

Aus der Abteilung Unfallchirurgie, Plastische und
Wiederherstellungschirurgie

(Prof. Dr. med. K.M. Stürmer)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Hormone in der Osteoporoseprophylaxe am Modell der ovarektomierten Maus.

Strukturelle und biomechanische Effekte von Östradiol, Genistein,
Octylmethoxycinnamat, Equol, Bisphenol A und Resveratrol

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

vorgelegt von

Julia Uffendorde

aus Würzburg

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatterin: PD Dr. Ewa K. Stürmer

II. Berichterstatter/in: Prof.Dr.med.Dr.med.dent. Kramer

Tag der mündlichen Prüfung: 04. März 2013

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 OSTEOPOROSE.....	2
1.1.1 DEFINITION	2
1.1.2 PATHOPHYSIOLOGIE.....	3
1.1.2.1 Einteilung.....	3
1.1.2.2 Die maximale Knochenmasse.....	3
1.1.2.3 Knochenzellen	4
1.1.2.4 Regulation des Knochenumbaus.....	4
1.1.3 MIKROARCHITEKTUR IM OSTEOPOROTISCHEN KNOCHEN.....	5
1.2 KLINISCHE MANIFESTATION	6
1.3 DIAGNOSTIK.....	6
1.3.1 KONVENTIONELLE RÖNTGEN-DIAGNOSTIK	7
1.3.2 OSTEODENSITOMETRIE.....	7
1.3.2.1 Dual-X-Ray-Absorptionsmetrie.....	7
1.3.2.2 Quantitative Computertomographie	8
1.3.2.3 Quantitative Ultraschallmessung	8
1.4 THERAPIE DER OSTEOPOROSE.....	9
1.4.1 SPEZIFISCHE MEDIKAMENTÖSE THERAPIE	9
1.4.1.1 Bisphosphonate.....	9
1.4.1.2 Selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren	10
1.4.1.3 Strontiumranelat.....	10
1.4.1.4 Parathormon	11
1.4.1.5 Denosumab	11
1.4.2 HORMONERSATZ IN DER POSTMENOPAUSE.....	11
1.4.3 PHYTOÖSTROGENE.....	12
1.4.3.1 Genistein.....	12
1.4.3.2 Resveratrol.....	13
1.4.3.3 Octylmethoxycinnamat.....	14
1.4.3.4 Equol.....	15
1.4.3.5 Bisphenol A	16
1.5 DIE MAUS ALS MODELLTIER DER POSTMENOPAUSALEN OSTEOPOROSE	16

2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 VERSUCHSTIERE UND HALTUNGSBEDINGUNGEN	18
2.2 FUTTER UND TESTSUBSTANZEN	18
2.3 VERSUCHSVORBEREITUNGEN	19
2.4 BIOMECHANISCHE TESTUNG	20
2.4.1 BENUTZERSPEZIFISCHE EICHUNG UND UMBAU DER BRUCHMASCHINE	20
2.4.2 ABLAUF DER STANDARDISIERTEN METAPHYSÄREN TIBIAFRAKTUR	21
2.4.3 GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER BRUCHKURVE.....	21
2.5 MIKRORADIOGRAPHIE	23
2.5.1 HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG UND ANFERTIGUNG DER MIKRORADIOGRAPHIEN	23
2.5.2 AUSWERTUNG DER MIKRORADIOGRAPHIEN	24
2.5.3 MESSPARAMETER.....	25
2.5.4 COMPUTERGESTÜTZTE HISTOMORPHOMETRISCHE BILDANALYSE	25
2.5.5 ALGORITHMUS DER MANUELLEN DIGITALEN MORPHOMETRISCHEN AUSWERTUNG.....	26
2.5.6 BENUTZERSPEZIFITÄT UND REPRODUZIERBARKEIT DER MESSERGEBNISSE	29
2.6 STATISTIK	30
3 ERGEBNISSE	31
3.1 FUTTERAUFNAHME	31
3.2 BIOMECHANISCHER TEST	31
3.2.1 VALIDIERUNG DER BRUCHVORRICHTUNG IM RECHTS-LINKS-VERGLEICH	31
3.2.2 AUSWERTUNG DER BIOMECHANISCHEN TESTS	32
3.2.3 MAXIMALE BRUCHKRAFT	33
3.2.4 KORTIKALISBRUCH.....	33
3.2.5 ELASTIZITÄT	34
3.2.6 STRECKLAST	34
3.3 MIKRORADIOGRAPHIE	35
3.3.1 AUSWERTUNG DER MIKRORADIOGRAPHIEN	35
3.3.2 KNOCHENQUERSCHNITTSFLÄCHE	35
3.3.3 TRABEKELFLÄCHE ABSOLUT	35
3.3.4 KORTIKALISFLÄCHE ABSOLUT	36
3.3.5 TRABEKELKREUZUNGSPUNKTE.....	36
3.3.6 TRABEKELKREUZUNGSPUNKTE GESAMT	37
3.3.7 ANZAHL TRABEKELARME GESAMT	37
3.3.8 TRABEKELARME ANZAHL.....	38
3.4 ZUSAMMENFASSUNG DER STUDIEN-ERGEBNISSE	39

4	DISKUSSION	40
4.1	METAPHYSÄRER BRUCH- UND BIEGEVERSUCH	40
4.2	RECHTS-LINKS-VERGLEICH ZUR BIOMECHANISCHEN KALIBRIERUNG	41
4.3	ANALYSE DER SUBSTANZEN	41
4.3.1	ÖSTROGEN	41
4.3.2	GENISTEIN	44
4.3.3	EQUOL.....	45
4.3.4	RESVERATROL	46
4.3.5	OCTYLMETHOXYCINNAMAT	48
4.3.6	BISPHENOL A.....	49
4.4	KRITISCHE BEURTEILUNG DES STUDIENAUFBAUS	50
4.4.1	MIKORADIOGRAPHIE.....	50
4.4.2	BIOMECHANIK.....	51
4.5	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	51
5	ZUSAMMENFASSUNG	53
6	LITERATURVERZEICHNIS	54
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	70
8	TABELLENVERZEICHNIS	84
	DANKSAGUNG	85

Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
%	Prozent
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgemeinschaft
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
BMC	<i>bone mineral content</i>
BMD	<i>bone mineral density</i>
BPA	Bisphenol A
BUA	<i>broadband ultrasound and attenuation</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Kontrollgruppe
°C	Grad Celsius
CA	Karzinom
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
cm ³	Kubikcentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
d	Tag
DVO	Dachverband Osteologie
DXA	Dual-X-Ray-Absorptiometrie
E	Östradiol
EQO	Equol
ER	Östrogenrezeptor
ER α	Östrogenrezeptor alpha
ER β	Östrogenrezeptor beta
et al.	et alii
Fa.	Firma
g	Gramm
GEN	Genistein
HRT	<i>hormone replacement therapy</i>
ISCD	<i>International Society of Clinical Densitometry</i>
K	Kelvin
kg	Kilogramm

m	Meter
mA	Milliampere
MEDOS	<i>Mediterranean Osteoporosis Study</i>
mg	Milligramm
min	Minute
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
mm	Milimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MMA	Methylmethacrylsäure
MORE	<i>Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation</i>
mSv	Millisievert
N	Newton
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
Nr.	Nummer
OMC	Octylmethoxycinnamate
pQCT	periphere Quantitative Computertomographie
QCT	Quantitative Computertomographie
QUS	Quantitative Ultrasonographie
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
RES	Resveratrol
s	Sekunde
S.	Seite
SERM	selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator
SOS	<i>Speed of sound</i>
Tab.	Tabelle
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
USA	<i>United States of America</i>
vs.	Versus
WHI	<i>Women's Health Initiative</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
z.B.	zum Beispiel
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung

1 Einleitung

In den letzten Jahren ist die Osteoporose im klinischen Alltag zunehmend relevanter geworden. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) wurden in den neunziger Jahren 1,3-1,7 Millionen Osteoporose-assoziierte Hüftfrakturen verzeichnet [Gullberg et al. 1997; Cooper et al. 1992 a]. Nach Experteneinschätzungen werden sich diese Zahlen bis 2025 verdoppeln. Dabei spielt der demographische Wandel mit der damit einhergehenden höheren mittleren Lebenserwartung eine bedeutende Rolle für den starken Zuwachs an Patientenzahlen. In Deutschland sind derzeit etwa sechs Millionen Menschen an einer Osteoporose erkrankt [Bartl R und Bartl C 2008]. Die Kosten, die aufgrund dieser Erkrankung entstehen, führen zu immensen finanziellen Belastungen für das Gesundheitssystem. Allein in Deutschland können jährlich über drei Milliarden Euro den Ausgaben für Osteoporose zugerechnet werden [Bartl R und Bartl C 2008]. Hierbei stellen die durch den Knochenschwund verursachten Frakturen den größten Anteil dieser Summe dar.

Bei Frauen geht der menopausal bedingte Östrogenmangel mit einem Knochenmasseverlust von etwa 1% bis 4% jährlich einher. Statistischen Berechnungen zufolge ist jede dritte Frau einmal im Leben von einem Osteoporose-bedingten Knochenbruch betroffen [Bartl R und Bartl C 2008].

In den achtziger und neunziger Jahren galt die Hormonersatztherapie zur Behandlung postmenopausaler Beschwerden als Therapie der ersten Wahl. Die Ergebnisse von drei großen Studien „*Heart and Estrogen/ Progestin Replacement Study*“, „*Women's Health Initiative Study*“ und „*One Million Women Study*“ führten jedoch zu kontroversen Diskussionen bezüglich therapiebedingter Begleiterscheinungen. Zwar konnte ein signifikanter Rückgang der hüftgebundenen Frakturen verzeichnet werden, jedoch führten die zahlreichen Nebenwirkungen wie zum Beispiel ein gesteigertes Risiko für die Entwicklung von Brust- und Ovarialkarzinomen zum Abbruch der Langzeitstudie [Rossouw et al. 2002; Beral 2003]. Aus therapeutischer Sicht stellte sich daher die Frage, welche Behandlungsalternative zur Hormonersatztherapie das Nutzen-Risikoverhältnis verbessern könnte.

Phytoöstrogene stehen als eine Alternative seit einigen Jahren im Fokus der Osteoporoseforschung. Es handelt sich hierbei um pflanzliche Substanzen mit östrogenartiger Wirkung. Zahlreiche epidemiologische Studien zeigen, dass bei asiatischen Frauen mit einer Phytoöstrogen-reichen Sojadiät deutlich weniger Östrogenmangelsymptome auftreten. Ebenso ist eine verringerte Hüftfrakturinzidenz sowie eine Risikoreduktion von Brust- und Endometriumkarzinomen in asiatischen Ländern beobachtet worden [Cooper et al. 1992 b; Lauderdale et al. 1997]. Der Wirkmechanismus der Phytoöstrogene beruht auf organselektiven

Eigenschaften an den Östrogenrezeptoren der jeweiligen Zielorgane mit sowohl östrogenen als auch antiöstrogenen Effekten [Adlercreutz und Mazur 1997].

In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten tierexperimentellen Studie sollen die antiosteoporotischen Wirksamkeiten der Phytoöstrogene Genistein, Equol, Resveratrol, Octylmethoxycinnamat und Bisphenol A im Vergleich zu den Östrogenen am Mausmodell untersucht werden.

Die Bewertung und Diskussion der Wirksamkeiten der einzelnen Substanzen auf die Knochenqualität erfolgte anhand biomechanischer, histomorphometrischer und radiologischer (korrespondierende Promotion Maehlmeyer, AG Prof. Dr. H. Jarry) Bewertungskriterien.

Im Vorfeld dieser Arbeit ließen sich folgende Fragestellungen formulieren:

Ist es sinnvoll, die Maus als neues Osteoporosemodell zu etablieren? Welche Schwierigkeiten ergeben sich bei der Analyse der Mäuseknochen? Können die verwendeten Phytoextrakte Genistein, Equol, Resveratrol, Octylmethoxycinnamat und Bisphenol A die Knochenqualität verbessern?

1.1 Osteoporose

1.1.1 Definition

Die Definition der Osteoporose unter pathophysiologischen Gesichtspunkten lautet: „Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist, mit der Folge vermehrter Knochenbrüchigkeit“ [modifiziert nach NIH 2001].

Tabelle 1: WHO-Stadieneinteilung der Osteoporose (modifiziert nach WHO 1994)

Klinisches Stadium	Kriterien
0 Osteopenie	T-Score: -1 bis -2,5
1 Osteoporose	T-Score: < -2,5
2 Manifeste Osteoporose	T-Score: < -2,5 1- 3 Wirbelkörperfrakturen
3 Fortgeschrittene Osteoporose	T-Score: < -2,5 multiple Wirbelkörperfrakturen oft auch extraspinale Frakturen

Die WHO definiert dagegen den Begriff Osteoporose über festgelegte Richtwerte die bei der Knochendichtemessung erzielt werden. Laut dieser liegt eine Osteoporose vor, wenn die

Knochenmineraldichte um 2,5 Standardabweichungen unter dem statistischen Mittelwert gesunder prämenopausaler Frauen liegt, d.h. ein T-Wert von $< -2,5$ vorliegt.

1.1.2 Pathophysiologie

1.1.2.1 Einteilung

Nach dem Ausmaß des Knochenumbaus können zwei Osteoporoseformen unterschieden werden. Die *High-turnover*-Osteoporose mit einem raschen Knochenmasseverlust von einer *Low-turnover*-Osteoporose, die als Knochenerkrankung mit einer verminderten Knochenneubildung definiert ist.

Daneben kann die Osteoporose auch pathogenetisch unterschieden werden, in eine primäre, sogenannte idiopathische Osteoporose und in eine sekundäre Form. Die primäre Osteoporose ist eine Knochenerkrankung, die gehäuft bei postmenopausalen Frauen auftritt. Hierbei ist der Abfall der Östrogenproduktion hauptverantwortlich für die Krankheitsentstehung. Bei der senilen, altersbedingten Osteoporose ist die Osteoblasteninsuffizienz Ursache der Erkrankung.

Als sekundäre Osteoporose ist diejenige Form definiert, bei der ein ursächlicher Zusammenhang mit einer anderen Grunderkrankung außerhalb des Skelettsystems besteht. Verschiedene Krankheitsbilder müssen dabei als Ursache in Erwägung gezogen werden: Endokrinopathien, Nutritionsstörungen, entzündliche Krankheiten, Neoplasien, iatrogen-medikamentöse Ursachen oder Immobilisation. Nur 5% der Osteoporosen sind sekundär und damit das wesentlich seltenere Krankheitsbild.

1.1.2.2 Die maximale Knochenmasse

Die maximale Knochenmasse (*peak bone mass*) wird um das 30. Lebensjahr erreicht [Recker et al. 1992]. Darauf folgt eine durchschnittliche negative Knochenbilanz um etwa 1% jährlich [Bartl R und Bartl C 2008]. Die Forschungsergebnisse von Ettinger et al. (1997) konnten Knochendichteunterschiede innerhalb verschiedener Ethnien aufzeigen. Beispielsweise verfügen Menschen mit dunkler Hautfarbe über eine höhere Knochendichte als Menschen kaukasischer Abstammung. Bei der asiatischen Bevölkerung scheint dagegen insgesamt eine niedrigere Spitzengesamtknochenmasse erreicht zu werden [Bachrach et al. 1999]. Zusammengefasst ist die Menge der Knochensubstanzverluste bei allen Menschen unterschiedlich hoch und neben der ethnischen Zugehörigkeit abhängig von Alter, Geschlecht, Belastung, Knochenart und genetischer Prädisposition.

Unterschiede zwischen Männern und Frauen bezüglich der Knochensubstanzverluste treten ab der 50. Lebensdekade besonders deutlich in Erscheinung. Während bei Männern über die Jahre der Knochenschwund gleichmäßig und kontinuierlich abläuft, ist bei Frauen im Stadium der Menopause die Abnahme der Knochendichte beschleunigt [Ringe 1995].

1.1.2.3 Knochenzellen

Für die ständigen Reparatur- und Umbauvorgänge sind drei unterschiedliche Zelltypen im Knochengewebe verantwortlich: „knochenaufbauende“ Osteoblasten, „knochenüberwachende“ Osteozyten und „knochenabbauende“ Osteoklasten.

Die Osteoblasten synthetisieren eine komplexe organische Knochengrundsubstanz. Im Zuge der Mineralisierung kommt es zu einer Einmauerung der Osteoblasten, die in der Folge als Osteozyten in Knochenlakunen überleben. „Osteozyten sind der dominierende Zelltyp des Knochens“ [Benninghoff und Drenckhahn 2003]. Sie sind über kleine Kanäle (*Gap Junctions*) und Zellfortsätze miteinander verbunden. Hierüber werden bioelektrische Signale (Ionenströme), *Second Messenger* oder Metabolite in die Zellen transportiert und Knochenstoffwechselfvorgänge gesteuert [Bartl R und Bartl C 2008]. Zudem besitzen Osteozyten mechanosensorische Eigenschaften, wodurch mechanische Signale registriert und an die auf der Knochenoberfläche liegenden Baueinheiten weitergeleitet werden [Frost 1992, Ziegler 1995]. Die Dichte der Osteozyten bestimmt die Dichte der Knochen. Demzufolge ist im Alter eine Abnahme der Osteozytenzahl unweigerlich mit einer Abnahme der Knochenmasse verbunden.

Osteoklasten begrenzen und kontrollieren die Knochenmasse mittels spezifischer zellulärer Enzyme, die die Knochenmatrix auflösen, demineralisieren oder Kalzium freisetzen.

1.1.2.4 Regulation des Knochenbaus

Da sich der Knochen in einem ständigen Umbauprozess befindet, muss ein ausgewogenes Verhältnis zwischen den knochenaufbauenden Osteoblasten und den knochenabbauenden Osteoklasten bestehen. Diese Balance wird durch ein fein abgestimmtes Signalsystem gewährleistet. Die Rekrutierung, Differenzierung und Aktivierung der Knochenbildung wird über Hormone und Zytokine reguliert. Dabei spielen die Östrogene eine bedeutende Rolle bei der Knochengesundheit. Sie können die Osteoklasten über die Östrogenrezeptoren hemmen und deren Zelltod herbeiführen [Bartl R und Bartl C 2008]. Folglich können Östrogene die Knochenstabilität erhalten. Eine Schlüsselrolle bei der Steuerung der Knochenumbauvorgänge hat das *RANKL (Receptor Activator of nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- κ B)-Ligand)* -Osteoprotegerin-Zytokin-System. Dabei handelt es sich um ein Zytokinsystem aus der

Tumornekrosefaktor (TNF) -Rezeptorfamilie. Osteoprotegerin hemmt die Differenzierung der Osteoklasten. Dahingegen stimuliert *RANKL* die Reifung der Osteoklasten mit der Folge einer gesteigerten Knochenresorption. Diese Entdeckung ist für das Verständnis der Osteoklastengnese, bei der Steuerung der Knochenresorption und bei lokalen Umbauvorgängen von Bedeutung [Hofbauer et al. 2000]. Zukünftig könnten *RANKL*-Antikörper gute therapeutische Effekte bei Krankheiten mit einem erhöhten Knochenabbau erzielen [Hofbauer et al. 2004]. Daneben sind die Vitamine (D, K, C, B6 und A) im Kollagenstoffwechsel und bei der Mineralisation der Knochensubstanz beteiligt [Bartl R und Bartl C 2008].

