenge wurde mit $16,8 \pm 0,5$ g in der Genistein-Vibro-Gruppe beobachtet, die niedrigste fand sich mit $14,1 \pm 0,7$ g in der E2-Non-Vibro-Gruppe.

Die zweifaktorielle ANOVA ergab keinen Hinweis auf einen systematischen Einfluss des Vibrationstrainings oder eine Wechselwirkung beider Interventionen. Dagegen wirkten sich die Testsubstanzen signifikant auf die Futtermenge aus. Die E2-, Equol- und Puerarin-Gruppen wiesen signifikant niedrigere Futtermengen gegenüber den sojafreien Kontrollen auf (Differenz bei E2 nur für die Non-Vibro-Gruppe signifikant). Bei den Genistein-Gruppen fanden sich dagegen keine signifikanten Unterschiede.

Der t-Test ergab in keiner Futtergruppe eine signifikante Beeinflussung der Futtermenge durch das Vibrationstraining.

3.2 Körpergewichtszunahme

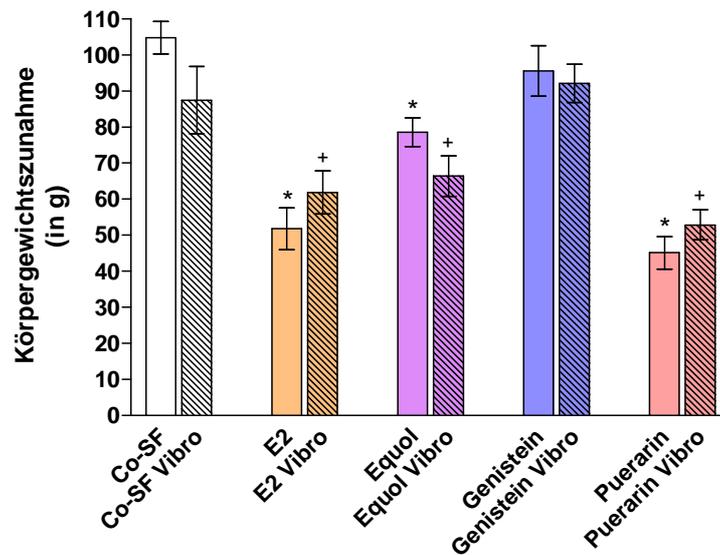


Abb. 3-1 Körpergewichtszunahme ovariectomierter Ratten nach 3 Monaten unter sojafreiem Kontrollfutter, E2, Equol, Genistein oder Puerarin ± Vibrationstraining

Angabe des arithmetischen Mittels \pm Standardfehler;

Zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Posttest, t-Test für Vibro- vs. Non-Vibro-Tiere gleicher Futtergruppe,

* $p < 0,05$ vs. Co-SF

+ $p < 0,05$ vs. Co-SF Vibro

Die höchste Körpergewichtszunahme zeigte sich mit $105 \pm 4,5$ g in der sojafreien Non-Vibro-Kontrollgruppe, die niedrigste wurde mit $45 \pm 4,5$ g in der Puerarin-Non-Vibro-Gruppe gemessen.

Die zweifaktorielle ANOVA ergab keinen Hinweis auf einen systematischen Einfluss des Vibrationstrainings oder eine Wechselwirkung beider Interventionen. Dagegen wirkten sich die Testsubstanzen signifikant auf die Körpergewichtszunahme aus. Die E2-, Equol- und Puerarin-Gruppen wiesen signifikant niedrigere Körpergewichtszunahmen gegenüber den sojafreien Kontrollen auf. Bei den Genistein-Gruppen fanden sich dagegen keine signifikanten Unterschiede.

Der t-Test ergab in keiner Futtergruppe eine signifikante Beeinflussung der Körpergewichtszunahme durch das Vibrationstraining.

3.3 Spongioser Knochenanteil (BV/TV)

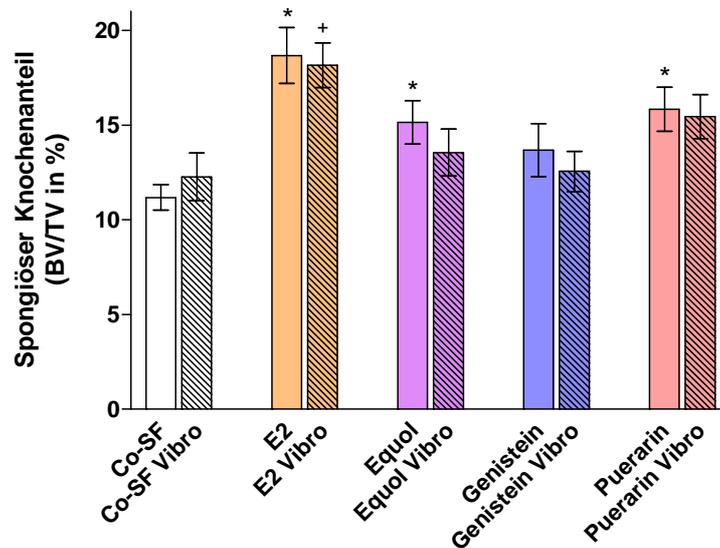


Abb. 3-2 Spongioser Knochenanteil (BV/TV = 100 x spongiöse Knochenfläche / Fläche des Untersuchungsausschnitts) der proximalen Tibiametaphyse ovariectomierter Ratten nach 3 Monaten unter sojafreiem Kontrollfutter, E2, Equol, Genistein oder Puerarin ± Vibrationstraining

Angabe des arithmetischen Mittels ± Standardfehler;

Zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Posttest, t-Test für Vibro- vs. Non-Vibro-Tiere gleicher Futtergruppe,

* $p < 0,05$ vs. Co-SF

+ $p < 0,05$ vs. Co-SF Vibro

Der größte spongiöse Knochenanteil (BV/TV) fand sich mit $18,7 \pm 1,5$ % in der E2-Non-Vibro-Gruppe, der geringste wurde mit $11,2 \pm 0,7$ % in der sojafreien Non-Vibro-Kontrollgruppe gemessen.

Die zweifaktorielle ANOVA ergab keinen Hinweis auf einen systematischen Einfluss des Vibrationstrainings oder eine Wechselwirkung beider Interventionen. Dagegen wirkten sich die Testsubstanzen signifikant auf den spongiösen Knochenanteil aus. Die E2-, Equol- und Puerarin-Gruppen wiesen einen signifikant höheren spongiösen Knochenanteil gegenüber den sojafreien Kontrollen auf (Differenz bei Equol und Puerarin nur für die Non-Vibro-Gruppen signifikant). Bei den Genistein-Gruppen fanden sich dagegen keine signifikanten Unterschiede.

Der t-Test ergab in keiner Futtergruppe eine signifikante Beeinflussung des spongiösen Knochenanteils durch das Vibrationstraining.

3.4 Trabekeldurchmesser (Tb.Dm)

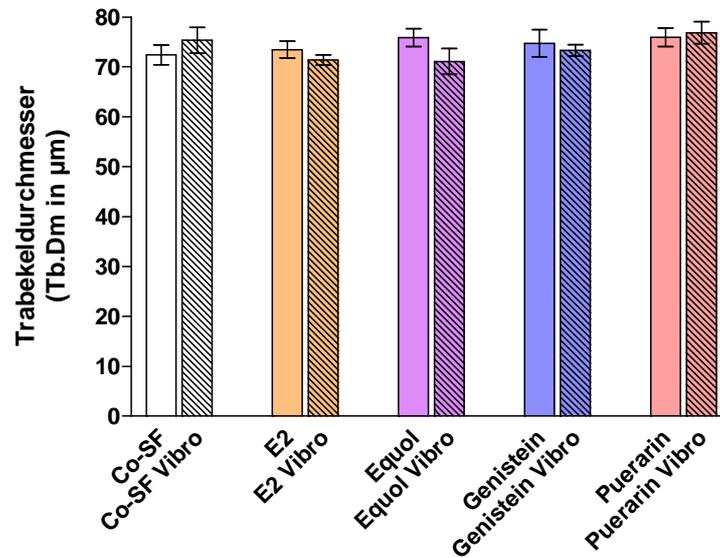


Abb. 3-3 Trabekeldurchmesser (Tb.Dm) in der proximalen Tibiametaphyse ovariectomierter Ratten nach 3 Monaten unter sojafreiem Kontrollfutter, E2, Equol, Genistein oder Puerarin ± Vibrationstraining

Angabe des arithmetischen Mittels \pm Standardfehler;

Zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Posttest, t-Test für Vibro- vs. Non-Vibro-Tiere gleicher Futtergruppe

Die größten Trabekeldurchmesser (Tb.Dm) wurden mit $77 \pm 2,2 \mu\text{m}$ in der Puerarin-Vibro-Gruppe gemessen, die geringsten fanden sich mit $71 \pm 2,6 \mu\text{m}$ in der Equol-Vibro-Gruppe.

Die zweifaktorielle ANOVA ergab keinen Hinweis auf einen systematischen Einfluss des Vibrationstrainings, der Testsubstanzen oder eine Wechselwirkung beider Interventionen.

Der t-Test ergab in keiner Futtergruppe eine signifikante Beeinflussung des Trabekeldurchmessers durch das Vibrationstraining.

3.5 Trabekelkonnektivität (N/T)

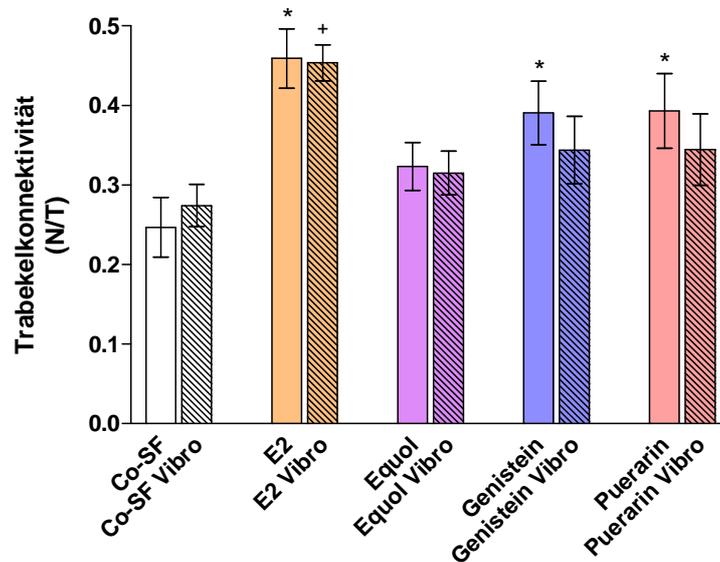


Abb. 3-4 Trabekelkonnektivität (N/T = Quotient aus Trabekel-Kreuzungspunkten N und freien Trabekel-Enden T) in der proximalen Tibiametaphyse ovariectomierter Ratten nach 3 Monaten unter sojafreiem Kontrollfutter, E2, Equol, Genistein oder Puerarin ± Vibrationstraining

Angabe des arithmetischen Mittels \pm Standardfehler;

Zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Posttest, t-Test für Vibro- vs. Non-Vibro-Tiere gleicher Futtergruppe,

* $p < 0,05$ vs. Co-SF

+ $p < 0,05$ vs. Co-SF Vibro

Die mithilfe der *Strut Analysis* beurteilte Trabekelkonnektivität (N/T) war mit $0,46 \pm 0,04$ am höchsten in der E2-Non-Vibro-Gruppe und mit $0,25 \pm 0,04$ am geringsten in der sojafreien Non-Vibro-Kontrollgruppe.

Die zweifaktorielle ANOVA ergab keinen Hinweis auf einen systematischen Einfluss des Vibrationstrainings oder eine Wechselwirkung beider Interventionen. Dagegen wirkten sich die Testsubstanzen signifikant auf die Trabekelkonnektivität aus. Die E2-Gruppen wiesen eine signifikant höhere Trabekelkonnektivität auf, bei Genistein und Puerarin war die Differenz lediglich für die Non-Vibro-Gruppen signifikant. Bei den Equol-Gruppen fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

Der t-Test ergab in keiner Futtergruppe eine signifikante Beeinflussung der Trabekelkonnektivität durch das Vibrationstraining.

3.6 Kortikalisdicke (Ct.Th)

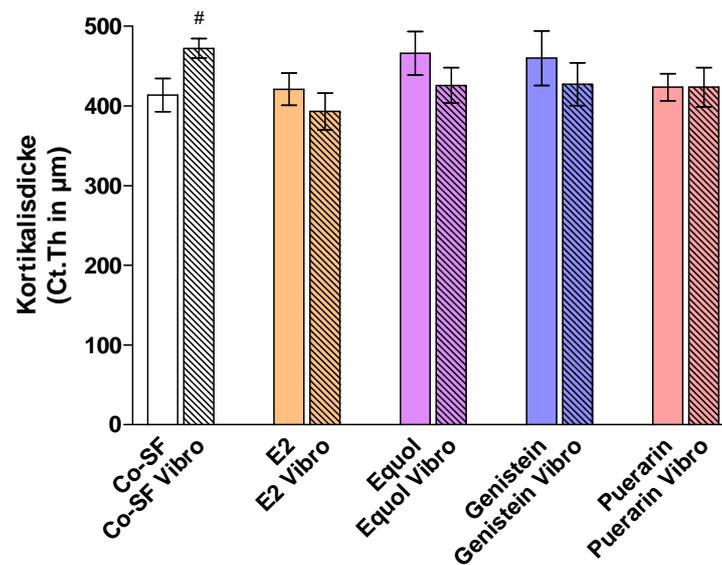


Abb. 3-5 Kortikalisdicke (Ct.Th) der proximalen Tibiametaphyse ovariectomierter Ratten nach 3 Monaten unter sojafreiem Kontrollfutter, E2, Equol, Genistein oder Puerarin \pm Vibrationstraining

Angabe des arithmetischen Mittels \pm Standardfehler;

Zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Posttest, t-Test für Vibro- vs. Non-Vibro-Tiere gleicher Futtergruppe,

$p < 0,05$ vs. korrespondierender Non-Vibro-Gruppe

Die größte Kortikalisdicke (Ct.Th) wurde mit $468 \pm 11,7 \mu\text{m}$ in der sojafreien Vibro-Kontrollgruppe gemessen, die geringste fand sich mit $393 \pm 22,7 \mu\text{m}$ in der E2-Vibro-Gruppe.

Die zweifaktorielle ANOVA ergab keinen Hinweis auf einen systematischen Einfluss des Vibrationstrainings, der Testsubstanzen oder eine Wechselwirkung beider Interventionen.

Der t-Test ergab für das Vibrationstraining eine signifikante Steigerung der Kortikalisdicke um fast 14 % ($p = 0,02$) in der sojafreien Kontrollgruppe. Dagegen konnte ein Vibrationseffekt weder in der E2- noch in einer der Isoflavon-Gruppen beobachtet werden.