1.1.3 Mikroarchitektur im osteoporotischen Knochen

Die Mikroarchitektur der Knochen setzt sich aus zwei unterschiedlichen Gewebestrukturen zusammen. Die komprimierte, kalzifizierte Kortikalis mit einem niedrigen Oberflächen- / Volumen-Verhältnis stellt die Rahmenstruktur der Knochen dar und bildet zu 80% den Hauptstrukturanteil am Knochen. Die feingliedrige, lockere Knochenbälkchenstruktur Spongiosa bildet den Knochenkern.

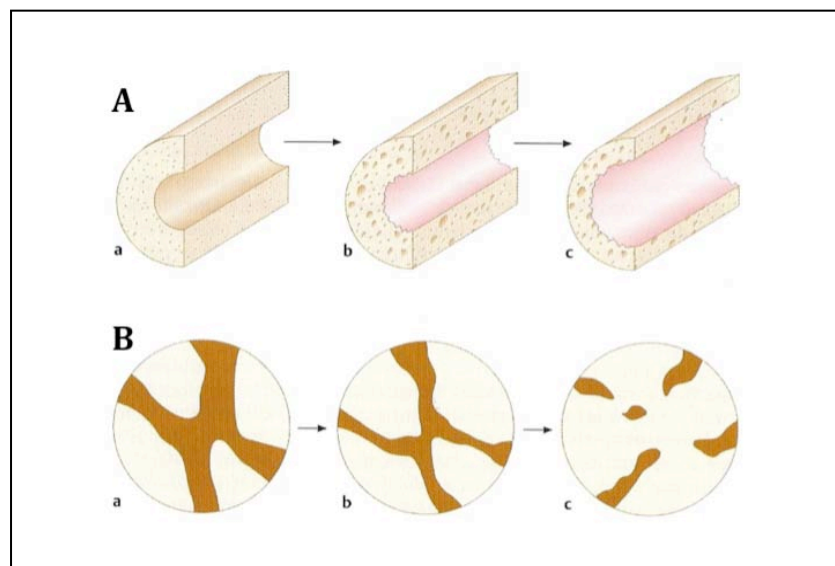


Abbildung 1: Unterschiedliche Schweregrade des Knochenschwunds im kortikalen Röhrenknochen
A: kompakte Knochen (makroskopisch); a = normale Kompakta; b = Osteopenie; c = Strukturauflockerung der endostalen Oberfläche **B: spongiöser Knochen (mikroskopisch); a =** normale Spongiosa; **b = Osteopenie ; c = Osteoporose** [modifiziert nach Bartl R und Bartl C, 2008; S.36]

Die beiden Knochenstrukturen unterscheiden sich besonders im Prozess der skelettalen Umbauphasen (*Remodelling*). Die Spongiosa bietet durch ihre größere Gesamtfläche dem Knochenumbau eine optimale Angriffsfläche. Insgesamt sind ungefähr 25% der spongiösen

Anteile, dagegen nur 2,5% der kortikalen Strukturen vom jährlichen Knochen-*Remodelling* betroffen. Hieraus resultiert ein erhöhter Knochensubstanzverlust am spongiösen Knochen [Bartl R et al. 2003]. Deswegen manifestiert sich bei der Osteoporose der Strukturverlust primär an der Spongiosa. Als mikroarchitektonisches Endresultat führt die schwindende Anzahl der Quervernetzungen im Knochenbälkchengewölbe zu einer sinkenden Widerstandsfähigkeit und einer erhöhten Fragilität des Knochens.

1.2 Klinische Manifestation

Die Erkrankung Osteoporose bleibt häufig über viele Jahre eine unbemerkte, asymptomatische Erkrankung. Grund dafür ist der jahrelange, schleichende Abbau der Knochengrundsubstanz. Viele Patienten klagen erst im fortgeschrittenen Stadium über frakturbedingte Beschwerden. Zu den Folgeerscheinungen der Osteoporose zählen akute und chronische Schmerzen, Immobilität, soziale Vereinsamung und Depression. Schlussendlich sind damit große Beschwerlichkeiten im alltäglichen Leben vorbestimmt.

Am stärksten bruchgefährdet sind Skelettareale mit einem hohen Knochengewebsanteil der Spongiosa. Dazu zählen die Lendenwirbelsäule (75%), der proximale Femur (50-75%), der distale Radius (25%) und der proximale Humerus (8%). Prinzipiell können jedoch neben den typischen Manifestationsorten überall Frakturen auftreten.

Durch eine zusätzliche Komorbidität bei älteren Patienten ist die Sturzneigung vermehrt und erklärt die gehäuft auftretenden Hüftfrakturen nach dem 75. Lebensjahr [Scheidt-Nave und Starker 2003]. Ungefähr ein Viertel der Patienten nach Oberschenkelhalsbrüchen versterben innerhalb des ersten Jahres, mit einer Übersterblichkeit in den ersten sechs Monaten.

1.3 Diagnostik

Eine frühe Diagnosestellung ist neben der Erkennung und Verhütung von Risikofaktoren für die erfolgreiche Behandlung der Osteoporose entscheidend.

Zu der empfohlenen Basisdiagnostik aus den Leitlinien des Dachverbands Osteologie [DVO 2009] gehören Anamnese, allgemein-internistische körperliche sowie laborchemische Untersuchung. Knochendichtemessungen und Nativ-Röntgenbilder der Brust- und Lendenwirbelsäule stellen dabei eine wichtige Säule zur Erkennung osteoporotischer Veränderungen dar. Bei problematischer Diagnosestellung ist eine Knochenbiopsie mit histologischer Aufarbeitung indiziert.

Ziel der diagnostischen Untersuchung ist die Erstellung eines individuellen Risikoprofils sowie die Einleitung einer adäquaten Therapie zur Prävention einer manifesten Osteoporose.

1.3.1 Konventionelle Röntgen-Diagnostik

Der klinische Verdacht auf Wirbelkörperfrakturen ist die Hauptdomäne der radiologischen Diagnostik. Vor allem bei der Abklärung von unklaren Rückenschmerzen oder bei dem Verdacht einer sekundären Osteoporose eignet sich dieses Verfahren zur Beurteilung und Abgrenzung möglicher Differenzialdiagnosen (z.B.: degenerativ-entzündliche Gelenkveränderungen, Osteomalazie oder maligne Knochenläsionen) [Jergas und Schmid 1999].

Im Röntgenbild können Osteoporose-typische, morphologische Kriterien beobachtet werden. Fehlende horizontale Trabekelbahnen oder hervortretende kortikale Wirbelrahmen (Rahmenstruktur) sind diagnostische Merkmale für eine Osteoporoseerkrankung. Mit dem Einbruch der Deck- und Grundplatten entstehen Wirbelkörperdeformierungen wie Keil-, Fisch- oder Plattwirbel.

Durch das konventionelle Röntgen kann der Knochenschwund erst ab einem 30-40%igen Knochenmasseverlust detektiert werden. Damit ist die Röntgendiagnostik nicht als Vorsorgeverfahren für die Osteoporose geeignet [Bartl R et al. 2003].

1.3.2 Osteodensitometrie

Die Osteodensitometrie ist ein medizinisch-technisches Verfahren, welches eine Quantifizierung der Knochenmineraldichte (*bone mineral density*; in g/cm^2 oder in g/cm^3) und eine Bestimmung des Knochenmineralgehalts (*bone mineral content*, BMC; in g) ermöglicht.

Die verschiedenen Verfahren der Osteodensitometrie unterscheiden sich in der Genauigkeit, im Aufwand und in der Strahlenbelastung. Derzeit ist die Duale-Röntgen-Absorptionsmetrie (DXA oder DEXA, *dual energy x-ray absorptiometry*) das Standardverfahren. Sie misst sehr genau und ist deshalb für die Ermittlung der Langzeiteffekte von Osteoporose-Therapien als anerkannte Methode zugelassen.

1.3.2.1 Dual-X-Ray-Absorptionsmetrie

Die DXA wird von der WHO und dem DVO als Standardmethode zur Definition der Osteoporose genutzt. Das Verfahren basiert auf der Verwendung einer Radionuklid-Quelle mit zwei unterschiedlichen Energiepeaks (38KeV und 70KeV). Mithilfe der unterschiedlichen

Energieniveaus können am Knochen Weichteilgewebe differenziert und aus der eigentlichen Knochendichtemessung methodisch eliminiert werden. Die Messdaten geben Auskunft über den Mineralgehalt des Knochens pro definierter Fläche (g/cm^3).

Nach den Empfehlungen der *International Society of Clinical Densitometry* (ISCD) sollte die Messung der Knochendichte an mindestens zwei unterschiedlichen Skelettarealen durchgeführt werden. Der niedrigere ermittelte T-Score-Wert bestimmt die Diagnose.

Ein limitierender Faktor der Methodik ist die integrale Messung des zu untersuchenden Skelettareals. Dabei summieren sich beispielsweise Kalkstrukturen wie Osteophyten, Arteriosklerose oder aber degenerative Kalzifikationen zum Knochengewebe hinzu und der Knochenmineraldichtewert wird falsch hoch ermittelt [Grampp et al. 1999].

1.3.2.2 Quantitative Computertomographie

Die quantitative Computertomographie (QCT) ist ein Volumenmessverfahren, das eine differenzierte Messung von trabekulären und kortikalen Knochenanteilen ermöglicht. Ein pathologischer Spongiosaverlust kann somit frühzeitig diagnostiziert werden. Der zentrale Messort liegt am ersten und dritten Lendenwirbelkörper, periphere Messungen werden am distalen Radius oder an der Tibia durchgeführt. Wegen der hohen Strahlenbelastung (0,1mSv) ist das Verfahren als Screening-Methode nicht geeignet.

1.3.2.3 Quantitative Ultraschallmessung

Die quantitative Ultrasonometrie (QUS) ist eine Röntgenstrahl-freie Messmethode zur Ermittlung der peripheren Knochendichte. Sie findet wegen der fehlenden Strahlenbelastung und der Einfachheit in der Anwendung bei der Osteoporose-Diagnostik immer mehr Anwendung.

Für die Beurteilung der Knochen bedient sich der Ultraschall zweier Parameter, die bei osteoporotisch verändertem Knochen beeinflusst werden. Hierbei handelt es sich um die Schallgeschwindigkeit ($\text{SOS} = \text{Speed of sound}$) und um die Schallschwächung (*Broadband ultrasound and attenuation* = BUA).

Die Ultraschalluntersuchung eignet sich für leicht zugängliche Knochen wie Fersenbein (Kalkaneus), Radius, Tibia und Phalangen. Der Kalkaneus ist als geeigneter Standardmessort für die QUS bestimmt worden, da dieser durch seinen hohen Anteil an trabekulären Knochenstrukturen dem strukturellen Knochenaufbau der Wirbelkörper ähnelt und somit Rückschlüsse auf die Knochendichteverhältnisse dieser Regionen getroffen werden können.

1.4 Therapie der Osteoporose

Bei der Therapie der Osteoporose werden grundsätzlich vier Standbeine unterschieden. Zum einen stellt die Basistherapie ein Verfahren der Prävention sowie der Behandlung der Osteoporose dar. Darunter fallen beispielsweise Kalzium- und Vitamin-D₃-Supplementation, die Vermeidung von Risikofaktoren sowie regelmäßige körperliche Aktivität.

Die zweite wichtige Säule der Osteoporosebehandlung beinhaltet die spezifische medikamentöse Therapie. Grundsätzlich lassen sich dabei zwei Wirkungsweisen unterscheiden. Entweder unterdrücken sie den osteoklastischen Knochenabbau und gehören damit zu den antiresorptiven Substanzen (Bisphosphonate, Raloxifen) oder aber sie stimulieren die osteoblastische Knochenneubildung als osteoanaboles Therapeutikum (Parathormon, Teriparatid). Daneben existiert eine kleine Stoffgruppe (Strontium-Ranelat), welche beide Wirkmechanismen in sich vereint.

Die dritte Gruppe beinhaltet die Hormonersatztherapie. Dabei werden insbesondere reine Östrogene bzw. Östrogen-Gestagen-Kombinationspräparate eingesetzt.

Zu der vierten Säule der Osteoporosebehandlung zählen die Phytoöstrogene, welche zunehmend als nebenwirkungsarme Therapieform an Bedeutung gewinnen.

1.4.1 Spezifische medikamentöse Therapie

Die Osteoporose-Leitlinien (DVO 2009) empfehlen eine medikamentöse Therapie, wenn das geschätzte 10-Jahres-Risiko für Wirbelkörper- und proximale Femurfrakturen mehr als 30% beträgt und die T-Werte bei der DXA-Knochendichtemessung an Lendenwirbelsäule, proximalem Gesamtfemur oder am Schenkelhals erniedrigt sind.

1.4.1.1 Bisphosphonate

Bisphosphonate zählen zu der Gruppe der antiresorptiven Substanzen. Generell entfalten sie ihre Wirksamkeit auf zwei unterschiedlichen Ebenen. Einerseits besitzt das Bisphosphonat-Molekül eine hohe Affinität zur Knochenoberfläche und geht somit bevorzugt in den Resorptionslakunen eine feste Bindung mit den Kalziumatomen ein. Dadurch wird die Mineralisation der Knochensubstanz verhindert. [Bartl R und Bartl C 2008]. Andererseits bewirken Bisphosphonate eine Hemmung und dadurch eine verkürzte Lebensdauer der Osteoklasten.

Über einen längeren Einnahmezeitraum können eine Abnahme der Knochenresorption mit der Folge einer positiven Knochenbilanz sowie einer verbesserten Knochenqualität erreicht werden [Bartl R und Bartl C 2008].

1.4.1.2 Selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren

Bei der Substanzklasse der selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (*SERM*) handelt es sich um Arzneistoffe, die unterschiedlich starke sowohl östrogene als auch antiöstrogene Wirkungen an den Östrogenrezeptoren der jeweiligen Zielorgane entfalten. Die typischen Nebenwirkungen wie bei der Hormonersatztherapie werden dabei nicht verursacht. Die *SERMs* sind zur Behandlung von Brustkrebs sowie zur Prävention atraumatischer Wirbelsäulebrüche bei erhöhtem Osteoporoserisiko zugelassen.

Die östrogenen Effekte werden über eine Interaktion an den zwei verschiedenen Rezeptortypen erreicht. Zum einen an dem erst 1996 entdeckten Östrogenrezeptor- β , zum anderen an dem Östrogenrezeptor- α . Die Verteilung der beiden Rezeptortypen ist in den verschiedenen Organsystemen unterschiedlich hoch und zeigt eine komplexe Verteilungsdifferenz gegenüber der Abhängigkeit vom Alter und dem Zyklusstand. Am unreifen Knochengewebe konnten sowohl Östrogenrezeptor- α als auch Östrogenrezeptor- β nachgewiesen werden. Mit der Altersentwicklung findet eine deutliche Umverteilung der Rezeptortypen statt. Östrogenrezeptor- α ist am Knochengewebe letztendlich überlegen und im Knochenstoffwechsel sowie bei der Regulation der Knochenreife hauptsächlich beteiligt [Onoe et al. 1997; Lim et al. 1999].

Für den therapeutischen Nutzen ist Raloxifen als wichtigster nichtsteroidaler, synthetisch hergestellter Vertreter der *SERMs* zugelassen. Bei einer weltweiten Studie (*MORE-Studie: Multiple Outcomes of Raloxifen Evaluation*) an 7705 postmenopausalen Frauen konnte durch den Therapieeinsatz von Raloxifen das Erstauftreten von Wirbelkörperfrakturen halbiert werden [Ishani et al. 2008].

1.4.1.3 Strontiumranelat

Strontiumranelat besitzt einen dualen Wirkcharakter mit gleichzeitig osteoanabolen und antiresorptiven Effekten am Knochengewebe [Dimai 2005].

In zwei großen klinischen Studien (*SOTI-Studie = Spinal Osteoporosis Therapeutic Intervention-Studie*; *TROPOS-Studie = Treatment of Peripheral Osteoporosis-Studie*) konnten an über 6700 Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose die Wirksamkeiten von Strontiumranelat in Bezug auf die Risikoreduktion von vertebrealen und nichtvertebralen Frakturen signifikant belegt werden [Meunier et al. 2004; Reginster et al. 2005].

Strontiumranelat ist gemäß den Kriterien der EMEA (*European Medicines Agency*) als *First-line*-Therapie in der Behandlung der postmenopausalen Osteoporose zugelassen.

1.4.1.4 Parathormon

Die osteoanabolen Effekte des Parathormons (PTH) beruhen hauptsächlich auf der frühen Stimulation der Osteoprogenitorzellen, den Vorläuferzellen der Osteoblasten sowie der im Spätstadium hinzukommenden Hemmung der Apoptose von Osteozyten [Nakajima et al. 2002; Bartl R und Bartl C 2008].

Die Wirksamkeit von PTH (1-84) bezüglich der Reduktion von vertebrealen Frakturen ist mittlerweile in klinischen Studien erforscht worden [Greenspan et al. 2007]. In einer Studie von Neer et al. (2001) konnte auch eine Risikoreduktion mit dem PTH-Fragment Teriparatid (1-34) hinsichtlich vertebraler und nichtvertebraler Frakturen belegt werden.

1.4.1.5 Denosumab

Eine Neuentwicklung in der Osteoporosebehandlung ist der monoklonale *RANKL*-Antikörper AMG-162, Denosumab. Es zeigten sich bislang gute Ergebnisse bezüglich der osteoprotektiven Wirksamkeiten. In einer Studie an 411 postmenopausalen Frauen konnte eine Zunahme der Knochendichte und eine Verbesserung der kortikalen Skelettbereiche innerhalb eines Monats erreicht werden [Takahashi und Ozawa 2005; Bartl R und Bartl C 2008].

1.4.2 Hormonersatz in der Postmenopause

Seit über 40 Jahren wird die Hormonersatztherapie (*Hormon-Replacement-Therapy*, HRT) zur Prävention der Osteoporose und zur Linderung von Wechseljahresbeschwerden eingesetzt. Dabei kommen reine Östrogene bzw. Östrogen-Gestagen-Kombinationspräparate zum Einsatz. Trotz der deutlichen Reduktion klimakterischer Beschwerden sowie nachgewiesener osteoprotektiver Effekte wird die Substitution von Östrogenen aus Angst vor den Begleiterscheinungen von vielen Frauen abgelehnt. Eine große klinische Studie aus den USA (*Women's Health Initiative*; WHI) hat das Nutzen- / Risiko-Verhältnis an 161.809 postmenopausalen Frauen untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Risiko für Hüft- und Wirbelkörperfrakturen zwar signifikant gesenkt, das Auftreten von lebensbedrohlichen Nebenwirkungen den therapeutischen Einsatz jedoch limitierte. Kardiovaskuläre Erkrankungen und eine erhöhte Inzidenzrate von Brustkrebs führten zum vorzeitigen Abbruch der WHI-Studie [Rossouw et al. 2002].

Derzeit besteht eine Indikation für eine Hormonersatztherapie nur dann, wenn alle anderen zugelassenen Therapiealternativen wegen Unverträglichkeit oder Kontraindikationen nicht eingesetzt werden können [DVO 2009]. Um die gewünschten Wirkungen zu erzielen, ist eine Therapiedauer von 5 bis 15 Jahren anzusetzen.

1.4.3 Phytoöstrogene

Phytoöstrogene sind chemische Verbindungen, die sekundär im Pflanzenstoffwechsel entstehen. Diese lassen sich in drei Strukturklassen einteilen: Isoflavone, Lignane und Coumestane. Insgesamt konnten in über 300 verschiedenen Pflanzenarten diese Substanzen nachgewiesen werden. Besonders hohe Konzentrationen der Isoflavone sind in der Sojabohne enthalten. Phytoöstrogene besitzen eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem endogenen 17- β -Östrogen [Ishimi 2009]. Durch die Übereinstimmung der Grundstruktur ist eine Interaktion an den menschlichen Östrogenrezeptoren- α und - β möglich. Dadurch können östrogene als auch antiöstrogene Wirkungen erzielt werden. Wegen dieser Wirkmechanismen werden sie auch als „Phyto-*SERM*“ bezeichnet [Oseni et al. 2008]. Die Aktivität ist im Vergleich zu den Östrogenen um den Faktor 1.000 schwächer. Jedoch sind durch eine 10.000-fache Konzentrationssteigerung deutliche östrogene Wirksamkeiten festgestellt worden. Epidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass in asiatischen Ländern, in denen der Konsum an Soja besonders hoch ist, niedrigere Raten von verschiedenen Krebserkrankungen sowie ein gemindertem Auftreten von Herz-Kreislauferkrankungen und postmenopausalen Symptomen im Vergleich zur westlichen Population eintreten. Auch das Risiko für osteoporotische Frakturen ist im Durchschnitt reduziert [Adlercreutz and Mazur 1997; Messina 2002; Kulling und Watzl 2003; Tempfer et al. 2009]. Trotz dieser östrogentypischen Wirkungen sind die Nebenwirkungen, wie sie bei einer Hormonersatztherapie mit Östrogenpräparaten auftreten, bis dato nicht beobachtet worden. Dazu zählen die Tumorerkrankungen wie z.B. Mamma- und Endometriumkarzinom, die auch bei einem hohen Konzentrationsspiegel von Phytoöstrogenen nicht eintreffen [Kulling und Watzl 2003; Tempfer et al. 2009]. Eine mögliche Erklärung für die niedrigeren Inzidenzraten von Karzinomen bei asiatischen Frauen, könnte die lebenslang niedriger zirkulierende Östrogenmenge im Blutplasma sein [Nagata et al. 1998; Pino et al. 2000]. Damit sind Bewohner ostasiatischer Länder den proliferationsfördernden Eigenschaften von Östrogenen an Brust und Uterus weniger intensiv ausgesetzt als Frauen aus westlichen Ländern. Diese Entdeckungen geben der Forschung Anlass zu der großen Hoffnung, in den Phytoöstrogenen eine nebenwirkungsarme Alternative zur Hormonersatztherapie gefunden zu haben.

1.4.3.1 Genistein

Genistein gehört zu der Gruppe der Isoflavonoide, die unter anderem reichhaltig in Soja vorkommen. Es zählt zu den am meisten erforschten und bedeutendsten Phytoöstrogenen. Die chemische Strukturformel hat Ähnlichkeiten mit dem 17- β -Östrogen. Neben dieser Besonderheit wird Genistein auch wegen seiner Fähigkeit als „Phyto-*SERM*“ als eine natürliche Alternative zur Hormonersatztherapie erforscht.

Genistein wird über die Nahrung aufgenommen und entfaltet seine Wirkungen über eine Interaktion an den Östrogenrezeptoren. Eine erhöhte Bindungsaffinität liegt für den Östrogenrezeptor- β vor [Kuiper et al. 1998].

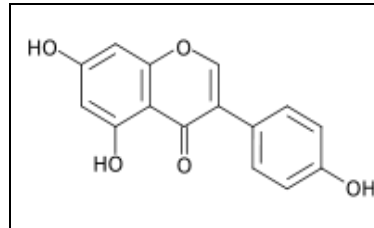


Abbildung 2: Strukturformel Genistein [<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/1b/Genistein.svg/200px-Genistein.svg.png>]

Beobachtungsstudien haben gezeigt, dass bei postmenopausalen asiatischen Frauen das Risiko für Hüftfrakturen durch den häufigen Konsum von Isoflavonen in Form von Soja reduziert werden konnte [Messina et al. 2004]. Anderson et al. (1995) belegten diese Annahmen bezüglich osteoprotektiver Effekte durch Genistein an ovariectomierten Ratten. Auf zellulärer Ebene werden die Knochenmasseverluste durch eine Hemmung der Osteoklasten und eine Stimulation der Osteoblasten reduziert [Yamagishi et al. 2001; Rickard et al. 2003]. Auch am Mausmodell bestätigten sich die knochenprotektiven Effekte [Li und Yu 2003]. In Anlehnung daran zeigten randomisierte klinische Doppelblindstudien, dass durch eine tägliche Einnahme von 54mg Genistein die Knochendichte (*BMD*) an den lumbalen Wirbelkörperabschnitten und am Femur signifikant zunimmt [Morabito et al. 2002; Marini 2007]. Gleichzeitig führten die durch Genistein induzierten antiöstrogenen Effekte an den Östrogenrezeptoren von Mammæ und Uterus zu keiner der potentiell gefährlichen Nebenwirkungen, wie sie bei der Hormonersatztherapie auftraten [Goodman et al. 2009; D'Anna et al. 2009].

1.4.3.2 Resveratrol

Resveratrol, welches zu den Polyphenolen zählt, findet sich hauptsächlich in Weintrauben, Himbeeren, Maulbeeren und Erdnüssen. Aufgrund der starken antioxidativen Wirkung findet diese Substanz heute in der Medizin vielfach Anwendung. Sie spielt eine wichtige Rolle in der natürlichen *Anti-Aging*-Therapie, als antiinflammatorische oder kardioprotektive Substanz [Gautam und Jachak 2009].

In einer Studie von Böttner et al. (2006) konnte gezeigt werden, dass an ovariectomierten Ratten Resveratrol mit geringer Affinität eine Interaktion mit den Östrogenrezeptoren eingeht, dabei 10-mal weniger am Östrogenrezeptor- α als am Östrogenrezeptor- β . Daneben scheint Resveratrol an

anderen Rezeptortypen ebenfalls Knochen-protective Effekte zu entfalten. Beispielsweise ist eine antagonistische Wirkung an einem Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor nachgewiesen worden. An diesem Rezeptor binden schädliche Substanzen wie Dioxine aus der Luft oder aus dem Zigarettenrauch (polyzyklische aromatische Hydrocarbon-Verbindungen) die darüber zu negativen Effekten im Knochenmetabolismus führen. Demzufolge erzielt Resveratrol bei Rauchern eine therapeutische knochenprotective Wirkung, indem die durch die Noxen ausgelöste Signalkaskade antagonisiert wird [Singh et al. 2000].

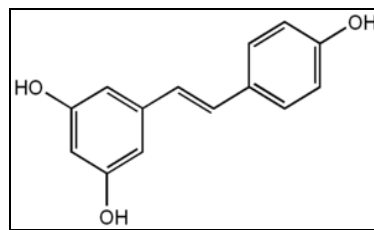


Abbildung 3: Strukturformel Resveratrol [<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/09/Resveratrol.png/300px-Resveratrol.png>]

In einer weiteren Studie von Sehmisch et al. (2008), die den therapeutischen Nutzen von Resveratrol in der Osteoporoseprophylaxe untersuchte, zeigten sich hingegen keine signifikanten Einflüsse auf die Mikroarchitektur der Knochen an Ratten. Diese Studienergebnisse widersprechen denen von Mizutani et al. (1998), in denen Resveratrol zu einer Stimulation der Osteoblasten führt, mit daraus resultierender verbesserter Knochenstabilität.

1.4.3.3 Octylmethoxycinnamat

Octylmethoxycinnamat gehört zu den Xenöstrogenen. Es sind synthetisch hergestellte chemische Verbindungen mit östrogenartiger Wirkung auf das Hormonsystem eines Organismus.

Octylmethoxycinnamat wird hauptsächlich als chemischer UV-Filter in Sonnenschutzcremes, sowie in Kosmetikprodukten als Konservierungsmittel verwendet. Wegen seiner Östrogenhaltigen Potenz stand die Substanz zeitweilig im Verdacht, negative Einflüsse auf die Reproduktionsfähigkeit des Menschen zu haben [Klammer et al. 2005]. Aufgrund dieser Annahmen untersuchten zahlreiche Studien die gesundheitsschädigenden Effekte sowie das vermutete östrogenhaltige Potenzial der Substanz. Verabreichte hohe Dosen bewirken einen zellstimulierenden Effekt am Uterusgewebe bei Ratten [Seidlová-Wuttke et al. 2006]. Damit sind Interaktionen im endokrinen System sowie mögliche toxische Nebenwirkungen nicht auszuschließen.

Im Hinblick auf den Nutzen als osteoporoseprotektive Substanz ist keine Verbesserung der Knochendichte unter Octylmethoxycinnamat erzielt worden [Seidlová-Wuttke et al. 2006].

Zusammenfassend kann der Wirkmechanismus von Octylmethoxycinnamat nicht als östrogentypische *SERM*-Aktivität mit einer Bindung an Östrogenrezeptoren- α und Östrogenrezeptoren- β erklärt werden. Es scheint vielmehr eine Interaktion an anderen Rezeptortypen zu sein, die eine direkte oder indirekte Östrogenaktivität ausüben [Wuttke et al. 2010].

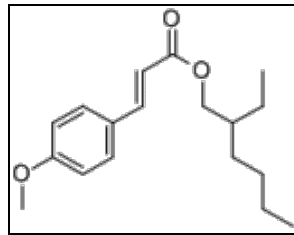


Abbildung 4: Strukturformel Octylmethoxycinnamat [[http://www.chemicalbook.com/CAS% 5C5466-77-3.gif](http://www.chemicalbook.com/CAS%5C5466-77-3.gif)]

1.4.3.4 Equol

Equol ist der aktive Metabolit des Phytoöstrogens Daidzein. Equol hat eine stärkere biologische Wirksamkeit und besitzt eine etwa 100-fach höhere Affinität zu den Östrogenrezeptoren als Daidzein [Sathyamoorthy und Wang 1997]. Reichhaltige Mengen dieser Substanzen konnten in Sojaprodukten nachgewiesen werden. Nach der Aufnahme von Daidzein-haltigen Lebensmitteln erfolgt im Verdauungstrakt die bakterielle Metabolisierung zu Equol. Die Metabolite sind anschließend im Blut und Urin nachweisbar. Allerdings können aufgrund der individuell unterschiedlichen Darmflora nur 30 bis 50% der Menschen Daidzein zu Equol metabolisieren [Decroos et al. 2005; Rowland et al. 2000].

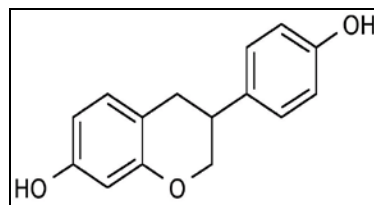


Abbildung 5: Strukturformel Equol [<http://www.kup.at/kup/images/thumbs/11074.jpg>]

Die chemische Strukturformel von Equol hat strukturelle Ähnlichkeiten mit 17- β -Östrogen und kommt als R- und S-Isomer vor. S-Equol ist die biologisch aktive Form mit einer erhöhten Bindungspräferenz zu dem β -Östrogenrezeptor [Muthyala et al. 2004; Mueller et al. 2004].

Nach Fujioka et al. (2004) konnte eine signifikante Zunahme der Knochendichte an osteopenischen Mäusen durch Equol erreicht werden. Gleichzeitig konnten keine malignen Veränderungen an den Reproduktionsorganen beobachtet werden. In einer Studie von Sehmisch et al. (2010 a; 2010 b) an Ratten führte die Fütterung von Equol zu einer Zunahme der Trabekeldichte mit einer in der Folge deutlichen Erhöhung der biomechanischen Stabilität [Tezval et al. 2010]. Demgegenüber stehen jedoch die Ergebnisse aus der Studie von Rachon et al. (2007 a und 2008), bei denen uterotrope Effekte an ovariectomierten Ratten ermittelt wurden.

1.4.3.5 Bisphenol A

Bisphenol A ist eine in Plastikfolien und in Innenbeschichtungen von Konserven vorkommende Chemikalie.

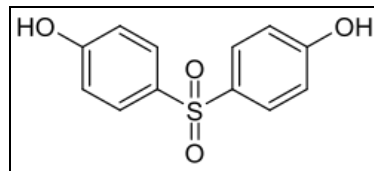


Abbildung 6: Strukturformel Bisphenol A [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b8/Bisphenol_S.svg/250pxBisphenol_S.svg.png]

Eine Studie zur Untersuchung bezüglich der osteoprotektiven Effekte von Bisphenol A konnte an genveränderten Mäusen zeigen, dass durch reichhaltige Bisphenol A-Diäten ein zuvor induzierter Knochenschwund aufgehalten werden konnte [Toda et al. 2002].

Bisphenol A stand lange im Verdacht potenziell erbgutschädigende und endokrin aktive Wirkungen zu erzielen. Deshalb wurde der Gebrauch von Babyflaschen mit Kunststoffbeschichtungen 2008 in den USA und in Kanada verboten. Jedoch gibt es nach der veröffentlichten aktualisierten EU-Risikobewertung von 2008 bei ordnungsgemäßer Verwendung keinen Anlass zur Besorgnis.

Die Forschungsergebnisse von Pacchierotti et al. (2008) konnten an somatischen Zellen und an Keimzellen von Mäusen keine geschädigenden Effekte durch Bisphenol A zeigen.

1.5 Die Maus als Modelltier der postmenopausalen Osteoporose

Die Maus bietet im Rahmen der Osteoporoseforschung als Modelltier interessante Aspekte für das Verständnis und die Entstehung von Krankheitszusammenhängen. Ein Knochenschwund wie bei der primären Osteoporose kann über eine operative Entfernung der Ovarien induziert werden. Der hormonelle Entzug führt zu einer postmenopausalen hormonellen Situation und bietet damit ein

optimales Vergleichsmodell zur Osteoporoseerkrankung der Frau. Unterschiedliche Studienergebnisse beobachteten einen signifikanten Knochensubstanzverlust durch Ovariectomie bereits nach 4 Wochen [Alexander et al. 2001; Bouxsein et al. 2005]. Es konnte gezeigt werden, dass die Hauptmechanismen der Knochensubstanzverluste bei Mäusen nach der Ovariectomie aus einer Zunahme von T-Zell produziertem TNF-alpha bestehen und folglich zu einer Induktion der *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) und *RANKL*-vermittelten Osteoklastengenesese führen [Cenci et al. 2000].

Die Forschung anhand der Maus erfordert Methoden, die in der Lage sind, die mechanischen und morphologischen Eigenschaften am Knochen adäquat zu erfassen. Dabei wurde in der vorliegenden Studie der Biege- und Bruchtest erstmalig von der Ratte auf die Maus übertragen.

Zur Bestimmung der Knochenmorphologie ist das Verfahren der Mikroradiographie gewählt worden. Die Messdaten der pQCT-Untersuchung der Mäusetibiae aus der AG Prof. Dr. H. Jarry (korrespondierende Promotion Maehlmeyer (2011)) wurden für die analysierende Diskussion der Ergebnisse der vorliegenden Promotion herangezogen.

Zukünftig könnte die schnelle Reproduzierbarkeit und die Kombination aus Genmanipulation und zuverlässigen Knochenanalyseverfahren die Maus zu einem idealen Modell im Rahmen der Osteoporoseforschung machen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für den Tierversuch der vorliegenden Studie lag eine Versuchstiergenehmigung der Bezirksregierung Braunschweig vor (AZ: 33.42502/01-30.05). Alle Tiere stammten aus einer Versuchstierzuchtanstalt (Fa. Winkelmann, Borcheln, Deutschland). Die Tierhaltung, Ovariectomie und Fütterung der Mäuse erfolgte in den Zentralen Tierexperimentellen Einrichtungen der Universitätsmedizin Göttingen (Leiterin: Frau Dr. S. Kimmina) durch die AG Prof. Dr. H. Jarry (Abteilung für Klinische und Experimentelle Endokrinologie, UMG). Insgesamt wurden 118 zwei Monate alte, weibliche C57BL/6J Mäuse untersucht. Die Beschreibung der Tierhaltung und standardisierten Ovariectomie findet sich in der korrespondierenden Promotion von Frau Maehlmeyer. Zu Beginn lag das Körpergewicht der Mäuse im Durchschnitt bei 19g. Bis zum Versuchsbeginn wurden die Tiere mit phytoöstrogenarmem Alleinfutter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) gefüttert. Die Unterbringung erfolgte in Makrolon IV-Käfigen und in jedem befanden sich jeweils 5-6 Tiere. Die Käfige wurden alle 3 Tage zur Reinigung und Desinfektion ausgetauscht und durch saubere ersetzt. Die Umgebungstemperatur betrug 20°C bei 50-55% relativer Luftfeuchtigkeit. Die Beleuchtung des Raumes erfolgte im 12-Stunden-Rhythmus von 6.00-18.00 Uhr. Leitungswasser und Futter waren ad libitum bereitgestellt.