3.7 Intramedullärer Adipozytenanteil (AV/TV)

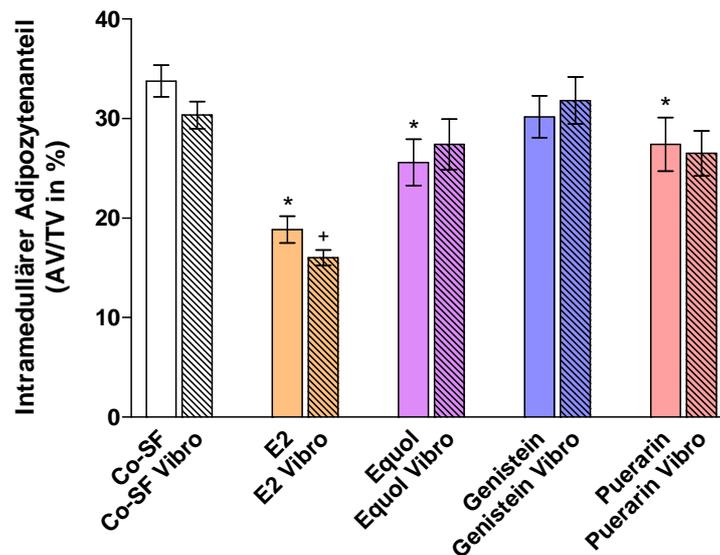


Abb. 3-6 Intramedullärer Adipozytenanteil (AV/TV = 100 x Adipöse Gewebefläche / Fläche des Untersuchungsausschnitts) in der proximalen Tibiametaphyse ovariectomierter Ratten nach 3 Monaten unter sojafreiem Kontrollfutter, E2, Equol, Genistein oder Puerarin ± Vibrationstraining

Angabe des arithmetischen Mittels ± Standardfehler;

Zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Posttest, t-Test für Vibro- vs. Non-Vibro-Tiere gleicher Futtergruppe,

* $p < 0,05$ vs. Co-SF

+ $p < 0,05$ vs. Co-SF Vibro

Der größte intramedulläre Adipozytenanteil (AV/TV) fand sich mit $35 \pm 1,9$ % in der sojafreien Non-Vibro-Kontrollgruppe, am geringsten war er mit $16 \pm 0,8$ % in der E2-Vibro-Gruppe.

Die zweifaktorielle ANOVA ergab keinen Hinweis auf einen systematischen Einfluss des Vibrationstrainings oder eine Wechselwirkung beider Interventionen. Dagegen wirkten sich die Testsubstanzen signifikant auf den intramedullären Adipozytenanteil aus. Die E2-Gruppen wiesen signifikant niedrigere intramedulläre Adipozytenanteile auf, bei Equol und Puerarin war die Differenz lediglich für die Non-Vibro-Gruppen signifikant. Die Genistein-Gruppen wiesen keine signifikant niedrigeren intramedullären Adipozytenanteile auf.

Der t-Test ergab in keiner Futtergruppe eine signifikante Beeinflussung des intramedullären Adipozytenanteils durch das Vibrationstraining.

3.8 Spongiöse Knochendichte (Tr.D)

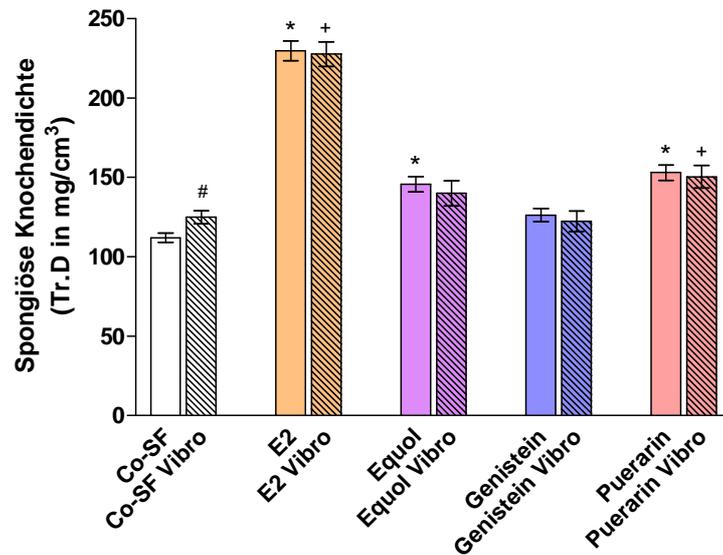


Abb. 3-7 Spongiöse Knochendichte (Tr.D) der proximalen Tibiametaphyse ovariectomierter Ratten nach 3 Monaten unter sojafreiem Kontrollfutter, E2, Equol, Genistein oder Puerarin ± Vibrationstraining

Angabe des arithmetischen Mittels \pm Standardfehler;

Zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Posttest, t-Test für Vibro- vs. Non-Vibro-Tiere gleicher Futtergruppe,

* $p < 0,05$ vs. Co-SF

+ $p < 0,05$ vs. Co-SF Vibro

$p < 0,05$ vs. korrespondierender Non-Vibro-Gruppe

Die höchste spongiöse Knochendichte (Tr.D) wurde mit $230 \pm 6,2 \text{ mg/cm}^3$ in der E2-Non-Vibro-Gruppe gemessen, die geringste fand sich mit $112 \pm 2,9 \text{ mg/cm}^3$ in der sojafreien Non-Vibro-Kontrollgruppe.

Die zweifaktorielle ANOVA ergab keinen Hinweis auf einen systematischen Einfluss des Vibrationstrainings oder eine Wechselwirkung beider Interventionen. Dagegen wirkten sich die Testsubstanzen signifikant auf die spongiöse Knochendichte aus. Die E2- und Puerarin-Gruppen wiesen signifikant größere spongiöse Knochendichten auf, bei Equol war die Differenz lediglich für die Non-Vibro-Gruppe signifikant. Bei den Genistein-Gruppen fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

Der t-Test ergab für das Vibrationstraining eine signifikante Steigerung der spongiösen Knochendichte um fast 12 % ($p = 0,02$) in der sojafreien Kontrollgruppe. Dagegen konnte ein Vibrationseffekt weder in der E2- noch in einer der Isoflavon-Gruppen beobachtet werden.

3.9 Korrelation der spongiösen Knochendichte (Tr.D) mit den korrespondierenden histomorphometrisch erhobenen Parametern des spongiösen Knochens

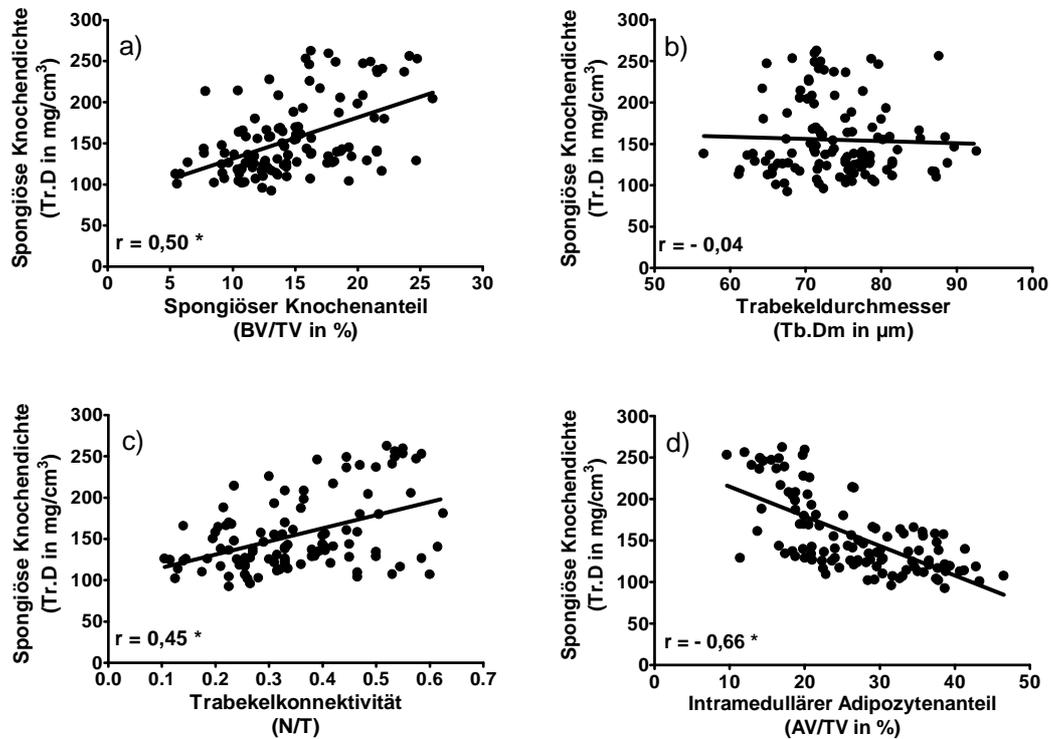


Abb. 3-8 Korrelation der spongiösen Knochendichte (Tr.D) mit den korrespondierenden histomorphometrisch erhobenen Parametern des spongiösen Knochens der proximalen Tibiametaphyse ovariectomierter Ratten nach 3 Monaten unter sojafreiem Kontrollfutter, E2, Equol, Genistein oder Puerarin \pm Vibrationstraining

a) Korrelation mit dem spongiösen Knochenanteil (BV/TV)

b) Korrelation mit dem Trabekeldurchmesser (Tb.Dm)

c) Korrelation mit der Trabekelkonnektivität (N/T)

d) Korrelation mit dem intramedullären Adipozytenanteil (AV/TV)

Pearson-Korrelation, r = Korrelationskoeffizient, $* p < 0,05$ vs. 0

Die spongiöse Knochendichte korrelierte signifikant positiv mit dem spongiösen Knochenanteil (Tr.D vs. BV/TV: $r = 0,50$) und der Trabekelkonnektivität (Tr.D vs. N/T: $r = 0,45$). Signifikant negativ war die Korrelation mit dem intramedullären Adipozytenanteil (Tr.D vs. AV/TV: $r = -0,66$). Der Trabekeldurchmesser war in allen Versuchsgruppen annähernd konstant und zeigte dementsprechend keine signifikante Korrelation mit der spongiösen Knochendichte.

4 Diskussion

4.1 Einleitung

In dieser Arbeit sollte die Kombination eines täglichen kurzen Vibrationstrainings mit der Substitution verschiedener Isoflavone als mögliche Prophylaxe der postmenopausalen Osteoporose untersucht werden. Erhofftes Ziel der begleitenden Isoflavon-Substitution war es, eine gesteigerte Mechanosensitivität des Knochens zu erreichen und darüber den Vibrationseffekt zu vergrößern. Bisher lagen wenige Erkenntnisse zur Kombination von Isoflavonen und Trainingsprogrammen vor und Vibrationstraining als Sonderform mechanischer Stimulation war in dieser Form noch nicht untersucht worden. Der Schwerpunkt der Knochenanalyse lag in der histomorphometrischen Beurteilung, daneben wurde auch die mit der pQCT bestimmte spongiöse Knochendichte berücksichtigt.

Als Untersuchungsmodell diente die ovariectomierte weibliche Ratte, welche der postmenopausalen Osteoporose sehr ähnliche knochenarchitektonische Veränderungen zeigt und als geeignetes und etabliertes Osteoporose-Modell gilt (Frost und Jee 1992, Jee und Yao 2001, Lelovas et al. 2008). Als Untersuchungsregion wurde die proximale Tibiametaphyse gewählt. Diese weist bereits kurz nach Ovariectomie einen schnellen spongiösen Knochenmasseverlust auf, welcher durch E2-Substitution erfolgreich verhindert werden kann (Wronski et al. 1988a, Seidlova-Wuttke et al. 2003). E2 wurde auch in dieser Arbeit als Positivkontrolle gewählt. Die proximale Tibiametaphyse der Ratte erschien zudem als geeignete Region zur Untersuchung von Vibrationstrainings-Effekten. Judex et al. (2007) und Rubinacci et al. (2008) konnten dort die über eine Bodenplatte applizierten 30-Hz-Vibrationen mithilfe spezieller Sonden erfolgreich registrieren. Christiansen und Silva (2006) stellten an der proximalen Tibiametaphyse im Vergleich zu anderen Skelettregionen die deutlichsten Knochenreaktionen auf ein Vibrationstraining fest.

Die Versuchsdauer von 3 Monaten sollte einer Langzeitanwendung von Vibrationstraining und Isoflavonen bei postmenopausalen Frauen entsprechen. Ähnlich wie diese zeigen Ratten nach Ovariectomie einen zweiphasigen Knochenmasseverlust, dessen frühe Phase mit deutlichen Verlusten des spongiösen Knochens einhergeht und nach etwa 3 Monaten sistiert (Wronski et al. 1988b, Wronski et al. 1989a). Die knochenarchitektonischen Veränderungen gleichen der frühen Phase des postmenopausalen Knochenmasseverlustes von 5 bis 10 Jahren Dauer (Riggs et al. 2002). Generell sind längere Beobachtungszeiträume zur Beurteilung von Therapieeffekten am Knochen sinnvoll, da die Knochensynthese gegenüber der Knochenresorption deutlich mehr Zeit in Anspruch nimmt (Compston 2001).

4.2 Futter- und Substanzaufnahme

Zum Ausschluss von Interferenzen wurde für die Kontrollgruppen und als Basis der substituierten Testsubstanzen sojafreies Grundfutter gewählt. Soja ist eine häufige Proteinquelle in Rattenhaltungsfutter und enthält auch die hier untersuchten Isoflavone (Thigpen et al. 1999, Owens et al. 2003). Aufgrund der Erfahrungen aus abteilungsinternen früheren Studien war die durchschnittliche tägliche Futterraufnahme der Ratten bekannt. Auf deren Basis erfolgte die Festlegung der Substanzmengen pro kg Futter.

Für E2 wurde eine Dosis von 4,3 mg/kg Futter gewählt. Diese hatte in einer vorherigen Studie zu einer E2-Serumkonzentration von $40,2 \pm 3,0$ pg/ml geführt, was der physiologischen Serumkonzentration im Proöstrus der Ratte entsprach (Vortherms 2006). Bei einer durchschnittlichen Futtermenge von $14,1 \pm 0,7$ g bzw. $14,9 \pm 0,5$ g Futter/Tier/Tag ergab sich eine tägliche Substanzaufnahme von jeweils etwa 0,06 mg E2 pro Tier.

Orale Aufnahme von Isoflavonen kann sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte zu hohen Serumkonzentrationen führen, welche die der Östrogene um ein Vielfaches übertreffen (Adlercreutz et al. 1993, Brown NM und Setchell 2001). Für die hier untersuchten Isoflavone Equol, Genistein und Puerarin sind dosisabhängig auch uterotrophe Effekte beschrieben worden. Der *Rat Uterotrophic Bioassay* gilt nach der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) als sichere Nachweismethode auch geringer Östrogen-agonistischer Wirkungen (Owens und Koeter 2003). Zur Sicherstellung der Bioverfügbarkeit und der besseren Vergleichbarkeit der hier substituierten Isoflavone wurden jeweils Substanzkonzentrationen angestrebt, für die von einer geringen uterotrophen Wirkung auszugehen war. Östrogene Effekte am Uterus der Ratte werden ER α -vermittelt (Harris et al. 2002).

Für Genistein ist ab einer Dosis von täglich 50 mg/kg Körpergewicht eine Zunahme des Uterusgewichts ovariectomierter Ratten beschrieben worden (Michael McClain et al. 2006). Für die hier verwendete Genistein-Dosis von 1000 mg/kg Futter mit der gemessenen durchschnittlichen Futterraufnahme von $16,5 \pm 0,5$ g bzw. $16,8 \pm 0,5$ g Futter/Tier/Tag ergab sich eine tägliche Substanzaufnahme von $16,5 \pm 0,5$ mg bzw. $16,8 \pm 0,5$ mg Genistein pro Tier. Unter Berücksichtigung des Ausgangsgewichts von 220 - 230 g und der durchschnittlichen Körpergewichtszunahme von $95,5 \pm 7,0$ g bzw. $92,1 \pm 5,3$ g über den Versuchszeitraum kann von einer durchgehenden geringen uterotrophen Wirkung ausgegangen werden. Ähnlich genaue Angaben zu dosisabhängigen uterotrophen Effekten von Equol und Puerarin lagen nicht vor. Für Equol in der hier verwendeten Dosis von 400 mg/kg Futter waren jedoch milde uterotrophe Effekte an ovariectomierten Ratten beobachtet worden, während geringere Dosierungen keine Uterotrophie zeigten (Rachon et al. 2007c). Bei einer durchschnittlichen Futterraufnahme von $15,0 \pm 0,5$ g bzw. $14,6 \pm 0,5$ g

Futter/Tier/Tag resultierte eine durchschnittliche tägliche Substanzaufnahme von $6,0 \pm 0,2$ mg bzw. $5,8 \pm 0,2$ mg Equol pro Tier. Auch Puerarin hatte in der hier verwendeten Dosis von 3000 mg/kg Futter bereits geringe uterotrophe Effekte an ovariectomierten Ratten hervorgerufen (Rachon et al. 2007a). Die relativ hohe Puerarin-Dosierung berücksichtigt, dass es als Glykosid des Daidzein eine vergleichsweise hohe molare Masse aufweist. Die durchschnittliche Futteraufnahme von $14,7 \pm 0,4$ g bzw. $14,3 \pm 0,5$ g Futter/Tier/Tag führte zu einer durchschnittlichen täglichen Substanzaufnahme von $44,1 \pm 1,2$ mg bzw. $42,9 \pm 1,5$ mg Puerarin pro Tier.

4.3 Körpergewichtszunahme

Da das Körpergewicht eng mit der Knochendichte assoziiert ist, gilt Übergewicht als protektiver Faktor einer erniedrigten Knochendichte (Pfeilschifter 2006). Allerdings ist der Einfluss der Fettmasse auf das Frakturrisiko umstritten (De Laet et al. 2005, Zhao et al. 2008). Neben größeren mechanischen Belastungen des Skelettsystems werden die mit der Fettmasse einhergehenden metabolischen Veränderungen im Hinblick auf den Knochenmetabolismus kritischer gesehen. Adipozyten fördern zwar durch ihre Aromatase-Aktivität die Konversion von Androgenen zu Östrogenen, können durch proinflammatorische Zytokine andererseits auch die Knochenresorption begünstigen (Rosen CJ und Bouxsein 2006). Die Auswirkungen des mit zunehmender Fettmasse ansteigenden Leptin-Serumspiegels auf den Knochen sind ebenfalls komplex. Neben lokal fördernden Einflüssen der Osteoblastogenese sind Zunahmen der Knochenresorption über zentrale Mechanismen beschrieben worden (Cirmanova et al. 2008).

Östrogene gelten als wichtige Regulatoren der Fettmasse (Wade et al. 1985). Neben direkten Effekten auf Adipozyten wirken Östrogene über zentrale Mechanismen auf den Energiehaushalt (Cooke und Naaz 2004). Nach Eintreten der Menopause beobachtet man bei Frauen eine Zunahme der intraabdominalen Fettmasse, welche häufig mit einer Gewichtszunahme einhergeht und durch die HT erfolgreich reduziert werden kann (Tchernof et al. 2000). E2-Substitution kann auch die nach Ovariectomie an Ratten beobachtete Körpergewichts- und intraabdominale Fettmassenzunahme erfolgreich abschwächen (Rachon et al. 2007b).

In allen Versuchsgruppen beobachtete man über den Versuchszeitraum eine Zunahme des Körpergewichts. Equol- und Puerarin-Substitution konnten ähnlich wie E2 die Körpergewichtszunahme signifikant reduzieren. Für Genistein war kein Einfluss auf das Körpergewicht festzustellen. Die Gruppendifferenzen fanden sich fast analog bei den unterschiedlichen Futteraufnahmen wieder. Das Vibrationstraining zeigte dagegen keine Beeinflussung der Futteraufnahme oder der Körpergewichtszunahme.

Die geringeren Körpergewichtszunahmen unter Equol- und Puerarin-Substitution können im Sinne einer ER α -agonistischen Wirkung interpretiert werden, welcher als der entscheidende Rezeptor zur Vermittlung östrogenen Effekte auf das Fettgewebe gilt (Heine et al. 2000, Seidlova-Wuttke et al. 2008). Aufgrund der erwarteten geringen Uterotrophie der verwendeten Dosierungen war dieser Effekt nicht überraschend. Erstaunlicher ist der fehlende Einfluss von Genistein, da für die verwendete Dosis ebenfalls eine geringe Uterotrophie anzunehmen war und reduzierte Körpergewichtszunahmen bereits beschrieben wurden (Naaz et al. 2003, Kim HK et al. 2006). Allerdings sind für Genistein dosisabhängig auch stimulierende Effekte auf die Adipogenese beobachtet worden (Dang 2009). Der Autor vermutet als Grund das komplexe Zusammenspiel der zahlreichen von Genistein beeinflussten Transduktionsmechanismen. Eine vergleichbar umfangreiche Wirkungsweise ist weder für die Isoflavone Equol und Puerarin noch für E2 beschrieben. So erklärt möglicherweise der nicht ausschließlich ER-vermittelte Effekt von Genistein die ausbleibende Beeinflussung der Körpergewichtszunahme.

Der fehlende Einfluss des Vibrationstrainings auf das Körpergewicht ist in zahlreichen anderen Studien an ovariectomierten Ratten ebenfalls festgestellt worden (Flieger et al. 1998, Rubin et al. 2001a, Oxlund et al. 2003, Judex et al. 2007, Rubinacci et al. 2008). Interessant sind in diesem Zusammenhang die Beobachtungen von Rubin et al. (2007) und Luu et al. (2009), die an Mäusen unter einem täglichen Vibrationstraining eine deutliche Reduktion der subkutanen und intraabdominalen Fettmasse ohne signifikante Gewichtsveränderungen feststellten. Somit könnte auch das hier verwendete Vibrationstraining zu einer vom Körpergewicht unabhängigen veränderten Körperkomposition geführt haben, zumal für Vibrationen anabole Effekte auf den Knochen und das Muskelgewebe beschrieben sind (Prisby et al. 2008). Der im Folgenden diskutierte fehlende systematische Einfluss des Vibrationstrainings auf den Knochen einschließlich des intramedullären Adipozytenanteils lässt eine veränderte Körperkomposition jedoch unwahrscheinlich erscheinen.

4.4 Vibrationstraining

Es wurde ein 30-Hz-Vibrationstraining gewählt, da sich diese Frequenz sowohl im Tierexperiment als auch an postmenopausalen Frauen als knochenwirksam erwiesen hatte und sich mit der verwendeten Vibrationsplatte technisch gut umsetzen ließ (Maximalfrequenz der verwendeten handelsüblichen Vibrationsplatte).

Die Vibrationsamplitude wurde vom Hersteller mit 2 mm angegeben. Die hervorgerufene Beschleunigung und die damit verbundene Vibrationsintensität ließen sich mit den zur Verfügung stehenden technischen Möglichkeiten nicht exakt ermitteln. Die tägliche Vibrationsdauer von 15 Minuten lag im Durchschnitt vergleichbarer Studien und erschien auch im Hinblick auf eine praxisnahe Umsetzbarkeit realistisch.

4.4.1 Auswirkungen auf den spongiösen Knochen

Mithilfe der histomorphometrischen Analyse sollte insbesondere der spongiöse Knochen untersucht werden, da dieser als Ort des frühen postmenopausalen bzw. ovariectomiebedingten Knochenmasseverlustes besonders von Effekten des Vibrationstrainings profitieren könnte. Rubin et al. (2002a) hatten mit einem 30-Hz-Vibrationstraining an hormonell intakten weiblichen Schafen eine deutliche Steigerung des spongiösen Knochenanteils durch Zunahme der Trabekelanzahl und -konnektivität beobachtet.

Die Auswirkungen des Vibrationstrainings auf die spongiöse Knochenarchitektur der Ratten blieben jedoch hinter den Erwartungen zurück. Kein einziger der untersuchten spongiösen Knochenparameter deutete auf einen Einfluss des Vibrationstrainings hin. Eine Verbesserung der Mechanosensitivität durch die Isoflavone war nicht erkennbar. Selbst E2 als potenteste der untersuchten östrogenen Substanzen blieb im Hinblick auf die Mechanosensitivität wirkungslos. Dieses Ergebnis ist enttäuschend, da Vibrationstraining bereits in mehreren Studien antiresorptive oder knochenanabole Effekte am spongiösen Knochen hervorgerufen hatte. Zudem wäre an der Spongiosa eine positive Beeinflussung der Mechanosensitivität durch die Isoflavone oder E2 am wahrscheinlichsten gewesen. Gerade dort macht sich der Östrogenmangel durch deutliche Knochenmasseverluste besonders bemerkbar (Lanyon und Skerry 2001).

Die ausbleibende antiresorptive Wirkung eines 30-Hz-Vibrationstrainings auf den spongiösen Knochen der proximalen Tibiametaphyse ovariectomierter Ratten wurde auch in einer anderen Studie festgestellt. Rubinacci et al. (2008) fanden für zwei verschiedene 30-Hz-Vibrationsprotokolle (0,6 bzw. 3 g, jeweils 20 min/Tag über 2 Monate) histomorphometrisch keine Beeinflussung der spongiösen Knochenarchitektur. Judex et al. (2007) stellten dagegen einen antiresorptiven Effekt am spongiösen Knochen lediglich für ein 90-Hz-Vibrationstraining fest, dagegen blieb ein sonst analoges 45-Hz-Vibrationsprotokoll wirkungslos. Weitere 90-Hz-Vibrationsprotokolle erwiesen sich an ovariectomierten Ratten als wirksam auf den durch Ovariectomie bzw. Immobilisation hervorgerufenen spongiösen Knochenmasseverlust (Rubin et al. 2001a, Sehmisch et al. 2009). Die Abhängigkeit des Vibrationseffektes von der Höhe der Applikationsfrequenz ist offensichtlich. Eine gesteigerte Mechanosensitivität hinsichtlich geringerer Vibrationsfrequenzen konnte weder durch die Isoflavone noch durch E2 erreicht werden. Wahrscheinlich stellte das verwendete 30-Hz-Vibrationstraining nur einen unterschweligen mechanischen Stimulus für den spongiösen Knochen dar. Diese Feststellung bestätigt die Ergebnisse der bereits an ovariectomierten Ratten erprobten Vibrationsprotokolle mit einer Vibrationsfrequenz unterhalb von 90 Hz.

Es ist erstaunlich, dass 30-Hz-Vibrationen bei Schafen zu so deutlichen spongiösen Knochenreaktionen führen konnten. Bei genauerer Betrachtung der Vibrationsdetails finden sich mögliche Erklärungen. Die Schafe befanden sich während des Vibrationstrainings in engen Käfigen, die die Bewegungsfreiheit stark einschränkten und nur wenige willkürliche Bewegungen zuließen. Die Ratten konnten sich im vibrierenden Käfig dagegen frei bewegen. Es ist anzunehmen, dass sich die mechanische Stimulation positionsabhängig laufend geändert hat. Rubin et al. (2003) stellten in ihrer Studie zur Übertragbarkeit hochfrequenter, niedrigamplitudiger Vibrationen auf das menschliche Skelettsystem fest, dass bereits kleine Positionsänderungen einen großen abschwächenden Einfluss haben können. Letztlich belegt jedoch der festgestellte Vibrationseffekt am kortikalen Knochen, dass die grundsätzliche Übertragbarkeit zur proximalen Tibiametaphyse gewährleistet war. Die proximale Tibiametaphyse ist aufgrund der räumlichen Nähe zur Vibrationsplatte weniger der abschwächenden Weichteildämpfung ausgesetzt, so dass Effekte an weiter entfernt liegenden, klinisch bedeutsameren Skelettabschnitten wie dem Schenkelhals oder den Wirbelkörpern unwahrscheinlich erscheinen. Diese Überlegung wird auch durch die Beobachtungen von Christiansen und Silva (2006) bestätigt, die an Mäusen die deutlichsten spongiösen Knochenreaktionen auf ein 90-Hz-Vibrationstraining an der proximalen Tibiametaphyse feststellten. Die Autoren vermuten außerdem, dass Kleintiere aufgrund ihrer geringen Körpergröße höhere Resonanzfrequenzen aufweisen, wodurch sich Unterschiede im wirksamen Frequenzspektrum von verschiedenen Tierarten und Menschen erklären lassen könnten. Für stehende Menschen wurden Resonanzfrequenzen im Bereich von 5,5 bis 17 Hz gefunden (Rubin et al. 2003). Diese werden von den üblichen Vibrationen problemlos erreicht. Zudem lässt sich die willkürliche Bewegungsaktivität durch entsprechende Trainingsanweisungen relativ einfach begrenzen. Es kann daher spekuliert werden, ob ein 30-Hz-Vibrationstraining bei postmenopausalen Frauen nicht effektiver gewesen wäre und zu spongiösen Knochenreaktionen geführt hätte. In den vorliegenden Studien von Rubin et al. (2004) und Verschueren et al. (2004) erwiesen sich Vibrationen von 30 Hz bzw. 35 – 40 Hz zumindest anhand der DXA-Knochendichte als wirksam.

4.4.2 Auswirkungen auf den kortikalen Knochen

Neben dem spongiösen Knochen wurde auch die Kortikalisdicke der proximalen Tibiametaphyse beurteilt. Kortikale Knochenapposition findet nach Östrogenentzug durch Menopause oder Ovariectomie verstärkt statt und lässt sich außerdem durch mechanische Stimulation fördern (Bass et al. 2002, Ahlborg et al. 2003). Da kortikale Adaptationsprozesse durch Östrogene behindert werden können, kam der Beurteilung der Kortikalisdicke eine besondere Bedeutung zu. Der Effekt der Isoflavone auf die periostale Knochenapposition

war dagegen nicht im Einzelnen bekannt. Allerdings deuteten die vorliegenden Erkenntnisse nicht auf eine nachteilige Beeinflussung der kortikalen Knochenadaptation hin.

Eine systematische Beeinflussung der Kortikalisdicke durch das Vibrationstraining war analog zum spongiösen Knochen nicht feststellbar. Allerdings zeigte sich eine isolierte signifikante Zunahme der Kortikalisdicke um fast 14 % ($p = 0,02$) bei den Vibro-Tieren gegenüber den Non-Vibro-Tieren der sojafreien Kontrollgruppe. Dieser Vibrationseffekt war in keiner Substanzgruppe feststellbar.

Die Zunahme der Kortikalisdicke bei den Kontrolltieren kann zunächst als Beweis einer erfolgreichen Übertragung der Vibrationen auf die proximale Tibiametaphyse gewertet werden. Mechanische Stimulation führt im Allgemeinen zur periostalen Knochenapposition (Bass et al. 2002). Auch für Vibrationstraining sind Auswirkungen auf den kortikalen Knochen beschrieben worden. Oxlund et al. (2003) sowie Rubinacci et al. (2008) fanden für ein 45-Hz- bzw. 30-Hz-Vibrationstraining eine gesteigerte periostale Knochenapposition bei ovariectomierten Ratten. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete kortikale Dickenzunahme in der Vibro-Kontrollgruppe ist wahrscheinlich ebenfalls auf eine gesteigerte periostale Knochenapposition zurückzuführen. Eine isolierte endostale Knochenapposition erscheint bei fehlenden spongiösen Vibrationseffekten unwahrscheinlich. Diese Vermutung wird durch die ausbleibende Dickenzunahme unter E2 bestärkt. Für E2 ist ein hemmender Einfluss auf die kortikale Knochenapposition bekannt (Turner RT et al. 1987, Kim BT et al. 2003). Auch Rubinacci et al. (2008) fanden an den nicht ovariectomierten Kontrolltieren keine kortikale Knochenreaktion auf das 30-Hz-Vibrationstraining. Rubin et al. (2002a) konnten trotz der deutlichen spongiösen Knochenreaktionen am kortikalen Knochen der hormonell intakten Schafe keinen Vibrationseffekt feststellen.