2.2 Futter und Testsubstanzen

Alle Futtermittel wurden von der Fa. Ssniff (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) auf der Basis von sojafreiem, phytoöstrogenarmem Grundfutter (ssniff SM R/M, 10mm) hergestellt. Die Dosis der jeweiligen Substanzen wurden in Anlehnung vorausgehender Studien ermittelt [Rachon et al. 2007 a und b; Seilová-Wuttke et al. 2006]. Die bilaterale Ovariectomie der Mäuse erfolgte durch die AG Prof. Dr. H. Jarry im Alter von 2 Monaten. Anschließend wurden die Mäuse in 7 verschiedene Futtergruppen von je circa 14-20 Tieren über 12 Wochen mit spezifischen Futterzusätzen behandelt. Die Futteraufnahme und das Körpergewicht wurden einmal wöchentlich durch die AG Prof. Dr. H. Jarry kontrolliert. Die Futterinhalte wurden wie folgt dosiert: 4,32mg 17- β -Estradiolbenzoat, 1000mg Octylmethoxycinnamat, 500mg Bisphenol A, 840mg Resveratrol, 1000mg

Tabelle 2: Aufführung der spezifischen Futterzusätze

Testgruppe/ Substanz	Abkürzung
Kontrollgruppe	C
Östradiol	E
Genistein	GEN
Equol	EQO
Octylmethoxycinnamat	OMC
Bisphenol A	BPA
Resveratrol	RES

Tabelle 3: Gruppenzuordnung der Tiere

Tiernummer	Testgruppe
01- 20	C
21- 36	GEN
37- 51	RES
52- 67	OMC
68- 82	EQO
83- 98	BPA
99- 118	E

2.3 Versuchsvorbereitungen

Nach dreimonatiger Fütterung wurden die Tiere in tiefer CO₂ Narkose dekapitiert. Organe und Knochen wurden zu Untersuchungen anderer Fragestellungen von der AG Prof. Dr. H. Jarry entnommen. Grundlage der vorliegenden Arbeit war die Entnahme der jeweils linken Tibia. Diese wurde frei von Haut, Muskeln und Sehnen präpariert. Die isolierten Tibiae wurden unmittelbar oberhalb der Synostose von der Fibula durchtrennt. Bei -20°C wurden die Tibiae in Aufbewahrungsbehältern bis zur Verarbeitung der weiteren Versuche verwahrt.

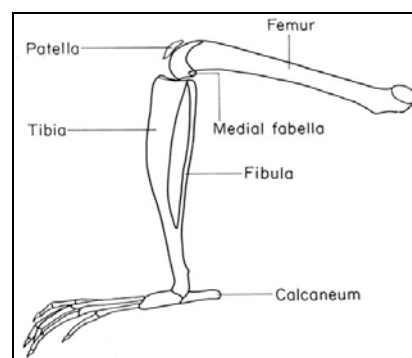


Abbildung 7: Mediale Ansicht der unteren rechten Extremität der Maus
[\[http://www.informatics.jax.org/cookbook/figures/figure41.shtml\]](http://www.informatics.jax.org/cookbook/figures/figure41.shtml)

2.4 Biomechanische Testung

2.4.1 Benutzerspezifische Eichung und Umbau der Bruchmaschine

Vor dem Versuchsbeginn musste die Universalprüfmaschine (Typ 145660 Z020/TND Zwick/Roell, Ulm, Deutschland) an die Größenverhältnisse der Mäuse-Tibiae angepasst werden. Dabei wurden die beiden Brucheinheiten Rollstempel und Auflagefläche speziell an die Größe der Mäuse angepasst und in die Maschine eingebaut.

Um eine standardisierte Bruchmessung durchführen zu können, wurden vor der eigentlichen Messung dreißig unbehandelte, neutrale Tibiae im Rechts-Links-Vergleichsversuch fakturiert. Eine genaue Positionierung der Präparate sowie eine exakte visuelle Überprüfung der metaphysären Lage in Bezug auf den Rollstempels waren vor jeder Untersuchung wichtige durchzuführende Arbeitsschritte. Die Kraftübertragung erfolgte orthogonal mit dem Rollstempel auf die ventrale Metaphyse der Tibia [Stürmer et al. 2006].

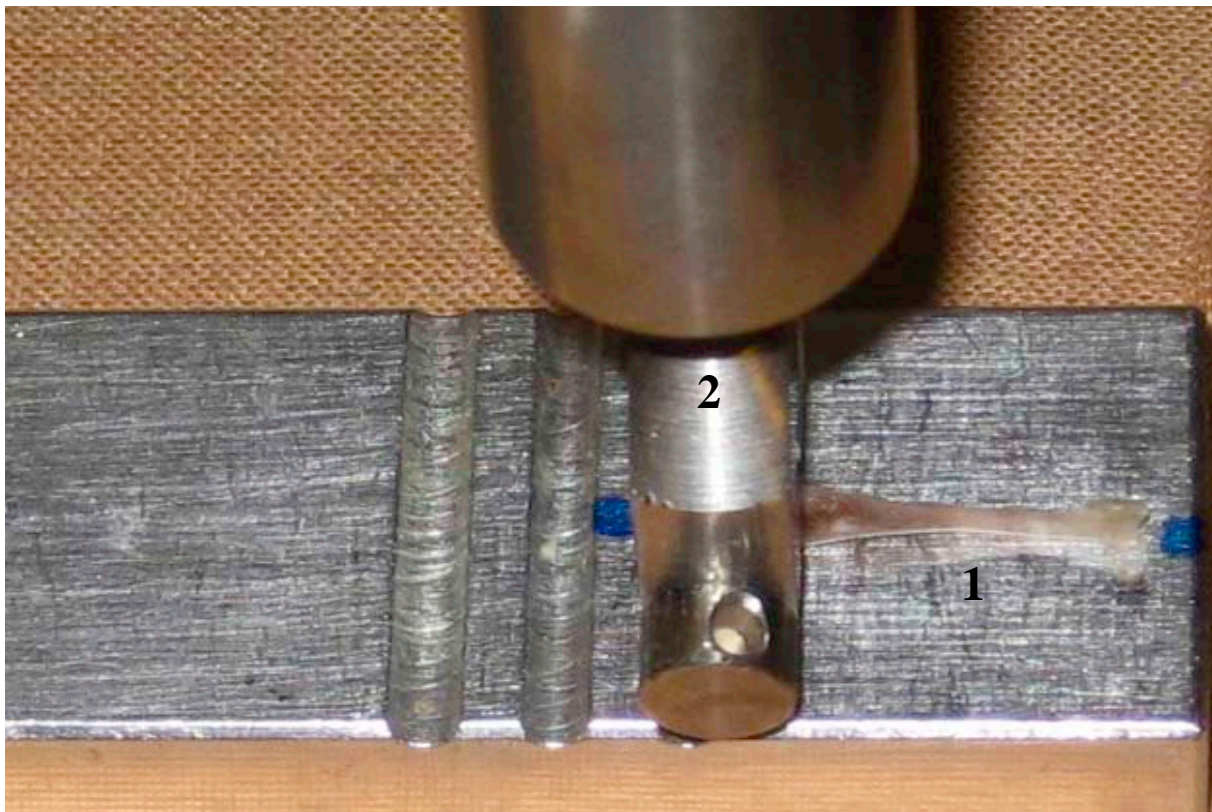


Abbildung 8: Detailansicht von der Dreipunktbiege und -bruchtestung. ZWICK- Maschine (Messbreite von 2N bis 200N), die Aluminiumplattform und die Rolle in der Bruchvorrichtung. Die Tibia in der Position kurz vor Testbeginn. 1= Tibia auf Aluminiumplattform; 2= ZWICK- Maschine.

2.4.2 Ablauf der standardisierten metaphysären Tibiafraktur

Vor Versuchsbeginn wurden die Tibiae über mehrere Stunden aufgetaut und in einer isotonen Kochsalzlösung vor dem Austrocknen bewahrt.

Einige Mäuse konnten wegen frühzeitigem Tod nicht in die Studienanalyse miteinbezogen werden. Zusammengefasst ergaben sich daraus 15 Mäuseknochen für die Kontrollgruppe, 11 für Genistein, 14 für Resveratrol, 13 für OMC, 14 für Equol, 14 für Bisphenol A und 15 für Östradiol. Von jedem Tibiapaar wurde jeweils nur der linke Knochen metaphysär frakturiert. Im ersten Arbeitsschritt erfolgte die korrekte Lagerung der Tibia in der Bruchvorrichtung. Dabei sollte der Knochen in einer drei Punkte-Lagerung auf der Auflagefläche positioniert werden. Die rechte und linke Kondyle der proximalen Diaphyse sowie das distale Ende des Knochens (Malleolus/ tibiofibularen Synostose) sind die drei definierten Kontaktpunkte. Die Einkerbungen auf der Plattform dienen der stabilen Verankerung der Kondylen und verhindern ein Verrutschen während der mechanischen Prüfung. Beim Starten der Maschine wurde der Rollstempel mit einer Geschwindigkeit von 50mm/min bis zur Vorkraft von 1N senkrecht auf die Tibia ausgerichtet. Hierdurch wurde eine Fixierung des Knochens auf der Auflagefläche erreicht. Nach einer abschließenden visuellen Überprüfung konnte der Bruchvorgang gestartet werden. Durch den ansteigenden Druck des Stempels bog die Tibia je nach Elastizitätswiderstand entsprechend durch, bis schließlich die Stabilität des Knochens überlastet und ein Bruch erfolgte. Die Maschine registriert einen plötzlichen Druckverlust ab 5N und stoppt automatisch die Abwärtsbewegung. Diese Begrenzung der Kraftausübung verhinderte eine zunehmende Splitterung der kortikalen Strukturen. Gleichzeitig wurde ein Diagramm graphisch aus Standardweg und -kraft aufgezeichnet (Software \square testXpert®; Zwick/Roell, Ulm, Deutschland). Die Messbreite reichte von 2N bis 200N bei einer relativen Messungenauigkeit von 0.2% bis 0.4%N.

2.4.3 Graphische Darstellung der Bruchkurve

Die aufgezeichneten Kraft-Weg-Diagramme sind die graphischen Ergebnisse der Bruchversuche. Auf der X-Achse ist die Verformung des Knochens in Millimetern und auf der Y-Achse die angewendete Kraft in Newton (N) angegeben.

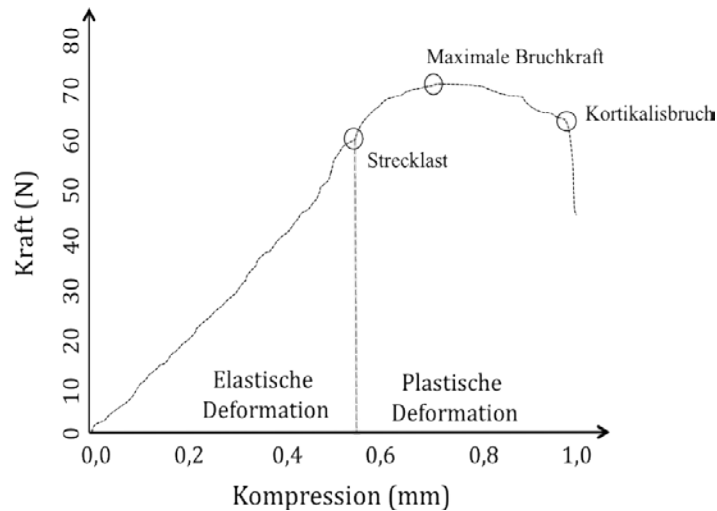


Abbildung 9: Deformations-Belastungskurve; typischer Kurvenverlauf der metaphysären Tibiafraktur am Beispiel einer Maustibia. [modifiziert nach Sehmisch et al. 2008; S.797]

Die Diagramme zeichnen sich durch einen von Stürmer et al. (2006) beschriebenen typischen Kurvenverlauf aus (siehe Abb. 9). Dieser ist durch zwei wesentliche Kurvenabschnitte gekennzeichnet: die Region der elastischen Knochenverformung und in die Region der plastischen Knochenverformung. Dazwischen befindet sich die Strecklast (*yield load*), die den Umschlagpunkt der beiden Kurvenabschnitte beschreibt. Das *Yield load* definiert das maximal tragbare Gewicht des Knochens ohne mikroarchitektonischen Schaden zu vernehmen. Auf struktureller Ebene kommt es bis zu diesem Punkt zu einer maximalen elastischen Verformung mit reversibler Dehnung der kollagenen Fasern. Durch eine weitere Zunahme der Druckbelastung auf die Tibia folgt ein Übertritt der Belastungsgrenze von der reversiblen zur irreversiblen, plastischen Knochenschädigung. Hierbei ist das Auftreten von Mikrofrakturen im Trabekelwerk die entscheidende Komponente der Knochenzerstörung. Bis die maximale Bruchkraft (F_{max}) erreicht ist, steigt der Graph nahezu linear mit zunehmender Kraftausübung an. F_{max} repräsentiert die maximale Krafteinwirkung gegen die der Knochen trotz zunehmender Mikrofrakturierung noch einen Widerstand leisten kann.

Der Kortikalisbruch (*failure load*) definiert den Punkt der endgültigen Tibiafrakturierung, bei der die maximale Summierung von Mikrofrakturen die kortikale Hülle zerbricht.

Der Messparameter „Elastizität“ entspricht der linearen Steigung im Kraft-Weg-Diagramm und charakterisiert die reversible Verformbarkeit des Knochens.

2.5 Mikroradiographie

Bei den Mikroradiographien konnten an 52 Tibiae jeweils zwei unterschiedliche Knochenquerschnittsebenen ausgewertet werden. Bei den restlichen Tibiae wurde nur jeweils der bessere Querschnitt für die Auswertung und Evaluation herangezogen. Damit ein Querschnitt für die Beurteilung und Analyse geeignet war, mussten die metaphysären Strukturen sichtbar sein. Dazu gehört ein ausreichendes Trabekelwerk mit einer intakten Kortialis. Aufgrund der doppelt S-förmig, gekrümmten Epiphysenfuge liegen sowohl epiphysäre als auch metaphysäre Strukturen in einer Schnittebene (siehe Abb. 10). Ist die Schnittführung jedoch zu weit in der epiphysären Region, sind subchondrale Knochenanteile Hauptbestandteil und überlagern die zu messenden trabekulären Strukturen. Eine histomorphometrische Knochenanalyse ist nicht möglich.

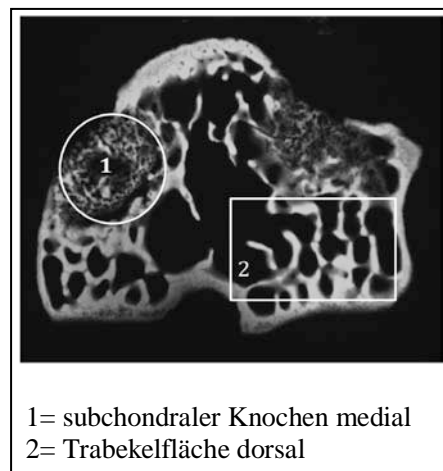


Abbildung 10: Mikroradiographisches Bild einer auszuwertenden metaphysären Tibia
(Schnittebene liegt distal der Epiphysenfuge).

2.5.1 Histologische Aufarbeitung und Anfertigung der Mikroradiographien

Die histomorphometrische Analyse ist eine objektive Methode zur Darstellung und Untersuchung der Knochenstrukturen. Dabei werden die Präparate zur Vorbereitung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (40%, 70%, 80%, 100%) für jeweils eine Woche entwässert und entfettet. Für die anschließende Kunststoffeinfettung wird das Medium Methylmethacrylsäure (MMA) verwendet. Nach vollständiger Aushärtung und Polymerisation des Kunststoffes können spezielle Schnitte der Präparatblöcke angefertigt werden. Mit einer Innenloch-Diamantsäge (Leica SP 1600 Sägemikrotom; Bensheim; Deutschland) wurden aus den Proben definierte Sägeschnitte von hundert Mikrometern (± 10 Mikrometern) gesägt. Die Schnittebene verläuft parallel zur Epiphysenfuge und damit unterhalb der Gelenkspaltlinie des Kniegelenks im rechten Winkel zur Längsachse der Tibia.

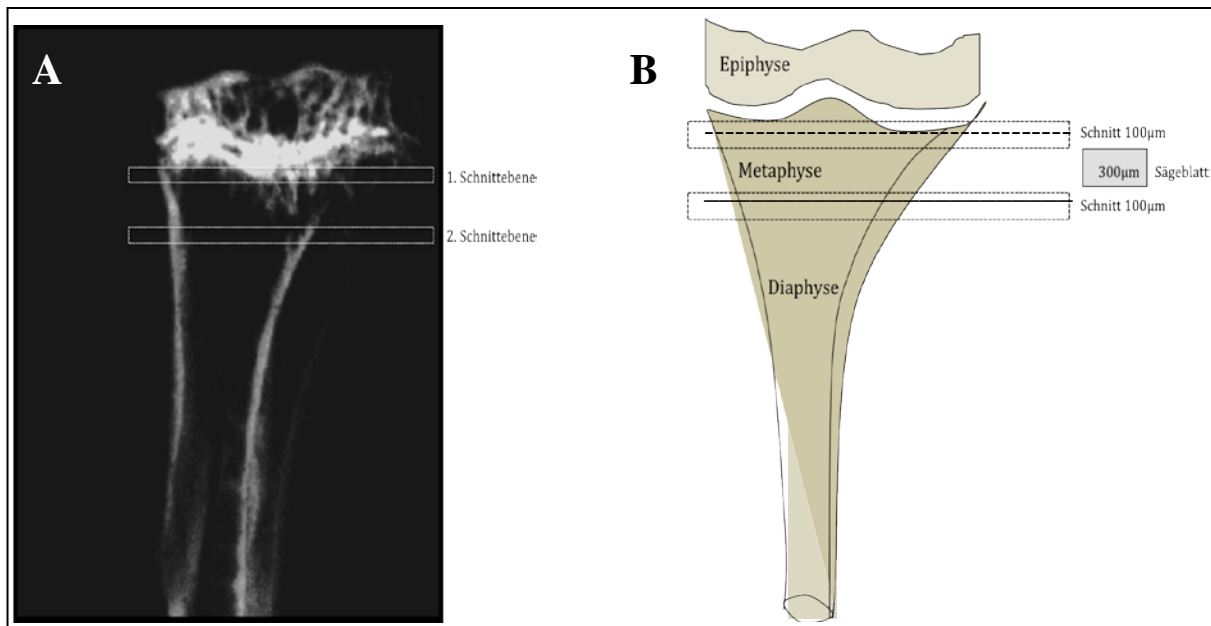


Abbildung 11: Tibia mit Schnittebenen. (A): Röntgenbild einer Mäuse-Tibia; (B): Schematische Darstellung einer Tibia. Die beiden Linien verdeutlichen die verwendeten Schnittebenen, die rechtwinklig zur Tibialängsachse gelegt wurden. Das 300µm dicke Sägeblatt ist in Grau dargestellt.