Von Bedeutung ist auch die Beobachtung, dass sämtliche Isoflavone kortikale Vibrationseffekte ebenfalls verhinderten. Für Isoflavone liegen im Zusammenhang mit mechanischer Stimulation nur wenige Erfahrungen vor. Allerdings ergaben Untersuchungen an ovariectomierten Ratten und Mäusen, dass die Kombination von Laufradtraining und Genistein-Substitution den größten Einfluss auf die Knochenstabilität zeigte (Nakajima et al. 2001, Wu J et al. 2001). Die hier festgestellte ausbleibende kortikale Dickenzunahme bei gleichzeitig fehlenden spongiösen Veränderungen lässt dagegen keine Verbesserung der Knochenstabilität annehmen. Dieses Ergebnis ist auch daher interessant, da sowohl E2 als auch die Isoflavone als gute ER β -Stimulatoren gelten, dessen Rolle im Rahmen der Mechanotransduktion häufig kontrovers gesehen wird. Saxon und Turner (2005) postulierten den ER β als „Anti-Mechanostat“. Es kann daher spekuliert werden, ob sich die überwiegende ER β -Affinität der Isoflavone nachteilig auf die Mechanosensitivität des kortikalen Knochens ausgewirkt hat. Für die Knochenstabilität ist der durch kortikale Knochenapposition zunehmende Knochendurchmesser von Bedeutung (Schoenau et al.

2001, Seeman 2008). Dies wurde auch von Oxlund et al. (2003) anhand eines Bruchtests und von Rubinacci et al. (2008) mit einem per pQCT berechneten Festigkeitsindex für den Vibrationseffekt am kortikalen Knochen der ovariectomierten Ratte bestätigt. Daher erscheint auch für die hier beobachtete kortikale Dickenzunahme eine Verbesserung der Knochenstabilität wahrscheinlich.

Eine Einschränkung der Aussagekraft des beobachteten kortikalen Vibrationseffektes stellt das nicht abgeschlossene Knochenwachstum der ovariectomierten Ratten dar. Aufgrund des ausbleibenden oder späten Epiphysenschlusses findet man auch an der proximalen Tibia ein langanhaltendes Knochenwachstum (Jee und Yao 2001, Lelovas et al. 2008). Möglicherweise wurde dadurch der kortikale Vibrationseffekt beeinflusst, so dass die Übertragbarkeit auf den Knochen postmenopausaler Frauen eingeschränkt wäre.

4.5 Isoflavone

Die Isoflavone aus der Gruppe der Phytoöstrogene gelten als natürliche SERMs, denen eine Abschwächung des postmenopausalen Knochenmasseverlustes bei geringem Risikoprofil zugetraut wird. Die alleinige Isoflavon-Substitution hatte bereits in mehreren Tierstudien einen knochenprotektiven Effekt unter Beweis gestellt (Setchell und Lydeking-Olsen 2003). Dementsprechend konnte von den Isoflavonen Equol, Genistein und Puerarin eine Reduktion des nach Ovariectomie einsetzenden spongiösen Knochenmasseverlustes erwartet werden.

Anhand der beurteilten histomorphometrischen Parameter wurden geringe antiresorptive Effekte am spongiösen Knochen insbesondere für Equol und Puerarin nachgewiesen. Dagegen zeigte sich unter Genistein lediglich eine isolierte Beeinflussung der Trabekelkonnektivität, die anderen spongiösen Knochenparameter ergaben keinen Wirkungsnachweis. Die antiresorptiven Effekte der Isoflavone fielen gegenüber E2 geringer aus.

Überraschend war der geringe Einfluss von Genistein auf den Knochenmasseverlust. Genistein ist das Hauptisoflavon der Sojabohne und hatte sich bereits mehrfach als knochenprotektiv erwiesen (Setchell und Lydeking-Olsen 2003). Knochenprotektive Effekte fanden sich schon bei niedrigen Dosierungen ohne begleitende Uterotrophie (Fanti et al. 1998, Ishimi et al. 2000). Die Einflüsse von Genistein gelten als komplex und beinhalten neben den ER-vermittelten Effekten noch zahlreiche weitere Wirkmechanismen. Am Knochen wurde eine dosisabhängige Wirkungsweise festgestellt. Anderson JJ et al. (1998) zeigten, dass mit steigender Genistein-Dosis der antiresorptive Effekt abnahm. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Genistein-Dosis (täglich $16,5 \pm 0,5$ mg bzw. $16,8 \pm 0,5$ mg pro Tier) war vergleichsweise hoch gewählt und nahm eine geringe Uterotrophie in Kauf. Es

lässt sich vermuten, dass die hohe Genistein-Dosis die erwünschten knochenprotektiven Effekte nicht zur Geltung kommen ließ. Ursächlich könnte, wie von Dang (2009) für die dosisabhängigen Effekte auf Adipozyten vermutet, das komplexe Zusammenspiel der zahlreichen von Genistein beeinflussten Transduktionsmechanismen sein.

Eine ähnlich komplexe Wirkungsweise ist für die beiden anderen untersuchten Isoflavone Equol und Puerarin nicht beschrieben. Obwohl auch für deren Dosierungen von einer geringen Uterotrophie auszugehen war, zeigten sich deutlichere antiresorptive Effekte. Dem Daidzein-Metaboliten Equol wird eine wichtige Rolle als knochenprotektive Substanz zugetraut (Setchell et al. 2002a). Antiresorptive Effekte zeigten sich am Knochen von ovariectomierten Ratten und Mäusen, die auch ohne oder nur geringe Uterotrophie beobachtet wurden (Fujioka et al. 2004, Mathey et al. 2007, Rachon et al. 2007b). Rachon et al. (2007b) fanden bei gleicher Equol-Dosis von 400 mg/kg Futter nach 6-wöchiger Applikationsdauer anhand der per pQCT bestimmten spongiösen Knochendichte lediglich an der lumbalen Wirbelsäule von Ratten einen antiresorptiven Effekt. Die Versuchsdauer von 3 Monaten führte dagegen zu signifikanten antiresorptiven Effekten auch an der proximalen Tibiametaphyse. Da dieser Effekt auch anhand der spongiösen Knochendichte nachgewiesen wurde, ist nicht von einer durch die verschiedenen Analyseverfahren bedingten Differenz auszugehen. Der ausbleibende antiresorptive Effekt nach 6-wöchiger Applikationsdauer ist eher auf den kurzen Beobachtungszeitraum zurückzuführen. Antiresorptive Effekte am Knochen sind häufig erst in Langzeitstudien sicher nachzuweisen (Setchell und Lydeking-Olsen 2003).

Bei Puerarin handelt sich im Gegensatz zu Equol und Genistein um ein Glykosid, welches als Substanz mit der höchsten östrogenen Wirkung im Wurzelextrakt der Kopoubohne identifiziert wurde (Boue et al. 2003). Extrakte der Kopoubohne hatten an ovariectomierten Mäusen eine antiresorptive Wirkung ohne begleitende Uterotrophie gezeigt (Wang et al. 2003). Für isoliertes Puerarin lagen dagegen kaum Erfahrungen vor. In der vorliegenden Arbeit konnte auch für Puerarin ein antiresorptiver Effekt bestätigt werden. Dagegen hatten Wang et al. (2003) für isoliertes Puerarin nach 4 Wochen keinen Wirkungsnachweis gefunden. Die an Mäusen verwendete Substanzmenge von täglich 2 – 8 mg pro Tier entspricht unter Berücksichtigung des etwa 10fach höheren Körpergewichts der Ratten einer annähernd vergleichbaren Puerarin-Dosis (täglich $44,1 \pm 1,2$ mg bzw. $42,9 \pm 1,5$ mg pro Tier). Wie am Beispiel Equol bereits vermutet, könnte der fehlende Wirkungsnachweis von Wang et al. (2003) auf den kurzen Beobachtungszeitraum von nur 4 Wochen zurückzuführen sein. Andererseits stellt sich die Frage, ob Puerarin, dessen Aglykon Daidzein oder der Metabolit Equol für die beobachtete antiresorptive Wirkung verantwortlich war. Prasain et al. (2004) konnten die Bioverfügbarkeit von reinem Puerarin in der Ratte nachweisen. Diese für glykosylierte Isoflavone ungewöhnliche Eigenschaft wurde auf die stabilere C-Konjugation

zurückgeführt. 72 Stunden nach Puerarin-Applikation fand sich jedoch Equol als häufigster Metabolit im Urin der Ratte. Die Autoren vermuteten, dass resorbiertes Puerarin über den enterohepatischen Kreislauf erneut in den Darm gelangte und dessen Metabolite nach intestinaler Biotransformation reabsorbiert wurden. Die Ratte mit ihrem großen Caecum und der reichhaltigen Mikroflora gilt als ausgezeichneter „Equol-Produzent“ (Setchell et al. 2002a). Dagegen wird angenommen, dass nur etwa 30 % der Frauen in westlichen Industrienationen Equol synthetisieren können (Cassidy et al. 2006, Song et al. 2006). Da auch Equol für den beobachteten Effekt verantwortlich gewesen sein könnte, wäre das hier demonstrierte antiresorptive Potenzial von Puerarin zu hinterfragen und nicht zweifelsfrei auch bei postmenopausalen Frauen zu erwarten.

4.6 Intramedullärer Adipozytenanteil

Ein weiterer histomorphometrisch beurteilter Parameter war der intramedulläre Adipozytenanteil (AV/TV) in der proximalen Tibiametaphyse. Es ist bekannt, dass alternde und osteoporotische Knochen gegenüber altersentsprechenden Normalbefunden eine auffällige Verfettung des Knochenmarks aufweisen (Meunier et al. 1971, Justesen et al. 2001). Diese ist auf eine Zunahme der Adipozytenanzahl und -größe zurückzuführen und lässt sich durch Östrogen-Substitution erfolgreich verhindern (Syed et al. 2008). Die genaue Rolle der Adipozyten im Knochenmark sowie der Grund der zunehmenden intramedullären Verfettung sind wenig verstanden. Neben dem passiven Auffüllen von hämatopoetisch nicht benötigten Markraumabschnitten werden auch aktive Beiträge zur Hämatopoese und dem Knochenmetabolismus diskutiert (Gimble et al. 1996, Rosen CJ und Bouxsein 2006, Rosen CJ et al. 2009).

Osteoblasten und Adipozyten befinden sich im Knochenmark in direkter Nachbarschaft und leiten sich von der gleichen multipotenten mesenchymalen Stammzelle ab. Für die Differenzierung zum Adipozyten spielt die Aktivierung des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors $\gamma 2$ (PPAR $\gamma 2$) eine wichtige Rolle (Rosen CJ et al. 2009). David et al. (2007) konnten anhand eines Laufradtrainings an Ratten zeigen, dass mechanische Stimulation zur verminderten Expression des PPAR $\gamma 2$ und zu einer reduzierten intramedullären Adipogenese führen kann. Auch durch Vibrationstraining ließ sich die intramedulläre Adipogenese erfolgreich reduzieren (Rubin et al. 2007, Luu et al. 2009). Durch eine resultierende gesteigerte Osteoblastogenese könnte die Inhibition der intramedullären Adipogenese knochenanaboles Potential besitzen (Nuttall und Gimble 2000). Möglicherweise stellt der intramedulläre Fettanteil zudem einen unabhängigen Risikofaktor für osteoporotische Frakturen dar (Wehrli et al. 2000).

Das verwendete 30-Hz-Vibrationstraining zeigte jedoch keine Beeinflussung des intramedullären Adipozytenanteils und hatte damit auch unter Berücksichtigung dieses

zusätzlichen Parameters keinen Einfluss auf das spongiöse Knochenkompartiment. Die von Rubin et al. (2007) und Luu et al. (2009) beobachtete reduzierte intramedulläre Adipogenese wurde jeweils für ein 90-Hz-Vibrationsprotokoll festgestellt, welches sich in gleicher oder ähnlicher Form auch am spongiösen Knochen als wirksam erwiesen hatte. Es bestätigte sich die bereits von Martin und Zissimos (1991) beschriebene Zunahme der intramedullären Verfettung nach Ovariectomie. Equol, Puerarin und E2 konnten entsprechend ihrer Wirksamkeit auf den spongiösen Knochenanteil die zunehmende intramedulläre Verfettung erfolgreich reduzieren.

4.7 pQCT-Messung der spongiösen Knochendichte

Die pQCT-Analyse wurde hinzugezogen, da es sich um ein nichtinvasives Verfahren handelt, welches im Gegensatz zur klassischen DXA die tatsächliche physikalische Dichte separat für spongiöses und kortikales Knochenkompartiment bestimmen kann und mit einer geringen Strahlenbelastung einhergeht (Schoenau et al. 2004). Dazu wird der Knochen mithilfe einer rotierenden Röntgenröhre und mehrerer Detektoren in Schichten gescannt. Die Schichten haben eine konstante Dicke, wodurch sich für jedes Volumenelement (Voxel) die physikalische Dichte in mg/cm^3 errechnen lässt (Sievanen et al. 1998). Neben der Knochendichte können auch verschiedene knochenarchitektonische Parameter abgeleitet werden. Die Bereiche des kortikalen und spongiösen Knochens sowie der umgebenden Weichteilstrukturen lassen sich mithilfe unterschiedlicher Dämpfungs-Schwellenwerte definieren. Als spongiöses Knochenkompartiment gilt der im Zentrum des Knochenquerschnitts gelegene Bereich, der eine geringere Dichte gegenüber den umliegenden kortikalen Knochenstrukturen aufweist. Die spongiöse Knochendichte (Tr.D) beschreibt die Gesamtdichte dieses Markraumabschnitts. Sie lässt sich bei Kleintieren verlässlich in der proximalen Tibiametaphyse oder der distalen Femurmetaphyse bestimmen (Ferretti et al. 2001). Die geringe Kortikalisdicke der Metaphyse verhindert dort jedoch die verlässliche Bestimmung der kortikalen Knochendichte und einiger weiterer Knochenparameter (Schoenau et al. 2004). Durch unvollständig gefüllte Voxel an der Knochenoberfläche fällt der sogenannte Partialvolumeneffekt stärker ins Gewicht und beeinträchtigt die Messgenauigkeit.

Da die spongiöse Knochendichte keine Aussage zur Knochenarchitektur macht, erschien ein Vergleich mit den histomorphometrisch erhobenen knochenarchitektonischen Parametern und den sich daraus ergebenden Rückschlüssen auf die Materialeigenschaften des Knochens interessant. Die pQCT-Messung der spongiösen Knochendichte ergab gut vergleichbare Ergebnisse zur histomorphometrischen Analyse. Die antiresorptiven Effekte von Equol und Puerarin konnten bestätigt werden. Allerdings fielen diese gegenüber dem E2-Effekt deutlich geringer aus. Erstaunlicherweise zeigte sich eine isolierte signifikante

Zunahme der spongiösen Knochendichte um fast 12 % ($p = 0,02$) bei den Vibro-Tieren gegenüber den Non-Vibro-Tieren der sojafreien Kontrollgruppe.