Jeweils zwei benachbarte Schnitte jeder Tibia wurden für die anschließende mikroradiographische Untersuchung ausgewählt. Von den einzelnen Schnittebenen wurden die Mikroradiographien auf dem KODAK Professional Film (Industrex Film SR45(100NIF)) mit dem Feinfokusröntgengerät Faxitron (Hewlett Packard, San Diego, Kalifornien, USA) angefertigt. Die Belichtungszeit jedes einzelnen Knochens betrug 6 Minuten unter einer Bestrahlungsintensität von 10kV. Die Bildauflösung betrug ca. 0.5mm und 0.3mA. Im Anschluss erfolgte die Entwicklung und Fixierung der Fotoplatten im Fotolabor.

2.5.2 Auswertung der Mikroradiographien

Die Auswertungen der Mikroradiographien wurden mit dem Makroskop Leica (Stereomakroskop MZ 7-5, Bensheim, Deutschland) und dem Bildbearbeitungsprogramm Quantimet QWin 2003 (System Leica DM- RXA, Bensheim, Deutschland) durchgeführt.

Vor jeder Untersuchung mussten Helligkeit, Kontrast, Bildschärfe und Abbildungsgröße der jeweiligen Radiographien durch den Untersucher manuell eingestellt werden. Die richtige Bildeinstellung wurde über mehrere Vorversuche ermittelt. Dabei sorgte die Kaltlichtlampe (Leica KL 1500 LCD, Bensheim, Deutschland) bei einer mechanischen Blende auf Schalterposition B (A: minimale Blendenöffnung; E: maximale Blendenöffnung) mit einer zusätzlichen Feinabstimmung über eine Halogenlampe durch Farbtemperatur zwischen 2650K und 3200K für eine optimale Ausleuchtung der Präparate. Durch Verwendung des 3.0er Objektivs

am Makroskop konnte das Präparat unter Ausnutzung der gesamten Monitorfläche vollständig abgebildet werden.

Anschließend erfolgte das Einlesen der Bilder mit einer Kamera (Leica DC 300F; Bensheim; Deutschland) und gleichzeitigem Transfer der Bildeinheit auf den Computer (Intel Pentium 4, 2.6GHz). Die Radiographien wurden als Schwarz-/ Weißbild mit den mineralisierten Anteilen im Bildanalyseprogramm sichtbar und eine morphometrische Auswertung konnte gestartet werden.

Für die Nomenklatur der histomorphometrischen bildanalytischen Parameter wurden die von Parfitt et al. [Parfitt et al. 1987] standardisierten Begriffe und Berechnungen verwendet.

2.5.3 Messparameter

Die Software errechnete für jeden Einzelschritt aus dem jeweiligen Querschnitt folgende in Tabelle 4 aufgeführte Parameter.

Tabelle 4: Messparameter der mikroradiographischen Auswertung mit der jeweiligen Definition

Messparameter (Einheit)	Definition
Knochenquerschnittsfläche (mm ²)	Erfassung der gesamten Fläche des Knochenquerschnitts
Trabekelfläche (mm ²)	Fläche des detektierten Knochens nach Abzug der Kortikalisfläche
Kortikalisfläche (mm ²)	Messung der Kortikalisfläche nach manueller Detektion
Trabekelkreuzungspunkte im Gesamtquerschnitt, im medialen und im lateralen Bezugskreis (mm ²) und als Absolutwert	Erfassung der Trabekelkreuzungspunkte über die Anzahl der Kreuzungstellen des Rasters
Anzahl Trabekelarme im Gesamtquerschnitt, im medialen und im lateralen Bezugskreis (mm ²) und als Absolutwert	Erfassung der Trabekel nach Definition der Trabekelfläche mittels Raster

2.5.4 Computergestützte histomorphometrische Bildanalyse

Für die digitale Bilderverarbeitung histologischer Knochenstrukturen wurde die Software Leica Quantimet QWin 2003 zur objektiven histologischen Analyse verwendet. Damit ist eine Identifikation sowie quantitative Berechnung der zweidimensional dargestellten Knochenabschnitte von Kortikalis und Spongiosa möglich. Beispielsweise konnten durch manuell markierte Kontrastierung, Anfärbung und Helligkeitsregulationen mikroarchitektonische Knochenstrukturen ermittelt werden.

Ein Nachteil der Methodik ist, dass einzelne Gewebearten des Knochens nicht automatisch von der Software unterschieden werden. Dies verlangt eine interaktive Mitarbeit durch selektives Markieren des Untersuchers.

2.5.5 Algorithmus der manuellen digitalen morphometrischen Auswertung

Für die Festlegung der zu berechnenden Strukturen mussten folgende beschriebene manuelle Arbeitsschritte in konsequenter Vorgehensweise durchgeführt werden. Nur darüber ist eine einheitliche standardisierte Auswertung und Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten.

Arbeitsschritt 1: Positionierung

Alle Querschnitte mussten nach der anatomischen Ausrichtung korrekt positioniert werden. Hiernach wurden die Knochenanteile im Bildabschnitt wie folgt angeordnet: die mediale Querschnittseite links, die laterale rechts, die ventrale proximal und die dorsale nach distal ausgerichtet.

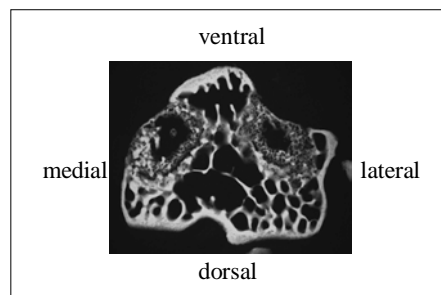


Abbildung 12: Mikroradiographisches Bild mit Kennzeichnung der anatomischen Ausrichtung

Arbeitsschritt 2: Graudetektion

Um alle zu messenden Knochenanteile farblich darzustellen, wurden verborgene Gewebestrukturen in der Radiographie durch eine manuelle Detektion sichtbar gemacht. Anschließend erfolgte die vollständige Erfassung der markierten knöchernen Strukturen durch die Software.

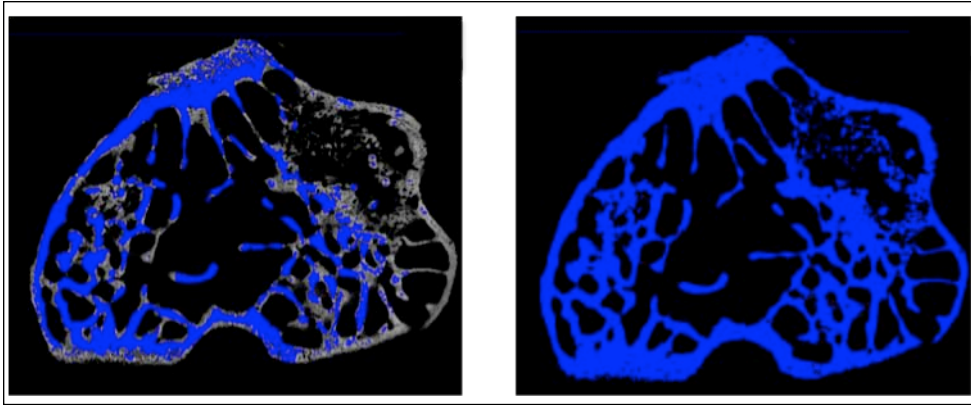


Abbildung 13: Auswertung der Mikroradiographien: Graudetektion (Arbeitsschritt 2).

A= automatische Graudetektion. Die als Knochen detektierte Fläche ist blau markiert. Nicht detektierter Knochen ist grau dargestellt. Die knöchernen Strukturen sind unvollständig von der Software erfasst.

B= Mikroradiographie nach manueller Graudetektion. Alle sichtbaren knöchernen Anteile sind von der Software als „Knochen“ erfasst.

Arbeitsschritt 3: Kortikalisfläche

Die Kortikalisfläche wurde durch manuelles Umfahren mit dem Mauszeiger an der inneren, zur Trabekelfläche hin gelegenen Seite markiert. Das Programm separierte automatisch den festgelegten Bereich von der Trabekelfläche und definierte somit die zu messende kortikale Fläche. Bei einer frakturbedingten Kontinuitätsunterbrechung in der Kortikalis konnten die ausgerissenen knöchernen Anteile hinterher durch einen Mausklick selektiert und zu der gewünschten Gesamtfläche hinzugefügt werden.

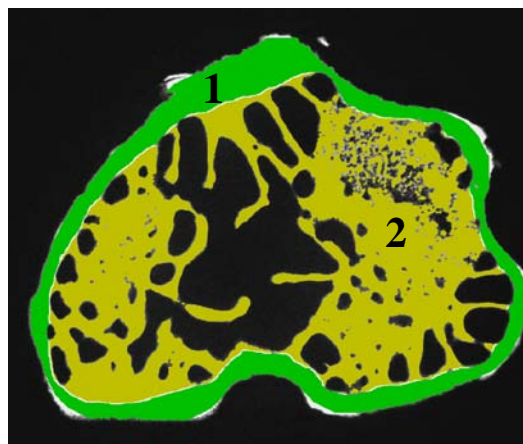


Abbildung 14: Auswertung der Mikroradiographien: Flächendefinition (Arbeitsschritt 3)

1= Kortikalisfläche (grün); 2= Trabekelfläche (gelb)

Arbeitsschritt 4: Kortikalisdicke

In diesem Arbeitsschritt wurden zehn Vektoren sowohl lateral als auch medial vollständig durch die Kortikalis gelegt. Beim Einzeichnen sollte die Lage des Vektors im rechten Winkel zur Kortikalisfläche liegen. Anschließend verkürzte das Bearbeitungsprogramm automatisch die Vektorlänge auf die zuvor definierte Kortikalisfläche und begrenzte darüber den exakt zu messenden Bereich.

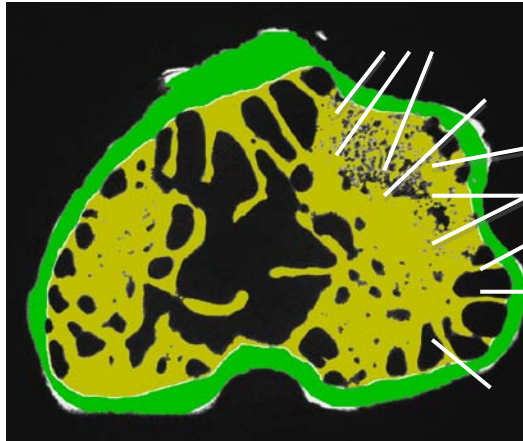


Abbildung 15: Auswertung der Mikroradiographien: Vektoren (Arbeitsschritt4). Vektoren (weiße Linien) zur Bestimmung der Kortikalisfläche am Beispiel der lateralen Knochenkomponente.

Arbeitsschritt 5: Bezugskreise platzieren

Im letzten Arbeitsschritt wurden über eine Positionierung zweier Bezugskreise die zu messenden Trabekelanteile festgelegt.

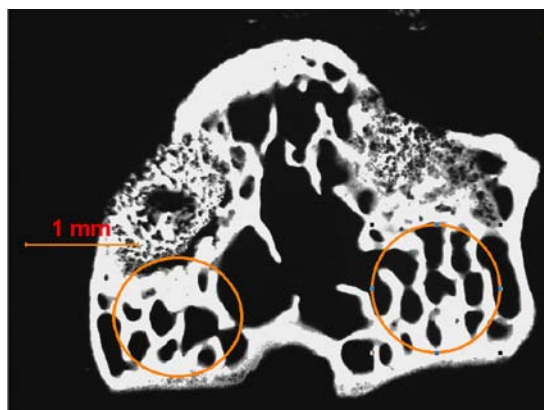


Abbildung 16: Platzierung des medialen und lateralen Bezugskreises (Arbeitsschritt 5). 1= medialer Bezugskreis; 2= lateraler Bezugskreis

Der ausgewählte Bereich (*regions of interest*) sollte bei allen Querschnitten möglichst weit im hinteren Kondylenanteil zu liegen kommen. Dabei wurde ein Kreis im medialen und einer im lateralen Bereich platziert. Die Kreise konnten in ihrer Größe variiert und somit bei frakturbedingter Zerstörung auf die intakten trabekulären Strukturen beschränkt werden.

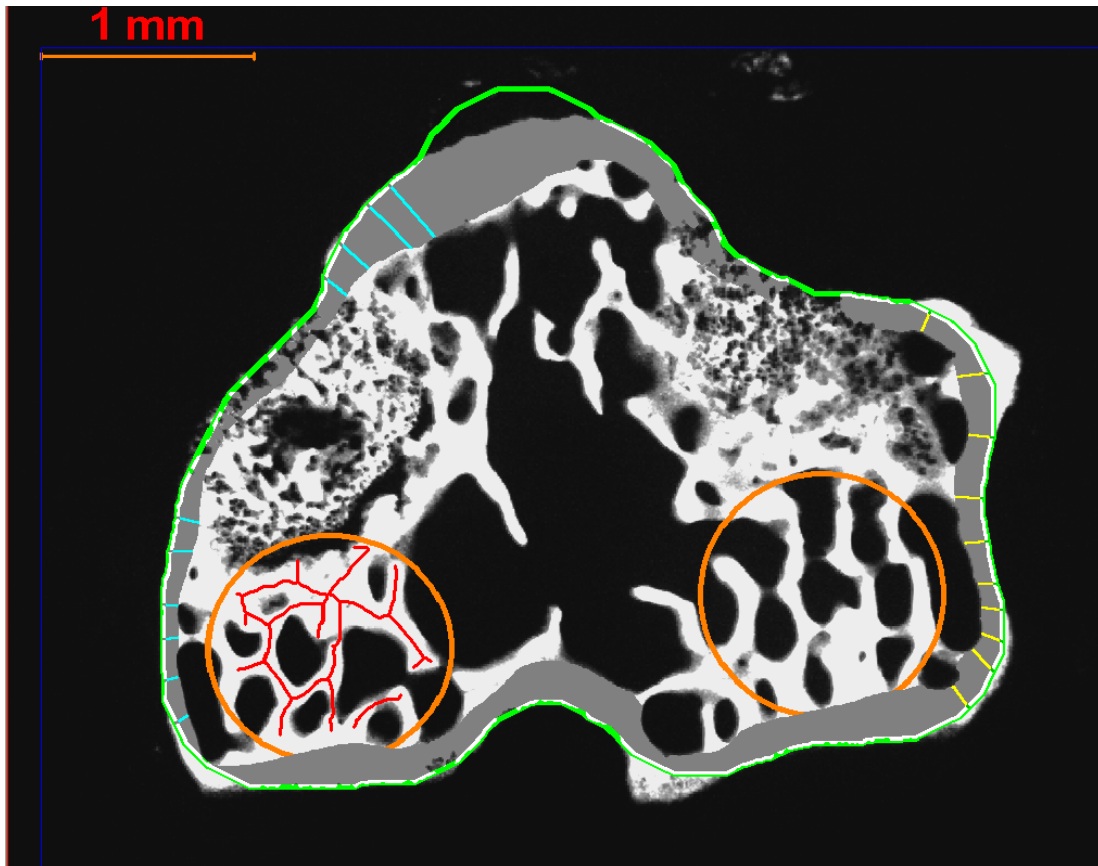


Abbildung 17: Auswertung der Mikroradiographien: Flächendefinition (Abschlussbild nach vollständiger Detektion). Graue Fläche= Kortikalis; gelbe und blaue Linien= Vektoren; orange Kreise= Bezugskreise medial und lateral; rote Linien= Trabekelfläche im Bezugskreis; grüne Linie= Abgrenzung der Kortikalisfläche.

2.5.6 Benutzerspezifität und Reproduzierbarkeit der Messergebnisse

Mit der Auswertung des Computerprogramms konnten wegen der zahlreichen manuell durchzuführenden Arbeitsschritte Messungenauigkeiten auftreten. Um diese individuellen Schwankungen auf ein Minimum zu reduzieren, wurden vor Versuchsbeginn an fünf aufeinanderfolgenden Tagen zwanzig Tibiae-Querschnitte durch denselben Untersucher ausgewertet. Anschließend erfolgte eine Überprüfung der Messungen auf Reproduzierbarkeit und Genauigkeit. Die Schwankungsbreite jedes Messparameters durfte dabei $\pm 5\%$ nicht überschreiten. Diese Bedingung wurde für alle Parameter erfüllt.

2.6 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Computerprogramm *GraphPad Prism* (Version 4.00c, April 2003, *GraphPad Software*, San Diego, USA) verwendet.

Für die biomechanischen Tests wurden die proportionalen Abweichungen zwischen den Bruchfestigkeiten der Tibiae jeder Maus ermittelt und als Durchschnittswert berechnet. Dabei galten die durchschnittlichen proportionalen Abweichungen der Parameter Maximale Bruchkraft (F_{max}), Kortikalisbruch (*failure load*) und Strecklast (*yield load*) als Reproduktions- und Qualitäts-Index. Bei allen Proben einer Futtergruppe wurden jeweils die Mittelwerte und Standardfehler bestimmt und graphisch im Säulendiagramm dargestellt. Die unterschiedlichen Gewichtsentwicklungen wurden bei der Evaluation in der biomechanischen Testung berücksichtigt. Hierbei wurde das Verhältnis zwischen den Ergebnissen und dem Körpergewicht jeder Maus berechnet. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Testgruppen wurden mit einer Varianzanalyse für wiederholte Messungen mit dem Faktor ANOVA (*analysis of variance*; ANOVA) und im anschließendem *Tukey-Kramer post-hoc Test* (*PrismTM*, *GraphPad*, San Diego, USA) berechnet.

Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0.05$ festgelegt und mit * graphisch gekennzeichnet. Die Mittelwerte der jeweiligen Testgruppe wurden zusätzlich mit Buchstaben markiert. Hierbei markieren unterschiedliche Buchstaben signifikante Messdaten der jeweiligen Substanzgruppen untereinander.

3 Ergebnisse

3.1 Futtermittelaufnahme

In Tabelle 5 wird die Konzentration der Substanzen im Futter sowie die Aufnahme der verabreichten Substanzen pro Tier und Tag dargestellt.

Tabelle 5: Konzentration der Substanzen im Futter. Die durchschnittliche Substanzmengenaufnahme der unterschiedlichen Tiergruppen pro Tag [Dokumentation durch AG Prof. Dr. H. Jarry]

Testsubstanz	Konzentration im Futter [mg/kg Futter]	Wirkstoffaufnahme pro Tier und Tag [mg/d]
Kontrollgruppe	0	0
Östradiol	4,3	0,011*
Genistein	1000	2,34*
Resveratrol	840	2,12*
Equol	400	0,83*
OMC	1000	2,75*
Bisphenol A	500	1,10*

*durchschnittlicher Wert; aus „Futtermittelaufnahme pro Käfig“ berechnet

Die Konzentrationen der Substanzen im Futter berechnet auf die quantitative durchschnittliche Aufnahme der Substanzen der jeweiligen Futtergruppen lag zwischen 0,011mg pro Tier pro Tag (Östradiol) und 2,75mg pro Tier pro Tag (Octylmethoxycinnamat).

3.2 Biomechanischer Test

3.2.1 Validierung der Bruchvorrichtung im Rechts-Links-Vergleich

Die Validierung der Bruchvorrichtung diente als Eignungsprüfung, um sichere und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten sowie die Vergleichspräzision und die Qualität der Maschine zu bestimmen. Untersucht wurden 42 Tibiae-Paare aus 21 unbehandelten Mäusen.

Dabei zeigten sich im t-Test der Rechts-Links-Vergleiche keine signifikanten Differenzen zwischen den Mittelwerten der Tibiae.

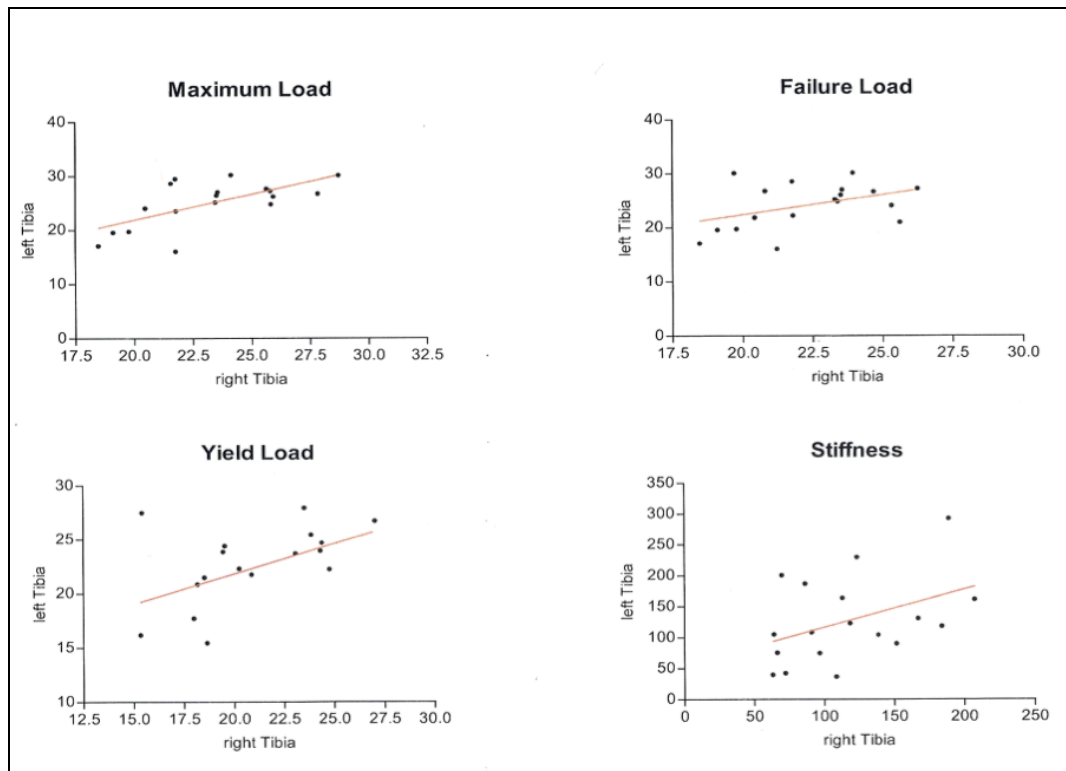


Abbildung 18: „Scatterplot“ (Streudiagramm) von den Ergebnissen der metaphysären Bruchversuche im Rechts-Links-Vergleich (A) Maximalkraft/ *Maximum Load* (F_{\max}), *Deviation*: 10.3% (B) Kortikalisbruch/ *Failure Load*, *Deviation*: 11.68% (C) Strecklast/ *Yield Load*, *Deviation*: 11.7% (D) Elastizität/ *Stiffness*, *Deviation*: 34.24%

Bei den intraindividuellen Seitenunterschieden jedes Tibiae-Paares wurden die prozentualen Abweichungen von 10,3% bei der Maximalkraft, 11,68% bei der Bruchlast und 11,7% bei der Strecklast berechnet [Sehmisch et al. 2010 b]. Die Ergebnisse des jeweiligen Parameters sind in Abbildung 18 graphisch als *Scatterplot* dargestellt.

3.2.2 Auswertung der biomechanischen Tests

Auf den folgenden Seiten werden die Ergebnisse der biomechanischen Untersuchungen präsentiert. Die Messergebnisse für die Parameter maximale Bruchkraft, Kortikalisbruch, Strecklast und Elastizität wurden über die standardisierte metaphysäre Tibiafraktur ermittelt und graphisch in Form von Säulendiagrammen dargestellt. Die Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander.

Am Ende des Kapitels befindet sich eine tabellarische Zusammenfassung aller ermittelten Ergebnisse (Tab: 6; S. 39).

3.2.3 Maximale Bruchkraft

Durch die Zufütterung der Substanzen Östradiol (Mittelwert $22,92 \pm 2,733\text{N}$) und Genistein (Mittelwert $21,57 \pm 3,377\text{N}$) zeigten sich signifikante Ergebnisse für den Parameter Bruchkraft. Die niedrigsten Werte wurden von der Kontrollgruppe Octylmethoxycinnamat, Bisphenol A und Resveratrol erreicht.

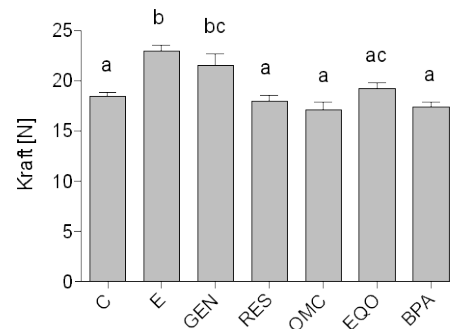


Abbildung 19: Durchschnittliche Maximalkraft bei der Tibiafraktur der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter maximale Bruchkraft. Mittelwerte verschiedener Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander. $p < 0.05$.

3.2.4 Kortikalisbruch

Durch die Substanzen Östradiol (Mittelwert $22,00 \pm 3,259\text{N}$) und Genistein (Mittelwert $20,62 \pm 3,728\text{N}$) treten signifikante Ergebnisse für den Parameter Kortikalisbruch auf. Die niedrigsten Werte werden von Octylmethoxycinnamat und Bisphenol A erreicht.

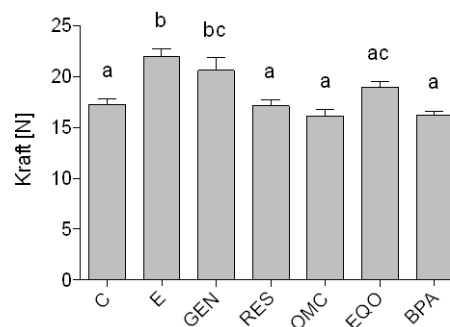


Abbildung 20: Durchschnittlicher Kortikalisbruch bei der Tibiafraktur der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter Bruchlast („failure load“). Mittelwerte verschiedener Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander. $p < 0.05$.

3.2.5 Elastizität

Unter Gabe von Östradiol (Mittelwert $133,7 \pm 28,99 \text{ N/mm}^2$) tritt eine signifikante Zunahme der knöchernen Elastizität auf. Der niedrigste Wert wird von Resveratrol, dicht gefolgt von Octylmethoxycinnamat, erreicht.

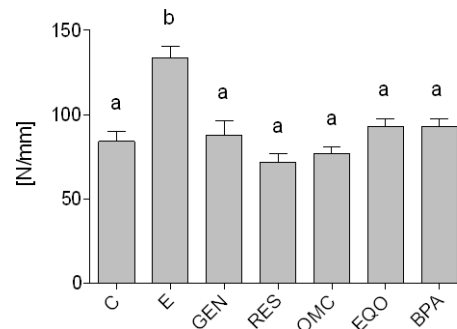


Abbildung 21: Durchschnittliche Elastizität bei der Tibiafraktur der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter Elastizität („Stiffness“). Mittelwerte verschiedener Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander. $p < 0.05$.

3.2.6 Strecklast

Durch die Substanzen Östradiol (Mittelwert $19,61 \pm 3,186 \text{ N}$) und Genistein (Mittelwert $19,52 \pm 19,52 \text{ N}$) tritt eine signifikante Erhöhung der Strecklast auf. Die niedrigsten Werte werden von Octylmethoxycinnamat und Bisphenol A erreicht, die beide noch unter dem Wert der Kontrollgruppe liegen.

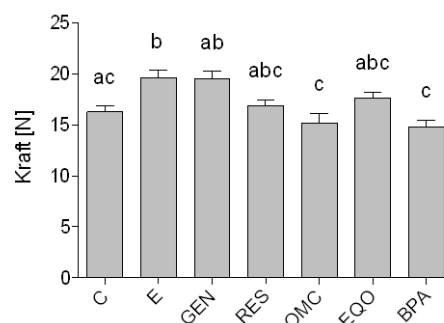


Abbildung 22: Durchschnittliche Strecklast bei der Tibiafraktur der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter Strecklast („yield load“). Mittelwerte verschiedener Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander. $p < 0.05$.

3.3 Mikroradiographie

3.3.1 Auswertung der Mikroradiographien

Im Anschluss werden die Ergebnisse der mikroradiographischen Auswertung präsentiert. Die Messergebnisse wurden für jeden Parameter in Säulendiagrammen graphisch und unter Angabe der Signifikanzen dargestellt. Die Mittelwerte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander.

Am Ende des Kapitels befindet sich eine tabellarische Zusammenfassung aller ermittelten Ergebnisse (Tab: 6; S. 39).

3.3.2 Knochenquerschnittsfläche

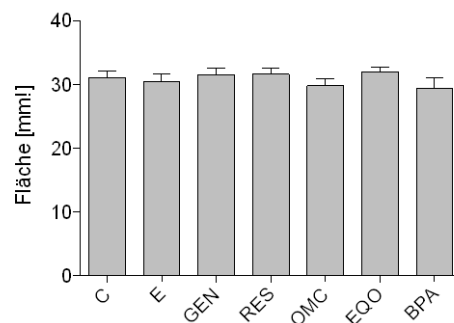


Abbildung 23: Durchschnittliche Knochenquerschnittsfläche bei der histomorphologischen Untersuchung der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter Knochenquerschnittsfläche. Mittelwerte verschiedener Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander. $p < 0.05$.

Die Knochenquerschnittsfläche zeigte sich als relativ konstante Größe. Durch die Testsubstanzen wurden keine signifikanten Veränderungen gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe erreicht.

3.3.3 Trabekelfläche absolut

Für den Parameter Trabekelfläche konnten keine signifikanten Veränderungen unter den Testsubstanzen Östradiol, Genistein, Resveratrol, OMC, Equol und Bisphenol A beobachtet werden. Eine tendenzielle Zunahme zeigte sich lediglich unter der Gabe von Östradiol (Mittelwert $12,47 \pm 5,381 \text{mm}^2$). Der niedrigste Wert wurde von Octylmethoxycinnamat erreicht.

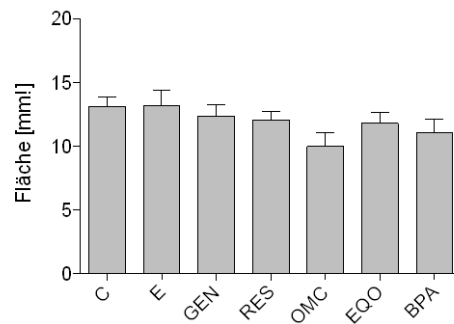


Abbildung 24: Durchschnittliche absolute Trabekelfläche bei der histomorphologischen Untersuchung der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter absolute Trabekelfläche. Mittelwerte verschiedener Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander. $p < 0.05$.

3.3.4 Kortikalisfläche absolut

Durch die Substanz Östradiol (Mittelwert $5,861 \pm 1,834 \text{mm}^2$) kann eine signifikante Zunahme der Kortikalisfläche gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe erreicht werden. Bei den Substanzen Octylmethoxycinnamat (Mittelwert $5,775 \pm 1,127 \text{mm}^2$) und Bisphenol A (Mittelwert $5,782 \pm 1,674 \text{mm}^2$) zeigte eine tendenzielle Zunahme für den Parameter Kortikalisfläche.

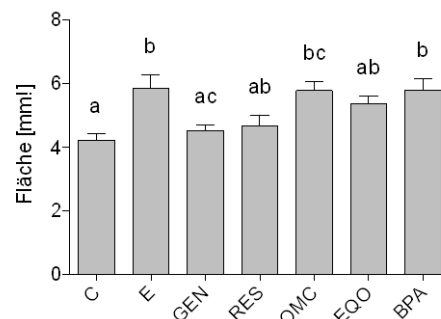


Abbildung 25: Durchschnittlich absolute Kortikalisfläche bei der histomorphologischen Untersuchung der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter absolute Kortikalisfläche. Mittelwerte verschiedener Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander. $p < 0.05$.

3.3.5 Trabekelkreuzungspunkte

Die Gabe von Östradiol (Mittelwert $1171 \pm 672,3$) führte zu einer signifikanten Zunahme der Trabekelkreuzungspunkte. Der niedrigste Wert wurde von Octylmethoxycinnamat (Mittelwert $5,775 \pm 340,1$) erreicht. Unter der Substitution von Genistein (Mittelwert $854,8 \pm 422,6$), Resveratrol (Mittelwert $831,6 \pm 354,9$), Equol (Mittelwert $793,4 \pm 422,6$) und Bisphenol A (Mittelwert $794,3 \pm 572,8$) sind keine signifikanten Veränderungen beobachtet worden.

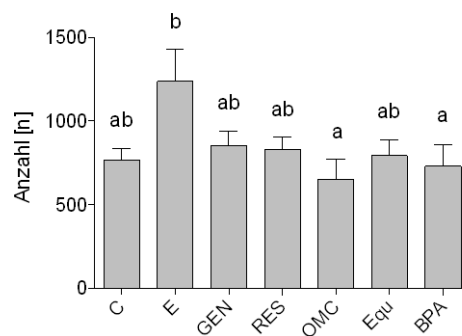


Abbildung 26: Durchschnittliche Trabekelkreuzungspunkte bei der histomorphologischen Untersuchung der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter Trabekelkreuzungspunkte. Mittelwerte verschiedener Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander. $p < 0.05$.

3.3.6 Trabekelkreuzungspunkte gesamt

Durch die Substanz Östradiol (Mittelwert $102,8 \pm 52,84$) wurde eine Zunahme der Gesamtanzahl an Trabekelkreuzungspunkten erreicht. Dabei zeigte sich beinahe eine Verdopplung im Vergleich zu Octylmethoxycinnamat (Mittelwert $52,07 \pm 29,00$). Ebenfalls ist eine Zunahme der Trabekelkreuzungspunkte von der Substanz Genistein (Mittelwert $84,65 \pm 49,90$) erreicht worden.

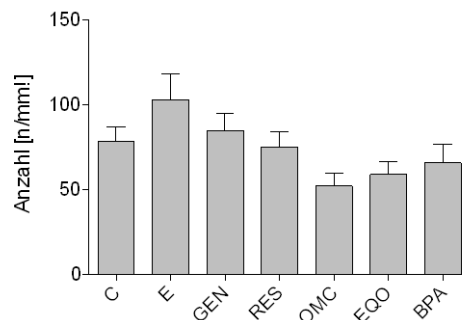


Abbildung 27: Durchschnittliche gesamte Trabekelkreuzungspunkte bei der histomorphologischen Untersuchung der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter gesamte Trabekelkreuzungspunkte. Mittelwerte verschiedener Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander. $p < 0.05$.

3.3.7 Anzahl Trabekelarme gesamt

Die größte Zunahme für den Strukturanteil Trabekelarme wurde durch Östradiol (Mittelwert 1750 ± 1106) erreicht. Die niedrigsten Werte wurde bei der Substanz Octylmethoxycinnamat (Mittelwert $1103 \pm 739,9$) gemessen.

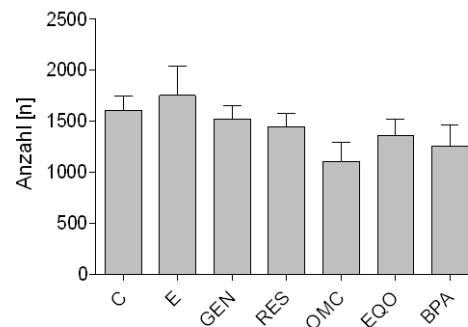


Abbildung 28: Durchschnittliche Gesamtzahl der Trabekelarme bei der histomorphologischen Untersuchung der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter Trabekelarme Gesamtzahl. Mittelwerte verschiedener Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander. $p < 0.05$.

3.3.8 Trabekelarme Anzahl

Eine tendenzielle Zunahme der Trabekelarme (n/mm^2) ist durch die Gabe von Östradiol (Mittelwert $191,5 \pm 82,21$) und Genistein (Mittelwert $163,5 \pm 117,2$) erreicht worden. Die Substanzen Octylmethoxycinnamat (Mittelwert $125,4 \pm 88,60$) und Equol (Mittelwert $108,3 \pm 53,38$) erreichten für diesen Parameter die niedrigsten Werte.

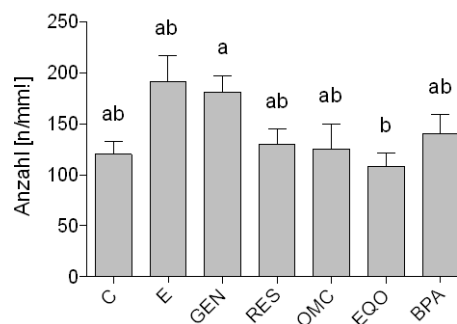


Abbildung 29: Durchschnittliche Anzahl der Trabekelarme bei der histomorphologischen Untersuchung der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter Anzahl der Trabekelarme. Mittelwerte verschiedener Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander. $p < 0.05$.