Dieses Ergebnis verwundert, da ein Einfluss des Vibrationstrainings auf den spongiösen Knochen anhand der histomorphometrischen Parameter nicht nachgewiesen werden konnte. Der in der pQCT-Analyse ausbleibende Vibrationseffekt in den Isoflavon- und E2-Gruppen zeigte sich zwar histomorphometrisch auch am kortikalen Knochen, allerdings war dort ein inhibierender Einfluss eher erwartet worden. Es lässt sich daher vermuten, dass die Messgenauigkeit der pQCT durch die kortikale Knochenreaktion beeinflusst wurde. Da jedoch der Messbereich des spongiösen Knochenkompartiments flexibel war und Veränderungen des kortikalen Knochens berücksichtigen konnte, erscheint diese Erklärung unbefriedigend. In der Metaphyse ist das spongiöse Knochenkompartiment verhältnismäßig groß, so dass eine Beeinflussung durch die dort relativ dünne Kortikalis unwahrscheinlich erscheint.

Differenzen zwischen histomorphometrischer Messung und pQCT-Analyse könnten auch durch die etwas unterschiedlichen Untersuchungsregionen bedingt sein. Die histomorphometrisch bestimmten spongiösen Knochenparameter wurden in einem Ausschnitt 0,5 – 2,5 mm distal der proximalen Epiphysenfuge der Tibia erhoben. Die Berechnung der spongiösen Knochendichte erfolgte als Mittelwert der beiden Schichtaufnahmen im Abstand von 3,75 und 4,25 mm distal der proximalen Epiphysenfuge. Für Unterschiede zwischen beiden Untersuchungsregionen spricht auch der relativ geringe antiresorptive Effekt der Isoflavone gegenüber E2 in der pQCT-Messung. Rosen HN et al. (1995) fanden ähnliche Differenzbeträge beim Vergleich der pQCT-Messung mit der histomorphometrischen Analyse im gleichen Abstand zur Epiphysenfuge. Zudem muss berücksichtigt werden, dass die histomorphometrische Analyse durch ihre 2-dimensionale Betrachtungsweise limitiert ist. Ungleichmäßige mikroarchitektonische Knochenveränderungen könnten dadurch nicht berücksichtigt werden. Im Rahmen des osteoporotischen Knochenmasseverlustes sind an menschlichen Wirbelkörpern ein überwiegender Verlust horizontaler Trabekelstrukturen beschrieben (Atkinson PJ 1967, Mosekilde 1988). Durch die Analyse der im Längsschnitt angefertigten Knochenpräparate würde ein ähnlich ungleichmäßiger Trabekelverlust in der proximalen Tibiametaphyse der Ratte weniger ins Gewicht fallen und ebenfalls Differenzen zur 3-dimensionalen Analyse der pQCT erklären. Möglicherweise war der antiresorptive Effekt der Isoflavone daher insgesamt geringer als aus der histomorphometrischen Analyse geschlossen werden konnte.

Trotz dieser Einschränkungen in der Vergleichbarkeit beider Analyseverfahren zeigten sich zwischen der spongiösen Knochendichte und dem spongiösen Knochenanteil (Tr.D vs. BV/TV: $r = 0,50$) sowie der Trabekelkonnektivität (Tr.D vs. N/T: $r = 0,45$) gute positive und

gegenüber dem intramedullären Adipozytenanteil (Tr.D vs. AV/TV: $r = -0,66$) gute negative signifikante Korrelationen. Diese Ergebnisse sind mit dem von Windahl et al. (2001) an Mäusen errechneten Korrelationskoeffizienten zwischen spongiöser Knochendichte und spongiösem Knochenanteil (Tr.D vs. BV/TV: $r = 0,68$) gut vergleichbar.

Anhand der spongiösen Knochendichte ließen sich demnach gute Rückschlüsse auf die spongiöse Knochenarchitektur ziehen. Da die Trabekeldurchmesser konstant blieben und nicht mit der spongiösen Knochendichte korrelierten, konnte von einer hohen spongiösen Knochendichte auf ein intaktes trabekuläres Netzwerk mit zahlreichen intertrabekulären Verbindungen geschlossen werden. Dies entspricht der Definition von Schoenau et al. (2004), welche in der spongiösen Knochendichte am ehesten eine Beschreibung der Trabekelanzahl sehen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kombination eines 30-Hz-Vibrationstrainings mit der Substitution verschiedener Isoflavone in der Prophylaxe des ovariectomiebedingten Knochenmasseverlustes der Ratte untersucht. Aufgrund der Parallelen zum postmenopausalen Knochenmasseverlust der Frau sollten damit Erkenntnisse zur Verbesserung der Osteoporoseprophylaxe gewonnen werden. Erhofftes Ziel der begleitenden Isoflavon-Substitution war ein größerer Vibrationseffekt. Möglicherweise ist die Mechanosensitivität des Knochengewebes aufgrund des postmenopausalen Östrogenmangels reduziert. Neben einer Förderung spongiöser Knochenadaptationsprozesse scheinen Östrogene kortikale Knochenreaktionen auch behindern zu können. Für Isoflavone lagen im Zusammenhang mit mechanischer Stimulation nur wenige Erfahrungen vor. Allerdings deuteten bisherige Erkenntnisse auf eine verbesserte Knochenstabilität ohne Behinderung von kortikalen Knochenadaptationsprozessen hin.

- Das Vibrationstraining zeigte keine Beeinflussung des ovariectomiebedingten spongiösen Knochenmasseverlustes. Unter Isoflavon- und E2-Substitution wurde ebenfalls kein Vibrationseffekt als Ausdruck einer gesteigerten Mechanosensitivität festgestellt. Das 30-Hz-Vibrationstraining erwies sich insgesamt als zu geringer Stimulus für den spongiösen Knochen.
- Der kortikale Knochen zeigte sich gegenüber der mechanischen Stimulation sensibler und wies als Vibrationseffekt eine Zunahme der Kortikalisdicke auf. Diese wurde durch die Isoflavone genauso wie durch E2 verhindert. Wahrscheinlich lag dem kortikalen Vibrationseffekt eine gesteigerte periostale Knochenapposition zugrunde, welche die Knochenstabilität positiv beeinflusst haben könnte.

Die alleinige Isoflavon-Substitution könnte sich durch ihre antiresorptive Wirkung am spongiösen Knochen ebenfalls positiv auf die Knochenstabilität ausgewirkt haben. Da die Isoflavone den kortikalen Vibrationseffekt jedoch verhinderten, hat sich die Kombination beider Interventionen in dieser Arbeit nicht bewährt.

Es ist fraglich, ob Menschen aufgrund geringerer Resonanzfrequenzen und reduzierter willkürlicher Aktivität gegenüber niedrigeren Vibrationsfrequenzen sensibler wären. Möglicherweise lässt sich das Ergebnis daher nur eingeschränkt auf die postmenopausale Frau übertragen. Hinsichtlich des Vibrationseffektes am kortikalen Knochen muss bedacht werden, dass das anhaltende Knochenwachstum der Ratten diesen beeinflusst haben könnte.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Postmenopausale Veränderungen des spongiösen Knochens	10
Abb. 1-2 Postmenopausale Veränderungen des kortikalen Knochens	10
Abb. 1-3 Östradiol (E2)	12
Abb. 1-4 Equol	17
Abb. 1-5 Genistein	18
Abb. 1-6 Puerarin	19
Abb. 1-7 Mechanostat-Modell nach Frost	20
Abb. 2-1 Bestimmung des spongiösen Knochenanteils (BV/TV) und des intramedullären Adipozytenanteils (AV/TV) in der proximalen Tibiametaphyse der ovariectomierten Ratte	33
Abb. 2-2 Bestimmung des Trabekeldurchmessers (Tb.Dm) in der proximalen Tibiametaphyse der ovariectomierten Ratte	34
Abb. 2-3 Trabekelstruktur der proximalen Tibiametaphyse der ovariectomierten Ratte	35
Abb. 2-4 Bestimmung der Trabekelkonnektivität (N/T) mithilfe der Strut Analysis in der proximalen Tibiametaphyse der ovariectomierten Ratte	35
Abb. 2-5 Bestimmung der Kortikalisdicke (Ct.Th) der proximalen Tibiametaphyse der ovariectomierten Ratte	36
Abb. 2-6 Bestimmung der spongiösen Knochendichte (Tr.D) der proximalen Tibiametaphyse der Ratte mithilfe der pQCT	37
Abb. 3-1 Körpergewichtszunahme ovariectomierter Ratten nach 3 Monaten unter sojafreiem Kontrollfutter, E2, Equol, Genistein oder Puerarin ± Vibrationstraining	40
Abb. 3-2 Spongiöser Knochenanteil (BV/TV = 100 x spongiöse Knochenfläche / Fläche des Untersuchungsausschnitts der proximalen Tibiametaphyse ovariectomierter Ratten nach 3 Monaten unter sojafreiem Kontrollfutter, E2, Equol, Genistein oder Puerarin ± Vibrationstraining)	41
Abb. 3-3 Trabekeldurchmesser (Tb.Dm) in der proximalen Tibiametaphyse ovariectomierter Ratten nach 3 Monaten unter sojafreiem Kontrollfutter, E2, Equol, Genistein oder Puerarin ± Vibrationstraining	42
Abb. 3-4 Trabekelkonnektivität (N/T = Quotient aus Trabekel-Kreuzungspunkten N und freien Trabekel-Enden T) in der proximalen Tibiametaphyse ovariectomierter Ratten nach 3 Monaten unter sojafreiem Kontrollfutter, E2, Equol, Genistein oder Puerarin ± Vibrationstraining	43

Abb. 3-5 Kortikalisdicke (Ct.Th) der proximalen Tibiametaphyse ovariectomierter Ratten nach 3 Monaten unter sojafreiem Kontrollfutter, E2, Equol, Genistein oder Puerarin ± Vibrationstraining	44
Abb. 3-6 Intramedullärer Adipozytenanteil (AV/TV = 100 x Adipöse Gewebefläche / Fläche des Untersuchungsausschnitts) in der proximalen Tibiametaphyse ovariectomierter Ratten nach 3 Monaten unter sojafreiem Kontrollfutter, E2, Equol, Genistein oder Puerarin ± Vibrationstraining	45
Abb. 3-7 Spongiöse Knochendichte (Tr.D) der proximalen Tibiametaphyse ovariectomierter Ratten nach 3 Monaten unter sojafreiem Kontrollfutter, E2, Equol, Genistein oder Puerarin ± Vibrationstraining	46
Abb. 3-8 Korrelation der spongiösen Knochendichte (Tr.D) mit den korrespondierenden histomorphometrisch erhobenen Parametern des spongiösen Knochens der proximalen Tibiametaphyse ovariectomierter Ratten nach 3 Monaten unter sojafreiem Kontrollfutter, E2, Equol, Genistein oder Puerarin ± Vibrationstraining	47

6.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1 Klassifikation der Phytoöstrogene	14
Tab. 2-1 Gruppeneinteilung mit Substanzmengen	29
Tab. 2-2 Vibrationsparameter	29
Tab. 3-1 Tägliche Futter- und Substanzaufnahme ovariectomierter Ratten nach 3 Monaten unter sojafreiem Kontrollfutter, E2, Equol, Genistein oder Puerarin ± Vibrationstraining	39

7 Literaturverzeichnis

- Aaron JE, Makins NB, Sagreiya K (1987): The microanatomy of trabecular bone loss in normal aging men and women. *Clin Orthop Relat Res* 215, 260-271
- Abe T, Sato K, Miyakoshi N, Kudo T, Tamura Y, Tsuchida T, Kasukawa Y (1999): Trabecular remodeling processes in the ovariectomized rat: modified node-strut analysis. *Bone* 24, 591-596
- Adlercreutz H (1995): Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7, 103-112
- Adlercreutz H, Markkanen H, Watanabe S (1993): Plasma concentrations of phytoestrogens in Japanese men. *Lancet* 342, 1209-1210
- Ahlborg HG, Johnell O, Turner CH, Rannevik G, Karlsson MK (2003): Bone loss and bone size after menopause. *N Engl J Med* 349, 327-334
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y (1987): Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262, 5592-5595
- Albright F, Smith P, Richardson A (1941): Postmenopausal osteoporosis. *JAMA* 116, 2465-2474
- Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW, Toda T (2000): Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr* 72, 844-852
- Alekel DL, Van Loan MD, Koehler KJ, Hanson LN, Stewart JW, Hanson KB, Kurzer MS, Peterson CT (2010): The soy isoflavones for reducing bone loss (SIRBL) study: a 3-y randomized controlled trial in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 91, 218-230
- Alexandersen P, Toussaint A, Christiansen C, Devogelaer JP, Roux C, Fechtenbaum J, Gennari C, Reginster JY (2001): Ipriflavone in the treatment of postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. *JAMA* 285, 1482-1488
- An J, Tzagarakis-Foster C, Scharschmidt TC, Lomri N, Leitman DC (2001): Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *J Biol Chem* 276, 17808-17814
- Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, Bonds D, Brunner R, Brzyski R, Caan B, et al. (2004): Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 291, 1701-1712
- Anderson JJ, Garner SC (1998): Phytoestrogens and bone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12, 543-557
- Anderson JJ, Ambrose WW, Garner SC (1998): Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. *Proc Soc Exp Biol Med* 217, 345-350

- Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, Kukreja SC (1996): Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr* 126, 161-167
- 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, 1364S-1368S
- Arjmandi BH, Lucas EA, Khalil DA, Devareddy L, Smith BJ, McDonald J, Arquitt AB, Payton ME, Mason C (2005): One year soy protein supplementation has positive effects on bone formation markers but not bone density in postmenopausal women. *Nutr J* 4, 8
- Arora A, Nair MG, Strasburg GM (1998): Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch Biochem Biophys* 356, 133-141
- 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, 326-333
- Atkinson PJ (1967): Variation in trabecular structure of vertebrae with age. *Calcif Tissue Res* 1, 24-32
- Banks E, Beral V, Reeves G, Balkwill A, Barnes I (2004): Fracture incidence in relation to the pattern of use of hormone therapy in postmenopausal women. *JAMA* 291, 2212-2220
- Bass SL, Saxon L, Daly RM, Turner CH, Robling AG, Seeman E, Stuckey S (2002): The effect of mechanical loading on the size and shape of bone in pre-, peri-, and postpubertal girls: a study in tennis players. *J Bone Miner Res* 17, 2274-2280
- Bassey EJ, Rothwell MC, Littlewood JJ, Pye DW (1998): Pre- and postmenopausal women have different bone mineral density responses to the same high-impact exercise. *J Bone Miner Res* 13, 1805-1813
- Bennetts H, Underwood E, Shier F (1946): A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust J Agric Res* 22, 131 - 138
- BfArM - Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (2004): 10/04 BfArM ordnet wichtige Änderung der Zulassungen für Arzneimittel zur Hormonersatztherapie an. URL: http://www.bfarm.de/clin_012/nn_421158/DE/BfArM/Presse/mitteil2004/pm10-2004.html__nnn=true [Online im Internet, Stand: 01.10.2010 um 10:00 Uhr]
- BfR - Bundesinstitut für Risikobewertung (2007): Isolierte Isoflavone sind nicht ohne Risiko - Aktualisierte Stellungnahme* Nr. 039/2007 des BfR vom 3. April 2007. URL: http://www.bfr.bund.de/cm/208/isolierte_isoflavone_sind_nicht_ohne_risiko.pdf [Online im Internet, Stand: 01.10.2010 um 10:00 Uhr]
- Blair HC, Jordan SE, Peterson TG, Barnes S (1996): Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem* 61, 629-637
- Bonjour JP, Theintz G, Law F, Slosman D, Rizzoli R (1994): Peak bone mass. *Osteoporos Int* 4 Suppl 1, 7-13
- Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J (2001): Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2309-2314

- Borer KT (2005): Physical activity in the prevention and amelioration of osteoporosis in women : interaction of mechanical, hormonal and dietary factors. *Sports Med* 35, 779-830
- Boue SM, Wiese TE, Nehls S, Burow ME, Elliott S, Carter-Wientjes CH, Shih BY, McLachlan JA, Cleveland TE (2003): Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. *J Agric Food Chem* 51, 2193-2199
- Bouillon R, Bex M, Vanderschueren D, Boonen S (2004): Estrogens are essential for male pubertal periosteal bone expansion. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 6025-6029
- Bousson V, Meunier A, Bergot C, Vicaut E, Rocha MA, Morais MH, Laval-Jeantet AM, Laredo JD (2001): Distribution of intracortical porosity in human midfemoral cortex by age and gender. *J Bone Miner Res* 16, 1308-1317
- Brink E, Coxam V, Robins S, Wahala K, Cassidy A, Branca F (2008): Long-term consumption of isoflavone-enriched foods does not affect bone mineral density, bone metabolism, or hormonal status in early postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo controlled study. *Am J Clin Nutr* 87, 761-770
- Brown JP, Delmas PD, Arlot M, Meunier PJ (1987): Active bone turnover of the cortico-endosteal envelope in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 64, 954-959
- Brown NM, Setchell KD (2001): Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones. *Lab Invest* 81, 735-747
- Brzezinski A, Debi A (1999): Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 85, 47-51
- Burger EH, Klein-Nulend J (1999): Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J* 13 Suppl, S101-112
- Cardinale M, Bosco C (2003): The use of vibration as an exercise intervention. *Exerc Sport Sci Rev* 31, 3-7
- Cardinale M, Wakeling J (2005): Whole body vibration exercise: are vibrations good for you? *Br J Sports Med* 39, 585-589; discussion 589
- Cassidy A, Brown JE, Hawdon A, Faughnan MS, King LJ, Millward J, Zimmer-Nechemias L, Wolfe B, Setchell KD (2006): Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. *J Nutr* 136, 45-51
- Cauley JA, Robbins J, Chen Z, Cummings SR, Jackson RD, LaCroix AZ, LeBoff M, Lewis CE, McGowan J, Neuner J, et al. (2003): Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density: the Women's Health Initiative randomized trial. *JAMA* 290, 1729-1738
- Chen X, Anderson JJ (2002): Isoflavones and bone: animal and human evidence of efficacy. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2, 352-359
- Chen X, Garner SC, Anderson JJ (2002): Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen-receptor-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 417-422

- Cheng MZ, Rawlinson SC, Pitsillides AA, Zaman G, Mohan S, Baylink DJ, Lanyon LE (2002): Human osteoblasts' proliferative responses to strain and 17beta-estradiol are mediated by the estrogen receptor and the receptor for insulin-like growth factor I. *J Bone Miner Res* 17, 593-602
- Chilibeck PD, Cornish SM (2008): Effect of estrogenic compounds (estrogen or phytoestrogens) combined with exercise on bone and muscle mass in older individuals. *Appl Physiol Nutr Metab* 33, 200-212
- Chilibeck PD, Sale DG, Webber CE (1995): Exercise and bone mineral density. *Sports Med* 19, 103-122
- Christiansen BA, Silva MJ (2006): The effect of varying magnitudes of whole-body vibration on several skeletal sites in mice. *Ann Biomed Eng* 34, 1149-1156
- Cirmanova V, Bayer M, Starka L, Zajickova K (2008): The effect of leptin on bone: an evolving concept of action. *Physiol Res* 57 Suppl 1, S143-151
- Compston JE (2001): Sex steroids and bone. *Physiol Rev* 81, 419-447
- Cooke PS, Naaz A (2004): Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med (Maywood)* 229, 1127-1135
- Dalais FS, Rice GE, Wahlqvist ML, Grehan M, Murkies AL, Medley G, Ayton R, Strauss BJ (1998): Effects of dietary phytoestrogens in postmenopausal women. *Climacteric* 1, 124-129
- Damien E, Price JS, Lanyon LE (1998): The estrogen receptor's involvement in osteoblasts' adaptive response to mechanical strain. *J Bone Miner Res* 13, 1275-1282
- Dampier K, Hudson EA, Howells LM, Manson MM, Walker RA, Gescher A (2001): Differences between human breast cell lines in susceptibility towards growth inhibition by genistein. *Br J Cancer* 85, 618-624
- Dandanell R, Engstrom K (1986): Vibration from riveting tools in the frequency range 6 Hz-10 MHz and Raynaud's phenomenon. *Scand J Work Environ Health* 12, 338-342
- Dang ZC (2009): Dose-dependent effects of soy phyto-oestrogen genistein on adipocytes: mechanisms of action. *Obes Rev* 10, 342-349
- David V, Martin A, Lafage-Proust MH, Malaval L, Peyroche S, Jones DB, Vico L, Guignandon A (2007): Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. *Endocrinology* 148, 2553-2562
- De Laet C, Kanis JA, Oden A, Johanson H, Johnell O, Delmas P, Eisman JA, Kroger H, Fujiwara S, Garnero P, et al. (2005): Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 16, 1330-1338
- Dempster DW, Birchman R, Xu R, Lindsay R, Shen V (1995): Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. *Bone* 16, 157-161
- DGGG - Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (2009): Hormontherapie in der Peri- und Postmenopause (HT) - Interdisziplinäre S 3-Leitlinie, AWMF 015/062 - Langversion mit Quellentexten. URL:

- http://www.dggg.de/fileadmin/public_docs/Leitlinien/2-1-4-ht-lang-hp1.pdf [Online im Internet, Stand: 01.10.2010 um 10:00 Uhr]
- Duan Y, Turner CH, Kim BT, Seeman E (2001): Sexual dimorphism in vertebral fragility is more the result of gender differences in age-related bone gain than bone loss. *J Bone Miner Res* 16, 2267-2275
- DVO - Dachverband Osteologie (2009): DVO-Leitlinie 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen - Langfassung. URL: http://www.dv-osteologie.org/uploads/leitlinien/DVO-Leitlinie%202009%20Langfassung_Druck.pdf [Online im Internet, Stand: 01.10.2010 um 10:00 Uhr]
- Ehrlich PJ, Lanyon LE (2002): Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporos Int* 13, 688-700
- Ensrud KE, Stock JL, Barrett-Connor E, Grady D, Mosca L, Khaw KT, Zhao Q, Agnusdei D, Cauley JA (2008): Effects of raloxifene on fracture risk in postmenopausal women: the Raloxifene Use for the Heart Trial. *J Bone Miner Res* 23, 112-120
- Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL (1988): Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 241, 84-86
- Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR, Stakkestad J, et al. (1999): Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *JAMA* 282, 637-645
- 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, 274-281
- Felsenberg D, Dietzel R (2008): Leitlinie Physiotherapie und Bewegungstherapie bei Osteoporose - Langfassung - Endversion 0.1 vom 29.04.2008. URL: http://www.dv-osteologie.org/uploads/leitlinien/Langfassung_Physiotherapie-Leitlinie.pdf [Online im Internet, Stand: 01.10.2010 um 10:00 Uhr]
- Ferretti JL, Cointy GR, Capozza RF, Capiglioneri R, Chiappe MA (2001): Analysis of biomechanical effects on bone and on the muscle-bone interactions in small animal models. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1, 263-274
- Feskanich D, Willett W, Colditz G (2002): Walking and leisure-time activity and risk of hip fracture in postmenopausal women. *JAMA* 288, 2300-2306
- Flieger J, Karachalios T, Khaldi L, Raptou P, Lyritis G (1998): Mechanical stimulation in the form of vibration prevents postmenopausal bone loss in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 63, 510-514
- Foldes J, Parfitt AM, Shih MS, Rao DS, Kleerekoper M (1991): Structural and geometric changes in iliac bone: relationship to normal aging and osteoporosis. *J Bone Miner Res* 6, 759-766
- Frankenfeld CL, McTiernan A, Thomas WK, LaCroix K, McVarish L, Holt VL, Schwartz SM, Lampe JW (2006): Postmenopausal bone mineral density in relation to soy isoflavone-metabolizing phenotypes. *Maturitas* 53, 315-324

- Fritton SP, McLeod KJ, Rubin CT (2000): Quantifying the strain history of bone: spatial uniformity and self-similarity of low-magnitude strains. *J Biomech* 33, 317-325
- Frost HM (1987): The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism of osteoporoses and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. *Bone Miner* 2, 73-85
- Frost HM (1997): Why do marathon runners have less bone than weight lifters? A vital-biomechanical view and explanation. *Bone* 20, 183-189
- Frost HM (1998): A brief review for orthopedic surgeons: fatigue damage (microdamage) in bone (its determinants and clinical implications). *J Orthop Sci* 3, 272-281
- Frost HM (1999): On the estrogen-bone relationship and postmenopausal bone loss: A new model. *J Bone Miner Res* 14, 1473-1477
- Frost HM (2003): Bone's mechanostat: a 2003 update. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 275, 1081-1101
- Frost HM (2004): A 2003 update of bone physiology and Wolff's Law for clinicians. *Angle Orthod* 74, 3-15
- Frost HM, Jee WS (1992): On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner* 18, 227-236
- 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, 2623-2627
- Fyhrie DP, Schaffler MB (1994): Failure mechanisms in human vertebral cancellous bone. *Bone* 15, 105-109
- Gallagher JC, Satpathy R, Rafferty K, Haynatzka V (2004): The effect of soy protein isolate on bone metabolism. *Menopause* 11, 290-298
- Gao YH, Yamaguchi M (2000): Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclasts: involvement of protein kinase inhibition and protein tyrosine phosphatase activation. *Int J Mol Med* 5, 261-267
- Garman R, Rubin C, Judex S (2007): Small oscillatory accelerations, independent of matrix deformations, increase osteoblast activity and enhance bone morphology. *PLoS ONE* 2, e653
- Garrahan NJ, Mellish RW, Compston JE (1986): A new method for the two-dimensional analysis of bone structure in human iliac crest biopsies. *J Microsc* 142, 341-349
- Geller SE, Studee L (2006): Soy and red clover for mid-life and aging. *Climacteric* 9, 245-263
- Gilsanz V, Wren TA, Sanchez M, Dorey F, Judex S, Rubin C (2006): Low-level, high-frequency mechanical signals enhance musculoskeletal development of young women with low BMD. *J Bone Miner Res* 21, 1464-1474
- Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA (1996): The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone* 19, 421-428

- Glazier MG, Bowman MA (2001): A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. *Arch Intern Med* 161, 1161-1172
- Gluer CC, Eastell R, Reid DM, Felsenberg D, Roux C, Barkmann R, Timm W, Blenk T, Armbrecht G, Stewart A, et al. (2004): Association of five quantitative ultrasound devices and bone densitometry with osteoporotic vertebral fractures in a population-based sample: the OPUS Study. *J Bone Miner Res* 19, 782-793
- Gohel A, McCarthy MB, Gronowicz G (1999): Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblasts in vivo and in vitro. *Endocrinology* 140, 5339-5347
- Gregg EW, Cauley JA, Seeley DG, Ensrud KE, Bauer DC (1998): Physical activity and osteoporotic fracture risk in older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann Intern Med* 129, 81-88
- Griffin MJ (1998): Predicting the hazards of whole-body vibration--considerations of a standard. *Ind Health* 36, 83-91
- Hargreaves DF, Potten CS, Harding C, Shaw LE, Morton MS, Roberts SA, Howell A, Bundred NJ (1999): Two-week dietary soy supplementation has an estrogenic effect on normal premenopausal breast. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 4017-4024
- Harris HA, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS (2002): Characterization of the biological roles of the estrogen receptors, ERalpha and ERbeta, in estrogen target tissues in vivo through the use of an ERalpha-selective ligand. *Endocrinology* 143, 4172-4177
- Harrison E, Adjei A, Ameho C, Yamamoto S, Kono S (1998): The effect of soybean protein on bone loss in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 44, 257-268
- Haussler B, Gothe H, Gol D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D (2007): Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. *Osteoporos Int* 18, 77-84
- Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS (2000): Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12729-12734
- Heiss G, Wallace R, Anderson GL, Aragaki A, Beresford SA, Brzyski R, Chlebowski RT, Gass M, LaCroix A, Manson JE, et al. (2008): Health risks and benefits 3 years after stopping randomized treatment with estrogen and progestin. *JAMA* 299, 1036-1045
- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL (1999): Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 140, 4367-4370
- Hoidrup S, Sorensen TI, Stroger U, Lauritzen JB, Schroll M, Gronbaek M (2001): Leisure-time physical activity levels and changes in relation to risk of hip fracture in men and women. *Am J Epidemiol* 154, 60-68
- Hsu CS, Shen WW, Hsueh YM, Yeh SL (2001): Soy isoflavone supplementation in postmenopausal women. Effects on plasma lipids, antioxidant enzyme activities and bone density. *J Reprod Med* 46, 221-226

- Huang RP, Rubin CT, McLeod KJ (1999): Changes in postural muscle dynamics as a function of age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 54, B352-357
- Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF (1996): Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med* 2, 1132-1136
- Huh JE, Yang HR, Park DS, Choi DY, Baek YH, Cho EM, Cho YJ, Kang-II K, Kim DY, Lee JD (2006): Puerariae radix promotes differentiation and mineralization in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *J Ethnopharmacol* 104, 345-350
- Ikeda Y, Iki M, Morita A, Kajita E, Kagamimori S, Kagawa Y, Yoneshima H (2006): Intake of fermented soybeans, natto, is associated with reduced bone loss in postmenopausal women: Japanese Population-Based Osteoporosis (JPOS) Study. *J Nutr* 136, 1323-1328
- Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, Onoe Y, Sato T, Uchiyama Y, Ito M, Wang X, Suda T, Ikegami S (1999): Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology* 140, 1893-1900
- Ishimi Y, Arai N, Wang X, Wu J, Umegaki K, Miyaura C, Takeda A, Ikegami S (2000): Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem Biophys Res Commun* 274, 697-701
- Jankovich JP (1972): The effects of mechanical vibration on bone development in the rat. *J Biomech* 5, 241-250
- Jarvinen TL, Kannus P, Sievanen H (2003): Estrogen and bone--a reproductive and locomotive perspective. *J Bone Miner Res* 18, 1921-1931
- Jee WS, Yao W (2001): Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1, 193-207
- Jordan GR, Loveridge N, Bell KL, Power J, Rushton N, Reeve J (2000): Spatial clustering of remodeling osteons in the femoral neck cortex: a cause of weakness in hip fracture? *Bone* 26, 305-313
- Judex S, Rubin CT (2010): Is bone formation induced by high-frequency mechanical signals modulated by muscle activity? *J Musculoskelet Neuronal Interact* 10, 3-11
- Judex S, Lei X, Han D, Rubin C (2007): Low-magnitude mechanical signals that stimulate bone formation in the ovariectomized rat are dependent on the applied frequency but not on the strain magnitude. *J Biomech* 40, 1333-1339
- Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M (2001): Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2, 165-171
- Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW (1989): The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology* 124, 7-16
- Kanis JA (1994): Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int* 4, 368-381