3.4 Zusammenfassung der Studien-Ergebnisse

Die folgende Tabelle dient der übersichtlichen Darstellung der auf den vorigen Seiten beschriebenen Auswirkungen der getesteten Substanzen auf die Mikroarchitektur und die Bruchfestigkeit der Knochen. Für die Ausbildung eines soliden Trabekelnetzwerkes, als wichtigster Stabilitätsfaktor sorgt erwartungsgemäß die Testsubstanz Östradiol. Die zweitbesten Ergebnisse wurden für das Phytoöstrogen Genistein erreicht. Darunter konnten positive Effekte auf den Knochen beobachtet und eine tendenzielle Zunahme von spongiösen Strukturen gemessen werden. Eine eindeutig knochenprotektive Potenz von Östradiol und Genistein hat sich bei den biomechanischen und mikroradiographischen Messergebnissen gezeigt.

Tabelle 6: Zusammenfassung der eigenen Messergebnisse. Additive Nennung der von der AG Prof. Dr. H. Jarry erhobenen Daten der pQCT (korrespondierende Promotion Maehlmeyer 2011)

Biomechanische Untersuchung:						
Maximale Bruchkraft	+	+	-	-	=	-
Kortikalisbruch	+	+	-	-	=	-
Strecklast	+	=	=	-	=	-
Elastizität	+	=	-	-	=	=
Mikroradiographie:						
Knochenquerschnittsfläche	-	=	=	-	=	-
Spongiosa	+	=	=	-	=	-
Kortikalis	+	=	=	=	=	=
Spongiosadichte (pQCT)	+	+	+	-	+	=
Spongiosafläche (pQCT)	-	=	-	=	-	=
Kortikalisdichte(pQCT)	+	=	-	=	=	=
Kortikalisfläche (pQCT)	+	=	-	=	=	-

- + signifikante Verbesserungen im Vergleich zu der osteoporotischen Kontrollgruppe
- keine Verbesserung gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe
- = Messwerte liegen im gleichen Niveau im Vergleich zur osteoporotischen Kontrollgruppe

4 Diskussion

4.1 Metaphysärer Bruch- und Biegeversuch

Wegen der gentechnischen Fortschritte und der molekularbiologischen Charakterisierung von Genen bietet das „Mausmodell“ besondere Vorzüge bei der Erforschung von Knochenerkrankungen.

Die Maus könnte in der Osteoporoseforschung viele Vorteile bieten. Die Kombination aus Genmanipulation und schneller Reproduzierbarkeit sowie der Knochenanalysemethoden, die in dieser Arbeit getestet wurden, könnten zukünftig vielversprechende Ergebnisse liefern.

Jedoch deuten die Ergebnisse von Iwaniec et al. (2006) darauf hin, dass das „Rattenmodell“ für die Osteoporoseforschung genauer und beständiger den Knochenstoffwechsel der postmenopausalen Frau imitiert als das Mausmodell. Beispielsweise ist der nach der Ovariectomie induzierte Knochenmasseverlust an trabekulären Strukturen bei Mäusen nicht so ausgeprägt zu beobachten, wie bei Ratten. Trotz allem ist das „Mausmodell“ durch die Fähigkeit der genetischen Modifizierung dem Rattenmodell überlegen und wird in der Osteoporoseforschung weiterhin im Interesse stehen.

Als Osteoporosemodell wurde für diese Arbeit die Maus des Stammes C57BL/6J ausgewählt. Ausschlaggebend für die Wahl dieser Mausrasse sind die ausgeprägten, trabekulären Knochenstrukturen. An diesem Gewebetyp können pathologische Abbauprozesse, wie erhöhte Knochenfragilität und Schwächung der mikroarchitektonischen Stabilität, im Zuge der Osteoporoseerkrankung besonders früh deutlich gemacht werden [Turner et al. 2001].

Da die Metaphyse über den höchsten Spongiosagehalt verfügt, wurden in dieser Studie alle Untersuchungsverfahren an dieser Knochenregion durchgeführt. Auch klinisch betrachtet ist die Metaphyse bei pathologischem Knochenschwund Ort der stärksten Frakturgefährdung. Dafür wurde eine von Stürmer et al. (2006) entwickelte Bruchvorrichtung ausgewählt, die speziell zum Messen von Knochendichten im experimentellen Rahmen bei Kleintieren entwickelt worden ist.

Das Ziel der Biege- und Bruchversuche ist es, eine möglichst realitätsnahe Aussage über das Frakturrisiko nach therapeutischer Intervention der Knochen zu erhalten. Die Messergebnisse zeigen die benötigte Kraft zur vollständigen Fakturierung und liefern wichtige Hinweise über die Stabilität der Knochen.

Der Bruchkeil und die Auflage für die Knochen wurden an die Maustibia adaptiert und in Vorversuchen evaluiert. Bisher existierte weltweit kein standardisiertes Testverfahren für metaphysäre Mäuseknochen. In den meisten Studien wurden die Knochentests an der Diaphyse

durchgeführt [Silfverswärd et al. 2007; Akhter et al. 2000; Yan et al. 2007]. Die Osteoporose manifestiert sich jedoch ausgeprägter an der metaphysären Knochenregion.

Die pQCT-Messung und die Auswertung der Mikroradiographien ergänzen als zuverlässiges Knochen-Analyseverfahren die Ermittlung der biomechanischen Kompetenz.

4.2 Rechts-Links-Vergleich zur biomechanischen Kalibrierung

Die gemessenen intraindividuellen Unterschiede im Rechts-Links-Vergleich von Kortikalisbruch (*failure load*), Maximalkraft (F_{Max}) und Strecklast (*Yield Load*) liegen bei 11,68%, 10,3% und 11,7% [Sehmisch et al. 2010 b]. Damit korrespondieren die Daten mit den Dimensionen der physiologischen Abweichung von den Extremitäten untereinander. Seitenvergleichende Studien an Menschen und Tieren zeigen prozentuale Differenzen von 10-15% [Heufelder 1981; Neumann 1992]. Beim Menschen können die Unterschiede zwischen der rechten und linken Extremität leicht verdeutlicht werden. Allein durch den Gebrauch einer manuell dominanten Körperhälfte kann die Knochenqualität variieren (Rechtshänder oder Linkshänder). Die Ergebnisse der Rechts-Links Bruchversuche unterliegen der ermittelten Zuverlässigkeit der Bruchvorrichtung für die Parameter Kortikalisbruch, Maximalkraft und Strecklast mit den damit minimal gemessenen intraindividuellen Abweichungen. Insgesamt ist das Verfahren als sensitive und reproduzierbare Methode für die biomechanischen Vergleichsuntersuchungen an Mäusetibiae geeignet [Sehmisch et al. 2010 b]. Eine kritische Aussage der Knochenstabilität ist für den Parameter Elastizität mit einer Rechts-Links-Abweichung von 34,24% zu treffen.

4.3 Analyse der Substanzen

4.3.1 Östrogen

Der Östrogenmangel nach der Menopause kann bei Frauen zu dem Krankheitsbild der Typ-1-Osteoporose führen [Riggs et al. 2003]. Zahlreiche Studienergebnisse zeigten bereits, das Östradiol positive Effekte auf osteoporotischen Knochen hat [Stürmer et al. 2006; Seidlová-Wuttke et al. 2006]. Auch in dem *Review* von Imai et al. (2010) werden die osteoprotektiven Effekte durch Östrogengabe an Mäuseknochen beschrieben. Durch die Interaktionen von Östrogen am α -Rezeptortyp wird die Lebensdauer der Osteoklasten verkürzt und eine verminderte Knochenresorption erreicht [Martin-Millan et al. 2010].

In der vorliegenden Untersuchung wurde das Hormon Östrogen aufgrund seiner mehrheitlich belegten osteoanabolen Effekte als Positivkontrolle eingesetzt.

Alle Tiere wurden bis zur Ovariectomie mit sojafreiem Futter gefüttert. Nach der Umstellung auf die substanzhaltigen Futtermittel haben alle Tiere, abgesehen von den Tieren unter Östradiol, kontinuierlich an Gewicht zugenommen. Durch das Östrogendefizit und das Wachstum der Tiere wurde eine Gewichtszunahme hervorgerufen (siehe Abb. 30). Die Gabe von Östradiol führte dahingegen zu einer deutlichen Abnahme mit einem signifikant geringeren durchschnittlichen Körpergewicht [Maehlmeyer 2011].

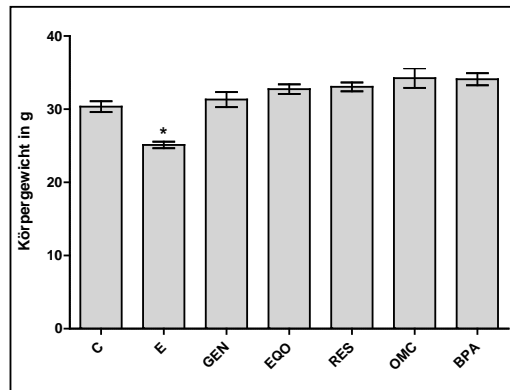


Abbildung 30: Einfluss von Östradiol, Genistein, Resveratrol, OMC und Bisphenol A auf das durchschnittliche Körpergewicht der Versuchstiere am Tag der Obduktion. $p < 0.05$ vs. C [Maehlmeyer 2011]

Wade et al. (1985) beschreiben ebenfalls eine Reduktion der Körpergewichte unter Östrogeneinnahme. Es wird deshalb angenommen, dass im Zuge der Hormonersatztherapie zusätzlich gewichtsassoziierte Komplikationen wie kardiovaskuläre Erkrankungen reduziert werden können. Ein sogenannter lipolytisch-metabolischer Effekt von Östrogenen mit einhergehender Gewichtsreduktion wurde bereits erforscht [Seidlová-Wuttke et al. 2006]. Die Auswirkungen der hormonellen Effekte können auch im umgekehrten Fall verdeutlicht werden. In einer Studie von Di Carlo et al. (2002) an Mäusen führte der Sexualhormontzug während der Menopause zu einer deutlichen Gewichtszunahme.

In der parallel durch Frau Maehlmeyer (AG Prof. Dr. H. Jarry) durchgeführten Untersuchung wurde direkt nach der Tötung der Uterus jedes Tieres entnommen und gewogen. Das Uterusgewicht der Östradiolgruppe zeigte eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den fünf übrigen Substanzgruppen.

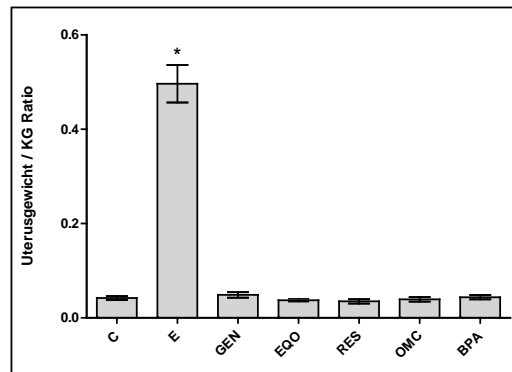


Abbildung 31: Wirkung von sojafreiem Kontrollfutter, Östradiol (0,011mg/Tier/Tag), Genistein (2,34mg/Tier/Tag), Equol (0,83mg/Tier/Tag), Resveratrol (2,12mg/Tier/Tag), OMC (2,75mg/Tier/Tag) und Bisphenol A (1,10 mg/Tier/Tag) über 3 Monate auf das Uterusfeuchtgewicht von ovariectomierten Mäusen. $p < 0.05$ vs. C [Maehlmeyer 2011]

Dieses Ergebnis spiegelt den klassischen östrogenvermittelten, stimulierenden Effekt wider. Damit ist auch eine Risikoerhöhung maligner Entartungen durch Östrogene zu erklären.

Bei den biomechanischen Untersuchungen erzielte Östrogen für die Messparameter Maximalkraft, Kortikalisbruch, Strecklast und Elastizität signifikant höhere Werte als die osteoporotische Kontrollgruppe. In der histomorphometrischen Analyse der Knochen führte die Östrogengabe zu einer Zunahme der Trabekel- und Kortikalisfläche. Im Gesamtüberblick erreichte Östrogen die besten Wirksamkeiten unter allen Testsubstanzen und zeigte sich als antiosteoporotische Substanz überlegen. Auch in den Untersuchungsergebnissen von Stürmer et al. (2006) sowie von Seidlová-Wuttke et al. (2006) bestätigen sich die positiven Effekte von Östradiol auf die Knochenqualität.

In der Dissertation von Maehlmeyer (2011) wurden die in dieser Studie verwendeten Mäuseknochen auf ihre Dichte- und Flächenverhältnisse mittels metaphysärer pQCT-Messungen (*peripheral quantitative computed tomography*) untersucht. Die Messdaten der spongiösen Anteile liefern hierbei die aussagekräftigsten Ergebnisse, da an diesen Strukturen osteoporotische Veränderungen am schnellsten deutlich werden. Demnach zeigten sich auch für diesen Parameter signifikante Unterschiede durch Zunahme der Spongiosadichte nach Östrogengabe in den Mäusetibiae. Eine Zunahme der Knochendichte ($BMD = \text{bone mineral density}$) ist ebenfalls über den hormonellen, osteoanabolen Effekt erzielt worden.

Zusammenfassend korrelieren die pQCT-Resultate (Tab: 6; S. 39) gut mit den Ergebnissen der morphometrischen und biomechanischen Messung. Östradiol erfüllte als wirksamste osteoanabole Substanz mit einer Dosierung von 0,02mg pro Tag die zu erwartenden Effekte an den metaphysären Knochen der Maus. Trotz allem ist Östradiol als Therapieoption bei der Osteoporose wegen der zahlreichen Nebenwirkungen umstritten [Rossouw et al. 2007]. Die Dosierung zur Behandlung menopausaler Symptome aus der „*Women’s Health Initiative study*“

von 2002 betrug 0,625mg pro Tag. Darunter ist eine signifikante Zunahme von kardiovaskulären Erkrankungen und Mamma-CA aufgetreten. Die Idee, durch eine niedrigere Dosierung das Nutzen-Risiko-Verhältnis der *HRT* zu verbessern, konnten bislang wissenschaftlich nicht belegt werden [Velasco-Murillo 2007].

4.3.2 Genistein

In vielen Studienergebnissen konnten bereits die osteoprotektiven Effekte durch Genistein in der Therapie an Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose nachgewiesen werden [Alekel et al. 2000; Atteritano et al. 2008; Dai et al. 2008]. Genistein fördert die Überlebensfähigkeit der Osteozyten im Knochenmetabolismus und führt zu einer Verbesserung der Knochenqualität [Dai et al. 2008].

Nach der dreimonatigen Applikation von Genistein zeigten sich an den ovariectomierten Mäusen marginale Veränderungen bezüglich der Körper- und Uterusgewichte gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe. Im Vergleich zu den mit Östrogen gefütterten Tieren konnte eine signifikante Zunahme des Körpergewichts und des Uterusgewichts durch die Zufütterung von Genistein beobachtet werden [Maehlmeyer 2011].

In der biomechanischen Testung erreichte die dreimonatige Genistein-Applikation signifikant bessere Werte für die Parameter Maximalkraft, Kortikalisbruch und Strecklast als die osteoporotische Kontrollgruppe. In der histomorphometrischen Auswertung ist eine tendenzielle Zunahme der trabekulären Knochenstrukturen im Messbereich für die Anzahl der Trabekelkreuzungspunkte und Trabekelarme evaluiert worden. Bei dem Parameter Kortikalisfläche ist nur eine geringe Abweichung von der osteoporotischen Kontrollgruppe zu beobachten.

Die metaphysäre pQCT-Untersuchung von Maehlmeyer (2011) bekräftigen die zuvor aufgeführten Ergebnisse. Hinsichtlich der trabekulären Knochendichte und der Knochenmineraldichte (*BMD*) zeigten sich signifikante Unterschiede, wohingegen die metaphysäre Kortikalis weitgehend unbeeinflusst blieb. In der vorliegenden Studie persistierte die Kortikalisfläche in ihrer Größe unter Genistein. Trotzdem konnte bei den Biege- und Bruchversuchen die alleinige Zunahme der Knochenkomponente Trabekelfläche für eine verbesserte Knochenfestigkeit sorgen. Demnach ist anzunehmen, dass der kortikale Strukturanteil eine untergeordnete Rolle bei der Stabilität der osteoporotischen Knochen spielt und für den Therapieerfolg zu vernachlässigen ist.

In Bezug auf die Studie von Anderson et al. (1998) ist ein biphasischer Effekt von Genistein in Abhängigkeit der Dosierung an Ratten beschrieben worden. Die Einnahme von 0,5-1,6mg pro Tag führte zu osteoprotektiven Effekten, höhere Dosen von 5mg pro Tag führten dagegen zu einer

beschleunigten Osteoporoseentstehung. Die in der vorliegenden Studie gewählte Dosierung von 2,34mg pro Tag führte bei den Mäusen zu positiven Effekten auf die Knochen und ist im Vergleich zu den Ratten osteoprotektiv wirksam.

Zusammengefasst hat Genistein die wünschenswerten *SERM*-Eigenschaften erreicht, indem die selektiven östrogenen Effekte am Knochen und die antiöstrogenen Effekte am Uterus erzielt wurden. Bezogen auf die Verbesserung der Knochenqualität erreichte Genistein nach Östradiol die besten Resultate bei allen Untersuchungsverfahren und ist damit als Therapieoption für die postmenopausale Osteoporose in Erwägung zu ziehen. Aktuelle Studien bekunden bereits die sichere Anwendung von Genistein als osteoprotektive Substanz und widerlegen die östrogenen Aktivitäten auf das Uterusgewebe [Hertrampf et al. 2009; D'Anna et al. 2009; Marini et al. 2008; Taylor et al. 2009].

Trotz der in diesem Versuch festgestellten positiven Auswirkung auf das Knochenprofil, können uterotrope Effekte nicht ausgeschlossen werden. In einer Studie von Cimafranca et al. (2010) konnte eine Zunahme des Uterusgewichts durch hohe Dosen von Genistein an neonatalen Mäusen nachweisen werden. Daher müssen weitere Untersuchungen die Östrogenität auch auf die Reproduktionsorgane adulter Tiere erforschen, um Genistein als sichere Alternative in der Hormonersatztherapie zu etablieren.

4.3.3 Equol

Equol ist der reduktive Metabolit von Daidzein und besitzt eine höhere östrogene Potenz. Auf zellulärer Ebene inhibiert Equol die Differenzierung der Osteoklasten [Ohtomo et al. 2008]. Daraus resultiert eine verminderte Knochenresorption mit protektiven Eigenschaften an osteoporotischen Knochen [Fujioka et al. 2004; Mathey et al. 2007; Tezval et al. 2010].

Nach der dreimonatigen Applikation von Equol an ovariectomierten Mäusen zeigte sich eine marginale Veränderung bezüglich Körper- und Uterusgewicht gegenüber den osteoporotischen Kontrolltieren. Im Vergleich zu den Östrogen gefütterten Tieren entwickelte sich das Körpergewicht signifikant höher und das Uterusgewicht signifikant niedriger durch Equol Gabe [Maehlmeyer 2011].