- Kelley GA, Kelley KS, Tran ZV (2001): Resistance training and bone mineral density in women: a meta-analysis of controlled trials. *Am J Phys Med Rehabil* 80, 65-77
- Kelley GA, Kelley KS, Tran ZV (2002): Exercise and lumbar spine bone mineral density in postmenopausal women: a meta-analysis of individual patient data. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57, M599-604
- Khosla S, Atkinson EJ, Melton LJ, 3rd, Riggs BL (1997): Effects of age and estrogen status on serum parathyroid hormone levels and biochemical markers of bone turnover in women: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 1522-1527
- Kiel DP, Felson DT, Anderson JJ, Wilson PW, Moskowitz MA (1987): Hip fracture and the use of estrogens in postmenopausal women. The Framingham Study. *N Engl J Med* 317, 1169-1174
- Kim BT, Mosekilde L, Duan Y, Zhang XZ, Tornvig L, Thomsen JS, Seeman E (2003): The structural and hormonal basis of sex differences in peak appendicular bone strength in rats. *J Bone Miner Res* 18, 150-155
- Kim H, Peterson TG, Barnes S (1998): Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways. *Am J Clin Nutr* 68, 1418S-1425S
- Kim HK, Nelson-Dooley C, Della-Fera MA, Yang JY, Zhang W, Duan J, Hartzell DL, Hamrick MW, Baile CA (2006): Genistein decreases food intake, body weight, and fat pad weight and causes adipose tissue apoptosis in ovariectomized female mice. *J Nutr* 136, 409-414
- Knothe Tate ML, Niederer P, Knothe U (1998): In vivo tracer transport through the lacunocanalicular system of rat bone in an environment devoid of mechanical loading. *Bone* 22, 107-117
- Kohrt WM, Snead DB, Slatopolsky E, Birge SJ, Jr. (1995): Additive effects of weight-bearing exercise and estrogen on bone mineral density in older women. *J Bone Miner Res* 10, 1303-1311
- Kohrt WM, Ehsani AA, Birge SJ, Jr. (1998): HRT preserves increases in bone mineral density and reductions in body fat after a supervised exercise program. *J Appl Physiol* 84, 1506-1512
- Kohrt WM, Bloomfield SA, Little KD, Nelson ME, Yingling VR (2004): American College of Sports Medicine Position Stand: physical activity and bone health. *Med Sci Sports Exerc* 36, 1985-1996
- 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 U S A* 93, 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 alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863-870
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA (1998): Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252-4263

- Lanyon L, Skerry T (2001): Postmenopausal osteoporosis as a failure of bone's adaptation to functional loading: a hypothesis. *J Bone Miner Res* 16, 1937-1947
- Lee K, Lanyon LE (2004): Mechanical loading influences bone mass through estrogen receptor alpha. *Exerc Sport Sci Rev* 32, 64-68
- Lee K, Jessop H, Suswillo R, Zaman G, Lanyon L (2003): Endocrinology: bone adaptation requires oestrogen receptor-alpha. *Nature* 424, 389
- Lee K, Jessop H, Suswillo R, Zaman G, Lanyon LE (2004): The adaptive response of bone to mechanical loading in female transgenic mice is deficient in the absence of oestrogen receptor-alpha and -beta. *J Endocrinol* 182, 193-201
- Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA (2008): The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 58, 424-430
- Limer JL, Speirs V (2004): Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res* 6, 119-127
- Lindberg MK, Alatalo SL, Halleen JM, Mohan S, Gustafsson JA, Ohlsson C (2001): Estrogen receptor specificity in the regulation of the skeleton in female mice. *J Endocrinol* 171, 229-236
- Luu YK, Capilla E, Rosen CJ, Gilsanz V, Pessin JE, Judex S, Rubin CT (2009): Mechanical stimulation of mesenchymal stem cell proliferation and differentiation promotes osteogenesis while preventing dietary-induced obesity. *J Bone Miner Res* 24, 50-61
- Lydeking-Olsen E, Beck-Jensen JE, Setchell KD, Holm-Jensen T (2004): Soymilk or progesterone for prevention of bone loss--a 2 year randomized, placebo-controlled trial. *Eur J Nutr* 43, 246-257
- Manolagas SC (2000): Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21, 115-137
- Marrian GF, Haslewood GA (1932): Equol, a new inactive phenol isolated from the ketohydroxyoestrin fraction of mares' urine. *Biochem J* 26, 1227-1232
- Martin RB, Zissimos SL (1991): Relationships between marrow fat and bone turnover in ovariectomized and intact rats. *Bone* 12, 123-131
- Mathey J, Mardon J, Fokialakis N, Puel C, Kati-Coulibaly S, Mitakou S, Bennetau-Pelissero C, Lamothe V, Davicco MJ, Lebecque P, et al. (2007): Modulation of soy isoflavones bioavailability and subsequent effects on bone health in ovariectomized rats: the case for equol. *Osteoporos Int* 18, 671-679
- Mayoux-Benhamou MA, Roux C, Perraud A, Fermanian J, Rahali-Kachloul H, Revel M (2005): Predictors of compliance with a home-based exercise program added to usual medical care in preventing postmenopausal osteoporosis: an 18-month prospective study. *Osteoporos Int* 16, 325-331
- Meunier P, Aaron J, Edouard C, Vignon G (1971): Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clin Orthop Relat Res* 80, 147-154

- Michael McClain R, Wolz E, Davidovich A, Pfannkuch F, Edwards JA, Bausch J (2006): Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats. *Food Chem Toxicol* 44, 56-80
- Milliken LA, Going SB, Houtkooper LB, Flint-Wagner HG, Figueroa A, Metcalfe LL, Blew RM, Sharp SC, Lohman TG (2003): Effects of exercise training on bone remodeling, insulin-like growth factors, and bone mineral density in postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. *Calcif Tissue Int* 72, 478-484
- Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, D'Anna R, Corrado F, Pizzoleo MA, Cincotta M, et al. (2002): Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res* 17, 1904-1912
- Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y (2001): Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol Pharm Bull* 24, 351-356
- Mosekilde L (1988): Age-related changes in vertebral trabecular bone architecture--assessed by a new method. *Bone* 9, 247-250
- Naaz A, Yellayi S, Zakroczymski MA, Bunick D, Doerge DR, Lubahn DB, Helferich WG, Cooke PS (2003): The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology* 144, 3315-3320
- Nachtigall LE, Nachtigall RH, Nachtigall RD, Beckman EM (1979): Estrogen replacement therapy I: a 10-year prospective study in the relationship to osteoporosis. *Obstet Gynecol* 53, 277-281
- Nagata C, Takatsuka N, Kawakami N, Shimizu H (2001): Soy product intake and hot flashes in Japanese women: results from a community-based prospective study. *Am J Epidemiol* 153, 790-793
- Nagel SC, vom Saal FS, Welshons WV (1998): The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 217, 300-309
- Nakajima D, Kim CS, Oh TW, Yang CY, Naka T, Igawa S, Ohta F (2001): Suppressive effects of genistein dosage and resistance exercise on bone loss in ovariectomized rats. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 20, 285-291
- Nordstrom P, Pettersson U, Lorentzon R (1998): Type of physical activity, muscle strength, and pubertal stage as determinants of bone mineral density and bone area in adolescent boys. *J Bone Miner Res* 13, 1141-1148
- North-American-Menopause-Society (2006): Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2006 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause* 13, 340-367; quiz 368-349
- Notelovitz M, Martin D, Tesar R, Khan FY, Probart C, Fields C, McKenzie L (1991): Estrogen therapy and variable-resistance weight training increase bone mineral in surgically menopausal women. *J Bone Miner Res* 6, 583-590
- Nunamaker DM, Butterweck DM, Provost MT (1990): Fatigue fractures in thoroughbred racehorses: relationships with age, peak bone strain, and training. *J Orthop Res* 8, 604-611

- Nuttall ME, Gimble JM (2000): Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? *Bone* 27, 177-184
- Okamoto F, Okabe K, Kajiya H (2001): Genistein, a soybean isoflavone, inhibits inward rectifier K(+) channels in rat osteoclasts. *Jpn J Physiol* 51, 501-509
- Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, Nozawa S, Suda T (1997): Expression of estrogen receptor beta in rat bone. *Endocrinology* 138, 4509-4512
- Oseni T, Patel R, Pyle J, Jordan VC (2008): Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. *Planta Med* 74, 1656-1665
- Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC (1991): Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6613-6617
- Owens W, Koeter HB (2003): The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: an overview. *Environ Health Perspect* 111, 1527-1529
- Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L (2003): The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dietary phytoestrogen analyses. *Environ Health Perspect* 111, 1559-1567
- Oxlund BS, Ortoft G, Andreassen TT, Oxlund H (2003): Low-intensity, high-frequency vibration appears to prevent the decrease in strength of the femur and tibia associated with ovariectomy of adult rats. *Bone* 32, 69-77
- Pappert RA, Hamrick JL, Donovan LA (2000): Genetic variation in *Pueraria lobata* (Fabaceae), an introduced, clonal, invasive plant of the southeastern United States. *Am J Bot* 87, 1240-1245
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987): Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2, 595-610
- Petrakis NL, Barnes S, King EB, Lowenstein J, Wiencke J, Lee MM, Miike R, Kirk M, Coward L (1996): Stimulatory influence of soy protein isolate on breast secretion in pre- and postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5, 785-794
- Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA (1997): Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 11, 1486-1496
- Pfeilschifter J (2006): Osteoporose-Leitlinie - Prophylaxe, Diagnostik und Therapie - bei Frauen ab der Menopause, bei Männern ab dem 60. Lebensjahr. Schattauer, Stuttgart 2006
- Picherit C, Bennetau-Pelissero C, Chanteranne B, Lebecque P, Davicco MJ, Barlet JP, Coxam V (2001): Soybean isoflavones dose-dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. *J Nutr* 131, 723-728
- Piekarski K, Munro M (1977): Transport mechanism operating between blood supply and osteocytes in long bones. *Nature* 269, 80-82

- Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE, Bonn T, Thorsell AG, Engstrom O, Ljunggren J, Gustafsson JA, Carlquist M (1999): Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J* 18, 4608-4618
- Pines A, Sturdee DW, Birkhauser MH, Schneider HP, Gambacciani M, Panay N (2007): IMS updated recommendations on postmenopausal hormone therapy. *Climacteric* 10, 181-194
- Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JW, Jr. (1998): Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 68, 1375S-1379S
- Prasain JK, Jones K, Brissie N, Moore R, Wyss JM, Barnes S (2004): Identification of puerarin and its metabolites in rats by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 52, 3708-3712
- Prasain JK, Reppert A, Jones K, Moore DR, 2nd, Barnes S, Lila MA (2007): Identification of isoflavone glycosides in Pueraria lobata cultures by tandem mass spectrometry. *Phytochem Anal* 18, 50-59
- Preisinger E, Kerschman-Schindl K, Wober C, Kollmitzer J, Ebenbichler G, Hamwi A, Bieglmayer C, Kaider A (2001): The effect of calisthenic home exercises on postmenopausal fractures--a long-term observational study. *Maturitas* 40, 61-67
- Prisby RD, Lafage-Proust MH, Malaval L, Belli A, Vico L (2008): Effects of whole body vibration on the skeleton and other organ systems in man and animal models: what we know and what we need to know. *Ageing Res Rev* 7, 319-329
- PubChem (2010a): Equol (CID 91469). URL: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/structurefly.cgi?cid=91469&width=400&height=400> [Online im Internet, Stand: 01.10.2010 um 10:00 Uhr]
- PubChem (2010b): Estradiol (CID 5757). URL: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/structurefly.cgi?cid=5757&width=400&height=400> [Online im Internet, Stand: 01.10.2010 um 10:00 Uhr]
- PubChem (2010c): Genistein (CID 5280961). URL: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/structurefly.cgi?cid=5280961&width=400&height=400> [Online im Internet, Stand: 01.10.2010 um 10:00 Uhr]
- PubChem (2010d): Puerarin (CID 5281807). URL: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/structurefly.cgi?cid=5281807&width=400&height=400> [Online im Internet, Stand: 01.10.2010 um 10:00 Uhr]
- Rachon D, Vortherms T, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W (2007a): Dietary daidzein and puerarin do not affect pituitary LH expression but exert uterotrophic effects in ovariectomized rats. *Maturitas* 57, 161-170
- Rachon D, Seidlova-Wuttke D, Vortherms T, Wuttke W (2007b): Effects of dietary equol administration on ovariectomy induced bone loss in Sprague-Dawley rats. *Maturitas* 58, 308-315
- Rachon D, Vortherms T, Seidlova-Wuttke D, Menche A, Wuttke W (2007c): Uterotropic effects of dietary equol administration in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Climacteric* 10, 416-426

- Reinhard-Hennch B, Strowitzki T, von Hagens C (2006): [Complementary and alternative therapies for climacteric symptoms]. *Gynakol Geburtshilffliche Rundsch* 46, 197-213
- Reinwald S, Weaver CM (2006): Soy isoflavones and bone health: a double-edged sword? *J Nat Prod* 69, 450-459
- Reppert A, Yousef GG, Rogers RB, Lila MA (2008): Isolation of radiolabeled isoflavones from kudzu (*Pueraria lobata*) root cultures. *J Agric Food Chem* 56, 7860-7865
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd (1998): A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 13, 763-773
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd (2002): Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 23, 279-302
- Riggs BL, Melton Iii LJ, 3rd, Robb RA, Camp JJ, Atkinson EJ, Peterson JM, Rouleau PA, McCollough CH, Bouxsein ML, Khosla S (2004): Population-based study of age and sex differences in bone volumetric density, size, geometry, and structure at different skeletal sites. *J Bone Miner Res* 19, 1945-1954
- Rittweger J (2006): Can exercise prevent osteoporosis? *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6, 162-166
- Rittweger J, Beller G, Armbrecht G, Mulder E, Buehring B, Gast U, Dimeo F, Schubert H, de Haan A, Stegeman DF, et al. (2010): Prevention of bone loss during 56 days of strict bed rest by side-alternating resistive vibration exercise. *Bone* 46, 137-147
- Rosen CJ, Bouxsein ML (2006): Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2, 35-43
- Rosen CJ, Ackert-Bicknell C, Rodriguez JP, Pino AM (2009): Marrow fat and the bone microenvironment: developmental, functional, and pathological implications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 19, 109-124
- Rosen HN, Tollin S, Balena R, Middlebrooks VL, Beamer WG, Donohue LR, Rosen C, Turner A, Holick M, Greenspan SL (1995): Differentiating between orchietomized rats and controls using measurements of trabecular bone density: a comparison among DXA, histomorphometry, and peripheral quantitative computerized tomography. *Calcif Tissue Int* 57, 35-39
- 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, 321-333
- Rubin C, Lanyon LE (1985): Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. *Calcif Tissue Int* 37, 411-417
- Rubin C, Xu G, Judex S (2001a): The anabolic activity of bone tissue, suppressed by disuse, is normalized by brief exposure to extremely low-magnitude mechanical stimuli. *FASEB J* 15, 2225-2229
- Rubin C, Turner AS, Bain S, Mallinckrodt C, McLeod K (2001b): Anabolism. Low mechanical signals strengthen long bones. *Nature* 412, 603-604

- Rubin C, Turner AS, Mallinckrodt C, Jerome C, McLeod K, Bain S (2002a): Mechanical strain, induced noninvasively in the high-frequency domain, is anabolic to cancellous bone, but not cortical bone. *Bone* 30, 445-452
- Rubin C, Turner AS, Muller R, Mittra E, McLeod K, Lin W, Qin YX (2002b): Quantity and quality of trabecular bone in the femur are enhanced by a strongly anabolic, noninvasive mechanical intervention. *J Bone Miner Res* 17, 349-357
- Rubin C, Pope M, Fritton JC, Magnusson M, Hansson T, McLeod K (2003): Transmissibility of 15-hertz to 35-hertz vibrations to the human hip and lumbar spine: determining the physiologic feasibility of delivering low-level anabolic mechanical stimuli to skeletal regions at greatest risk of fracture because of osteoporosis. *Spine* 28, 2621-2627
- Rubin C, Recker R, Cullen D, Ryaby J, McCabe J, McLeod K (2004): Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli: a clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety. *J Bone Miner Res* 19, 343-351
- Rubin C, Judex S, Qin YX (2006): Low-level mechanical signals and their potential as a non-pharmacological intervention for osteoporosis. *Age Ageing* 35 Suppl 2, ii32-ii36
- Rubin C, Capilla E, Luu YK, Busa B, Crawford H, Nolan DJ, Mittal V, Rosen CJ, Pessin JE, Judex S (2007): Adipogenesis is inhibited by brief, daily exposure to high-frequency, extremely low-magnitude mechanical signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17879-17884
- Rubinacci A, Marenzana M, Cavani F, Colasante F, Villa I, Willnecker J, Moro GL, Spreafico LP, Ferretti M, Guidobono F, et al. (2008): Ovariectomy sensitizes rat cortical bone to whole-body vibration. *Calcif Tissue Int* 82, 316-326
- Saxon LK, Turner CH (2005): Estrogen receptor beta: the antimechanostat? *Bone* 36, 185-192
- Schiessl H, Frost HM, Jee WS (1998): Estrogen and bone-muscle strength and mass relationships. *Bone* 22, 1-6
- Schoenau E, Neu CM, Rauch F, Manz F (2001): The development of bone strength at the proximal radius during childhood and adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 613-618
- Schoenau E, Saggese G, Peter F, Baroncelli GI, Shaw NJ, Crabtree NJ, Zadik Z, Neu CM, Noordam C, Radetti G, et al. (2004): From bone biology to bone analysis. *Horm Res* 61, 257-269
- Seeman E (2003): Reduced bone formation and increased bone resorption: rational targets for the treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int* 14 Suppl 3, S2-8
- Seeman E (2008): Bone quality: the material and structural basis of bone strength. *J Bone Miner Metab* 26, 1-8
- Seeman E, Delmas PD (2006): Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 354, 2250-2261
- Sehmisch S, Galal R, Kolios L, Tezval M, Dullin C, Zimmer S, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Effects of low-magnitude, high-frequency mechanical stimulation in the rat osteopenia model. *Osteoporos Int* 20, 1999-2008

- 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, 351-362
- Seidlova-Wuttke D, Prella K, Fritzscheier KH, Wuttke W (2008): Effects of estrogen receptor alpha- and beta-selective substances in the metaphysis of the tibia and on serum parameters of bone and fat tissue metabolism of ovariectomized rats. *Bone* 43, 849-855
- Setchell KD (2001): Soy isoflavones--benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). *J Am Coll Nutr* 20, 354S-362S; discussion 381S-383S
- Setchell KD, Cassidy A (1999): Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 129, 758S-767S
- Setchell KD, Lydeking-Olsen E (2003): Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr* 78, 593S-609S
- Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, Kirschner AS, Cassidy A, Heubi JE (2001): Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* 131, 1362S-1375S
- Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E (2002a): The clinical importance of the metabolite equol--a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr* 132, 3577-3584
- Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, Heubi JE (2002b): Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr* 76, 447-453
- Sievanen H, Koskue V, Rauhio A, Kannus P, Heinonen A, Vuori I (1998): Peripheral quantitative computed tomography in human long bones: evaluation of in vitro and in vivo precision. *J Bone Miner Res* 13, 871-882
- Simpson ER, Zhao Y, Agarwal VR, Michael MD, Bulun SE, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Sun T, Fisher CR, Qin K, et al. (1997): Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog Horm Res* 52, 185-213; discussion 213-184
- Smith CL, O'Malley BW (2004): Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 25, 45-71
- Song KB, Atkinson C, Frankenfeld CL, Jokela T, Wahala K, Thomas WK, Lampe JW (2006): Prevalence of daidzein-metabolizing phenotypes differs between Caucasian and Korean American women and girls. *J Nutr* 136, 1347-1351
- Sugimoto E, Yamaguchi M (2000): Anabolic effect of genistein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Int J Mol Med* 5, 515-520
- Syed FA, Oursler MJ, Hefferanm TE, Peterson JM, Riggs BL, Khosla S (2008): Effects of estrogen therapy on bone marrow adipocytes in postmenopausal osteoporotic women. *Osteoporos Int* 19, 1323-1330
- Taaffe DR, Robinson TL, Snow CM, Marcus R (1997): High-impact exercise promotes bone gain in well-trained female athletes. *J Bone Miner Res* 12, 255-260

- Tchernof A, Poehlman ET, Despres JP (2000): Body fat distribution, the menopause transition, and hormone replacement therapy. *Diabetes Metab* 26, 12-20
- Tham DM, Gardner CD, Haskell WL (1998): Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 2223-2235
- Thigpen JE, Setchell KD, Ahlmark KB, Locklear J, Spahr T, Caviness GF, Goelz MF, Haseman JK, Newbold RR, Forsythe DB (1999): Phytoestrogen content of purified, open- and closed-formula laboratory animal diets. *Lab Anim Sci* 49, 530-536
- Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS (1998): The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res* 13, 1243-1250
- Turner CH (1998): Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. *Bone* 23, 399-407
- Turner RT, Vandersteenhoven JJ, Bell NH (1987): The effects of ovariectomy and 17 beta-estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. *J Bone Miner Res* 2, 115-122
- Uehar M, Arai Y, Watanabe S, Adlercreutz H (2000): Comparison of plasma and urinary phytoestrogens in Japanese and Finnish women by time-resolved fluoroimmunoassay. *Biofactors* 12, 217-225
- Unfer V, Casini ML, Costabile L, Mignosa M, Gerli S, Di Renzo GC (2004): Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Fertil Steril* 82, 145-148, quiz 265
- Uusi-Rasi K, Kannus P, Cheng S, Sievanen H, Pasanen M, Heinonen A, Nenonen A, Halleen J, Fuerst T, Genant H, et al. (2003): Effect of alendronate and exercise on bone and physical performance of postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Bone* 33, 132-143
- van der Linden JC, Homminga J, Verhaar JA, Weinans H (2001): Mechanical consequences of bone loss in cancellous bone. *J Bone Miner Res* 16, 457-465
- Vedi S, Croucher PI, Garrahan NJ, Compston JE (1996): Effects of hormone replacement therapy on cancellous bone microstructure in postmenopausal women. *Bone* 19, 69-72
- Verschueren SM, Roelants M, Delecluse C, Swinnen S, Vanderschueren D, Boonen S (2004): Effect of 6-month whole body vibration training on hip density, muscle strength, and postural control in postmenopausal women: a randomized controlled pilot study. *J Bone Miner Res* 19, 352-359
- Viereck V, Grundker C, Blaschke S, Siggelkow H, Emons G, Hofbauer LC (2002): Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts. *J Cell Biochem* 84, 725-735
- Villareal DT, Binder EF, Yarasheski KE, Williams DB, Brown M, Sinacore DR, Kohrt WM (2003): Effects of exercise training added to ongoing hormone replacement therapy on bone mineral density in frail elderly women. *J Am Geriatr Soc* 51, 985-990
- Vortherms T (2006): Effekte von Östradiol und Equol sowie der pflanzlichen Substanzen Daidzein, Puerarin und Quercetin in der Hypophyse und im Urogenitaltrakt der ovariectomierten Ratte. *Veterinärmed. Diss. Hannover 2006*

- Wade GN, Gray JM, Bartness TJ (1985): Gonadal influences on adiposity. *Int J Obes* 9 Suppl 1, 83-92
- Wang X, Wu J, Chiba H, Umegaki K, Yamada K, Ishimi Y (2003): Puerariae radix prevents bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab* 21, 268-275
- Ward K, Alsop C, Caulton J, Rubin C, Adams J, Mughal Z (2004): Low magnitude mechanical loading is osteogenic in children with disabling conditions. *J Bone Miner Res* 19, 360-369
- Weaver CM, Cheong JM (2005): Soy isoflavones and bone health: the relationship is still unclear. *J Nutr* 135, 1243-1247
- Wehrli FW, Hopkins JA, Hwang SN, Song HK, Snyder PJ, Haddad JG (2000): Cross-sectional study of osteopenia with quantitative MR imaging and bone densitometry. *Radiology* 217, 527-538
- Westerlind KC, Wronski TJ, Ritman EL, Luo ZP, An KN, Bell NH, Turner RT (1997): Estrogen regulates the rate of bone turnover but bone balance in ovariectomized rats is modulated by prevailing mechanical strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4199-4204
- WHO-Scientific-Group (2003): Prevention and management of osteoporosis. *World Health Organ Tech Rep Ser* 921, 1-164, back cover
- Wilder DG, Pope MH (1996): Epidemiological and aetiological aspects of low back pain in vibration environments - an update. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 11, 61-73
- Windahl SH, Vidal O, Andersson G, Gustafsson JA, Ohlsson C (1999): Increased cortical bone mineral content but unchanged trabecular bone mineral density in female ERbeta(-/-) mice. *J Clin Invest* 104, 895-901
- Windahl SH, Hollberg K, Vidal O, Gustafsson JA, Ohlsson C, Andersson G (2001): Female estrogen receptor beta-/- mice are partially protected against age-related trabecular bone loss. *J Bone Miner Res* 16, 1388-1398
- Wolff J (1892): *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Hirschwald, Berlin 1892
- Wolters M, Hahn A (2004): [Soy isoflavones--a therapy for menopausal symptoms?]. *Wien Med Wochenschr* 154, 334-341
- Wong R, Rabie B (2007): Effect of puerarin on bone formation. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 894-899
- Wong WW, Lewis RD, Steinberg FM, Murray MJ, Cramer MA, Amato P, Young RL, Barnes S, Ellis KJ, Shypailo RJ, et al. (2009): Soy isoflavone supplementation and bone mineral density in menopausal women: a 2-y multicenter clinical trial. *Am J Clin Nutr* 90, 1433-1439
- Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA (1986): Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 7, 119-123
- Wronski TJ, Cintron M, Doherty AL, Dann LM (1988a): Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinology* 123, 681-686

- Wronski TJ, Cintron M, Dann LM (1988b): Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 43, 179-183
- Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintron M (1989a): Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 45, 360-366
- Wronski TJ, Dann LM, Horner SL (1989b): Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 10, 295-301
- Wu AH, Ziegler RG, Nomura AM, West DW, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Hoover RN, Pike MC (1998): Soy intake and risk of breast cancer in Asians and Asian Americans. *Am J Clin Nutr* 68, 1437S-1443S
- Wu J, Wang XX, Takasaki M, Ohta A, Higuchi M, Ishimi Y (2001): Cooperative effects of exercise training and genistein administration on bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* 16, 1829-1836
- Wu J, Oka J, Tabata I, Higuchi M, Toda T, Fuku N, Ezaki J, Sugiyama F, Uchiyama S, Yamada K, et al. (2006): Effects of isoflavone and exercise on BMD and fat mass in postmenopausal Japanese women: a 1-year randomized placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res* 21, 780-789
- Wu J, Oka J, Ezaki J, Ohtomo T, Ueno T, Uchiyama S, Toda T, Uehara M, Ishimi Y (2007): Possible role of equol status in the effects of isoflavone on bone and fat mass in postmenopausal Japanese women: a double-blind, randomized, controlled trial. *Menopause* 14, 866-874
- Wuttke W, Jarry H, Westphalen S, Christoffel V, Seidlova-Wuttke D (2002): Phytoestrogens for hormone replacement therapy? *J Steroid Biochem Mol Biol* 83, 133-147
- Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D (2007): Isoflavones--safe food additives or dangerous drugs? *Ageing Res Rev* 6, 150-188
- Xie L, Jacobson JM, Choi ES, Busa B, Donahue LR, Miller LM, Rubin CT, Judex S (2006): Low-level mechanical vibrations can influence bone resorption and bone formation in the growing skeleton. *Bone* 39, 1059-1066
- Zand RS, Jenkins DJ, Diamandis EP (2000): Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. *Breast Cancer Res Treat* 62, 35-49
- Zhang Y, Zeng X, Zhang L, Zheng X (2007): Stimulatory effect of puerarin on bone formation through activation of PI3K/Akt pathway in rat calvaria osteoblasts. *Planta Med* 73, 341-347
- Zhao LJ, Jiang H, Papasian CJ, Maulik D, Drees B, Hamilton J, Deng HW (2008): Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 23, 17-29

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke für das interessante Arbeitsthema sowie die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung.

Weiterhin gilt mein Dank meiner Betreuerin Frau Priv.-Doz. Dr. med. Dana Seidlova-Wuttke, die mir jederzeit ideen- und hilfreich zur Seite stand.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Markus Wuttke für die Einarbeitung in das Thema und den Tierversuch sowie bei Frau Ursula Hofacker für ihre Hilfe, Geduld und Erfahrung bei der Herstellung der Knochenpräparate.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Endokrinologie sei für alle kleinen und großen Hilfen und das angenehme Arbeitsklima gedankt.

Lebenslauf

Am 1. Mai 1981 wurde ich, Fabian Sandmann, als erstes Kind von Frau Sabine Sandmann und Herrn Dr. med. Klaus Sandmann in Minden in Westfalen geboren. Meine Geschwister heißen Julia und Tobias Sandmann. Ich besuchte die Grundschule und das Besselgymnasium in Minden, wo ich im Jahr 2000 das Abitur absolvierte. Daran anschließend leistete ich Zivildienst im Klinikum Minden als Pflegehelfer in der Abteilung für Onkologie und Hämatologie.

Das Medizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen nahm ich im Oktober 2001 auf und absolvierte dort im September 2003 den 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Im Sommer 2005 wechselte ich für ein Auslandsjahr an die Université Victor Segalen in Bordeaux, Frankreich. Nach meiner Rückkehr nach Göttingen im Sommer 2006 begann ich studienbegleitend mit der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Endokrinologie.

Nach Abschluss der Datenerhebung unterbrach ich die Arbeit an der Dissertation während des anstehenden praktischen Jahres. Von August 2007 bis Juli 2008 folgten wechselnde PJ-Stationen in Wilhelmshaven, Letterkenny (Irland), Wolfsburg, Fort-de-France (Martinique, Frankreich) und Valencia (Spanien). Das Medizinstudium beendete ich erfolgreich mit dem 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung im Dezember 2008.

Danach widmete ich mich noch intensiv der Fertigstellung der Dissertation. Seit Oktober 2009 arbeite ich im Jüdischen Krankenhaus Berlin in der Klinik für Innere Medizin I.