Bei den biomechanischen Tests konnte eine tendenzielle Zunahme für die Messparameter Maximalkraft, Kortikalisbruch und Strecklast ermittelt werden. Die Messdaten für Equol waren für diese Parameter etwas schlechter als die des Genisteins. Insgesamt ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur osteoporotischen Kontrollgruppe. Die Evaluation der Mikroradiographien bekräftigt die Ergebnisse der Biomechanik. Da unter Equol nur eine geringe Vergrößerung der Knochendichte erreicht werden konnte, ist eine Stabilitätszunahme am osteoporotischen Knochen nicht erzielt worden. Die gefährdeten Mikrofrakturen konnten somit

therapeutisch nicht aufgehalten werden. In der Untersuchung fakturierte der Knochen bei gleicher Krafteinwirkung schneller unter Equol als unter Genistein und Östradiol.

Die pQCT-Messdaten aus der Dissertation von Maehlmeyer (2011) zeigten eine signifikante Verbesserung für den Parameter Spongiosadichte. Gleichzeitig führte die verbesserte Mikroarchitektur zu einer deutlichen Zunahme der gesamten Knochendichte (*BMD*). An den kortikalen Gewebeanteilen wurden keine signifikanten Unterschiede evaluiert. Diese Ergebnisse würden zu einer Stabilitätszunahme an den osteoporotischen Knochen führen. Jedoch bestätigen sich diese Messdaten nur tendenziell in dem Bruchversuch sowie bei der Auswertung der Mikroradiographien. Bei dieser Substanzgruppe korrelieren die biomechanischen mit den morphometrischen Untersuchungen. Dies führt zu der Annahme, dass die Messmethode mittels Mikroradiographie sensitiver das Knochenprofil auswertet, als die pQCT.

Hinsichtlich der systemischen Effekte durch Equol sind östrogenartige Nebenwirkungen auf die Reproduktionsorgane beschrieben worden [Selvaraj et al. 2004; Legette et al. 2009]. Hierbei wurden neben den osteoprotektiven Effekten auch die unerwünschten, uterotropen Nebenwirkungen beobachtet. Zukünftig sind weiterführende Untersuchungen notwendig, die eine Empfehlung für eine sichere Anwendung von Equol als Alternative zur Hormonersatztherapie erlauben [Tezval et al. 2010].

In der vorliegenden Studie konnte ein tendenzieller, knochensparender Effekt mit einer Dosierung von 0,83mg pro Tag erreicht werden. Im Vergleich mit den Ergebnissen von Fujioka et al. (2004) erreichte Equol bereits positive Effekte auf den Knochen bei ovariectomierten Mäusen mit einer Dosierung von 0,5mg pro Tag. Gemäß der Setchell' Theorie [Setchell und Cole 2006] ist der klinisch relevante Nutzen von Equol von der individuellen Fähigkeit der bakteriellen Metabolisierung abhängig. Damit kann auch die Tatsache erklärt werden, dass die Wirkung von Equol auf die Knochendichte in klinischen Studien durch die Verwendung unterschiedlicher Tierstämme zu unterschiedlichen Ergebnissen führt [Vatanparast und Chilibeck 2007, Wu et al. 2007]. In einer Studie von Fujioka et al. (2004) konnte gezeigt werden, dass das intestinale Bakterienwachstum unter simultaner Einnahme von unverdaulichem Zucker gesteigert und darüber vermehrt Equol aus Daidzein metabolisiert werden konnte [Ohta et al. 2002]. Damit ist die Produktion von Equol ein Schlüsselfaktor in der therapeutischen Anwendung. Bestimmte Diäten könnten zukünftig die Bioverfügbarkeit verbessern und die maximale osteoprotektive Potenz von Equol steigern.

4.3.4 Resveratrol

Resveratrol wird hauptsächlich wegen seiner antioxidativen Eigenschaften als Therapeutikum in der Medizin eingesetzt. Immer mehr Studienergebnisse deuten darauf hin, dass Resveratrol auch

positive Effekte auf den Knochenmetabolismus hat. Auf zellulärer Ebene fördert Resveratrol die Osteoblastendifferenzierung [Mizutani et al. 1998; Habold et al. 2010]. Eine Steigerung der epiphysären Knochendichte zeigte sich am Rattenmodell nach einer 12-wöchigen Gabe von Resveratrol (0,7mg pro kg) in der Studie von Liu et al. (2005).

Bei den Untersuchungen dieser Arbeit in Bezug auf das Körper- und Uterusgewicht, konnten über den dreimonatigen Fütterungszeitraum keine Veränderungen gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe beobachtet werden. Im Vergleich zu den Östrogen gefütterten Tieren wurde eine signifikante Zunahme des Körpergewichts sowie eine signifikante Abnahme des Uterusgewichts durch Resveratrol beobachtet [Maehlmeyer 2011].

Bei den biomechanischen Tests konnte keine Verbesserung der Knochenqualität durch Resveratrol erreicht werden. Daneben zeigten sich auch in der histomorphometrischen Auswertung keine bedeutsamen Unterschiede gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe. Die trabekulären und kortikalen Knochenstrukturen blieben weitgehend unbeeinflusst. Vergleichend geringe osteoprotektive Effekte wurden an Rattenknochen in der Studie von Sehmisch et al. (2008) ermittelt. Die Gabe von Resveratrol über einen Zeitraum von 12 Wochen führte zu keinen knochensparenden Effekten an den metaphysären Tibiae, weder bei der biomechanischen Testung noch bei den pQCT-Auswertungen.

Dagegen zeigten sich bei den pQCT-Untersuchungen von Maehlmeyer (2011) positive signifikante Unterschiede unter Resveratrol auf die metaphysäre Spongiosadichte. Diese Ergebnisse konnten sich in der biomechanischen und morphometrischen Untersuchung nicht bestätigen. Die deutliche Korrelation der Messergebnisse von Biomechanik und Mikroradiographie bekräftigen eine sensitivere Untersuchungsmethodik der Knochen durch die histomorphometrische Analyse.

Zusammenfassend hat die Applikation von Resveratrol zu keinen wirksamen Effekten am osteoporotischen Knochen geführt. Trotzdem darf die gemessene Zunahme der Spongiosadichte mittels pQCT nicht außer Acht gelassen werden. Eine Ursache für die in dieser Studie geringen Effekte von Resveratrol auf die Knochenfestigkeit könnten Ungenauigkeiten bei den Messungen gewesen sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine tägliche Resveratrol-Dosis von 2,12mg pro Tag an die Mäuse verfüttert. Sehmisch et al. (2008) untersuchten anhand zweier unterschiedlicher Dosierungen, einer niedrigen Dosierung von 5mg/kg pro Tag gegenüber einer höheren Dosierung von 50mg/kg pro Tag, die Effekte von Resveratrol auf die Knochen am Rattenmodell. Es konnten keine dosisabhängigen Wirksamkeiten festgestellt werden. Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Mizutani et al. (2000) in der eine Dosierung von 5mg/kg pro Tag positive

Wirksamkeiten auf die Stabilität bei Rattenoberschenkelknochen im Bruchversuch gemessen wurden.

Hinsichtlich der widersprüchlichen Resultate sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um den genauen Mechanismus und die Wirksamkeiten der Substanz im Knochenmetabolismus zu erforschen. Ein Ansatz liefern die aktuellen Studien von Shakibaei et al. (2011) und He et al. (2010) in der die Interaktion von Resveratrol im *RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand)*-Osteoprotegerin-Zytokin-System untersucht wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass Resveratrol durch eine Hemmung der Osteoklastogenese den Knochenabbau reduziert und mittels Förderung der Osteoblastenaktivität eine Stabilitätszunahme bei osteoporotischem Knochen bewirkt.

4.3.5 Octylmethoxycinnamat

Octylmethoxycinnamat (OMC) wird aufgrund seiner Eigenschaft Strahlung zu absorbieren, weltweit als UV-Filter in Sonnenschutzcremes und Kosmetikprodukten eingesetzt. Aus Untersuchungen ist bekannt, dass die Substanz Octylmethoxycinnamat östrogene Eigenschaften *in vivo* und *in vitro* besitzt [Schlumpf et al. 2001]. Nach oraler Applikation von Octylmethoxycinnamat an Ratten konnte ein zellstimulierender Effekt am Uterusgewebe nachgewiesen werden [Schlumpf et al. 2001].

In dieser Arbeit wurde Octylmethoxycinnamat wegen seiner Homologie zur chemischen Strukturformel des Östradiols auf seine osteoanabolen Eigenschaften hin untersucht.

Nach der dreimonatigen Applikation von Octylmethoxycinnamat an die ovariectomierten Mäuse zeigten sich nur marginale Veränderungen bezüglich der Körper- und Uterusgewichte gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe. Im Vergleich zu den Östrogen gefütterten Tieren entwickelte sich das Körpergewicht signifikant höher und das Uterusgewicht signifikant niedriger durch Octylmethoxycinnamat [Maehlmeyer 2011].

In der biomechanischen Untersuchung der Biege- und Bruchversuche konnten keine Verbesserungen der Knochenstabilität ermittelt werden. Die Evaluation der Mikroradiographien zeigten ebenfalls keine osteoprotektiven Wirksamkeiten an trabekulären und kortikalen Knochenstrukturen. Die pQCT-Resultate von Maehlmeyer (2011) bekräftigen die geringen Effekte durch Octylmethoxycinnamat am Knochen und zeigten keine Unterschiede für alle Messparameter zur osteoporotischen Kontrollgruppe.

In der Studie von Seidlová-Wuttke et al. wurde Octylmethoxycinnamat im Knochenmetabolismus auf seine Östrogenität als Alternative zur Hormonersatztherapie untersucht [Seidlová-Wuttke et al. 2006]. Auch hier führte die Substanz zu keiner Stabilitätszunahme der Knochen. Geringe östrogene Wirksamkeiten konnten jedoch an Gewebeuntersuchungen von Uterus und Vagina beobachtet werden.

Die in der vorliegenden Studie gewählte Dosierung von 2,73mg pro Tag führte demnach zu keiner Inhibierung des Knochenverlustes in ovariectomierten Mäusen. Durch eine Zufütterung von höheren Dosen von OMC (275mg pro Tag) konnte am Rattenmodell eine Zunahme des Uterusgewichts festgestellt werden (Seidlová-Wuttke et al. 2006).

Als Fazit bleibt festzuhalten, dass nach den vorliegenden Ergebnissen aus der morphologischen, biomechanischen und pQCT-Untersuchung keine Verbesserungen der Mikroarchitektur am Knochen hervorgehen. Daneben könnten die östrogenen Effekte am Uterusgewebe zu einer übermäßigen Zellstimulation mit maligner Entartung den Einsatz als Therapeutikum limitieren.

4.3.6 Bisphenol A

Auch Bisphenol A wurde auf seine östrogene Potenz und auf seine Wirksamkeit als osteoprotektive Substanz hin untersucht. Aus Studien ist bekannt, dass Bisphenol A selektive östrogene Eigenschaften besitzt und der Gruppe der Phyto-*SERM* zugeordnet wird [Seidlová-Wuttke et al. 2004]. Die Bindungsaffinitäten von Bisphenol A an die Östrogenrezeptoren- α und - β sind 10.000-mal schwächer als die von Östrogenen [Kuiper et al. 1998]. In einer Studie von Toda et al. (2002) konnte eine östrogene Wirksamkeit von Bisphenol A an osteoporotischen Mäuseknochen beobachtet werden. Gleichzeitig traten jedoch auch die unerwünschten Nebenwirkungen an den Reproduktionsorganen von Uterus und Ovarien auf. Toda et al. (2002) untersuchten die Effekte von BPA in zwei unterschiedlichen Dosierungen (0,1% und 1%). Das Ergebnis zeigte, dass toxische Effekte von BPA an den Reproduktionsorganen nur durch die hohe Dosierung eintreten. Die Konzentration in der vorliegenden Studie von 1,10mg pro Tag führte weder zu knochensparenden noch zu zellproliferierenden Effekten am Uterus. Um die Wirksamkeiten dieser Substanz genauer zu testen, müsste zu der gewählten Dosierung ebenfalls eine höhere BPA-Konzentration an den Mäuseknochen untersucht werden.

Bei der Betrachtung der Körper- und Uterusgewichte zeigten sich über den dreimonatigen Fütterungszeitraum keine bedeutenden Abweichungen gegenüber der osteoporotischen Kontrollgruppe. Im Vergleich zu den Östrogen gefütterten Tieren entwickelt sich das Körpergewicht signifikant höher und das Uterusgewicht signifikant niedriger durch Bisphenol A [Maehlmeyer 2011].

Die Ergebnisse der biomechanischen und morphometrischen Untersuchung sind zusammen mit den Ergebnissen der Testsubstanz Octylmethoxycinnamat am schlechtesten. Die Wirkpotenzen auf die Spongiosa und Kortikalisfläche sind marginal und damit der osteoporotischen Kontrollgruppe am ähnlichsten.

Zusammenfassend ist die Substanz Bisphenol A nicht in der Lage, die gewünschten osteoanabolen Effekte am Mausknöchel zu erreichen. Hinsichtlich der systemischen

Nebenwirkungen sind uterotrope Effekte aus anderen Studien von Bisphenol A bekannt [Toda et al. 2002]. Nach den vorliegenden Studienergebnissen ist Bisphenol A zu therapeutischen Zwecken nicht geeignet.

4.4 Kritische Beurteilung des Studienaufbaus

4.4.1 Mikroradiographie

Die Herstellung der Tibiaquerschnitte aus den Mäusetibiae erwies sich als technisch schwierig. Da die Messerdicke des Osteotoms mit 300µm bei jedem ~~se~~ Vorgang einen Großteil der metaphysär- gelegenen Knochenstrukturen wegfräst, ist eine Herstellung von zwei ~~100~~ 100µm feinen Schnittpräparaten aufgrund der geringen Größe der Maus-Tibiametaphyse problematisch. Dabei mussten vereinzelt Schnitte ausfallen, da entweder das Knochenmaterial aus der gehärteten MMA-Masse ausbrach oder der Tibiaknochen in sich frakturierte.

Es liegt nahe, dass der angewandte Versuchsaufbau zur Anfertigung der Mikroradiographieschnitte für das Tiermodell Maus weniger gut geeignet ist als für die dickeren und größeren Knochen der Ratte. Eine Reduktion der Schnittanzahl auf einen zentralen Schnitt könnte das Ergebnis in zukünftigen Studien verbessern. Jedoch bestände wiederum die Gefahr, dass bei dem Tibia-Knochen der Maus bei einem maximalen Durchmesser von cirka 2mm die Zonen der Knochenneubildung gar nicht angeschnitten oder erfasst würden.

Insgesamt wurden sieben Parameter zur histomorphologischen Evaluation herangezogen: „Knochenquerschnittsfläche“, „Trabekelfläche absolut“, „Kortikalisfläche absolut“, „Trabekelkreuzungspunkte“, „Kreuzungspunkte gesamt“, „Trabekelarme Gesamtzahl“ und „Trabekelarme Anzahl“.

Zur vereinfachten Beschreibung der Wirksamkeiten der Testsubstanzen auf den Knochen lassen sich die gemessenen Parameter unter die drei Obergriffe zusammenfassen:

1. Knochenquerschnittsfläche
2. Spongiosa: Trabekelfläche, Trabekelarme und Trabekelkreuzungspunkte.
3. Kortikalis: Kortikalisfläche.

Unter der Anwendung des Bildanalyseprogramms ist die Entscheidung bezüglich der Bestimmung unterschiedlicher Gewebeanteile des Knochens vom Untersucher abhängig. Bei Fakturierung der Tibia lag die Schwierigkeit darin, die beschädigten Knochenstrukturen der Kortikalis oder der Trabekelfläche zuzuordnen. Mögliche Messungenauigkeiten müssen als Fehlerquelle bei der Knochenanalyse beachtet werden.

4.4.2 Biomechanik

Um den Parameter der mechanischen Kompetenz bzw. strukturellen Festigkeit am Knochen direkt zu ermitteln, haben sich die biomechanischen Tests als eine effiziente und zuverlässige Methode zur objektiven Bestimmung bewährt [Hayes et al. 1991; Hayes und Bouxsein 1997; Van der Meulen 2001]. In der vorliegenden Arbeit lag die Schwierigkeit in der exakten Positionierung der Tibiae. An einigen Tibia-Knochen konnte der drei Punkte-Kontakt zur Auflagefläche aufgrund der feinen Knochenstrukturen nur schwer bestimmt werden. Jedoch bestätigte sich der korrekte Testablauf dadurch, dass die typische Bruchkurve entstand.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit hat sich Östradiol als wirksamste osteoanabole Substanz bestätigt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in einer Verbesserung der Biomechanik und in der Mikroarchitektur am osteoporotisch veränderten Knochen. Nichtsdestotrotz sind die zellproliferierenden Effekte an den Reproduktionsorganen sowie die gesteigerte Inzidenz von malignen Entartungen limitierend für den therapeutischen Einsatz von Östradiol bei der Osteoporoseerkrankung.

Für diese Arbeit lieferte die Östradiolgruppe als Positivkontrolle und die sojafreie Kontrollgruppe als Negativkontrolle einen guten Maßstab zur Beurteilung der osteoprotektiven Wirksamkeiten der zu testenden Phytoextrakte. Dabei dienten die Mäuse unter sojafreier Diät als osteoporotische Vergleichsgruppe, an denen alle anderen Behandlungsgruppen relationiert wurden.

Bei den fünf zu untersuchenden Phytohormonen ließ sich eine klare Abstufung der osteoprotektiven Wirkpotenz erkennen. Die besten Messergebnisse erreichte Genistein. Pathologische Mikrofrakturen konnten durch die signifikant verbesserte Knochenfestigkeit verhindert werden. Hierbei ist die Dichtezunahme der Spongiosa Hauptkomponente für die verbesserte Knochenqualität. Die Testsubstanz Equol hingegen erreichte nur eine marginale Zunahme der Knochenfestigkeit, mit positivem Einfluss auf die Spongiosadichte. Insgesamt erreichten Genistein und Equol die besten Wirksamkeiten als osteoprotektive Substanz. Jedoch müssen die unerwünschten uterotropen Effekte aus vorausgehenden Tierversuchen bei der therapeutischen Anwendung am Menschen berücksichtigt werden. Somit sind weiterführende Untersuchungen bezüglich des Nutzen-Risiko-Verhältnisses notwendig.

Die Substanz Resveratrol führte zu keinen Verbesserungen bezüglich der mechanischen oder morphometrischen Qualität am Knochen. Ebenso wenig verbesserten die Substanzen OMC und Bisphenol A die Knochenqualität der metaphysären Tibiae. Darüber hinaus stehen diese drei

Phytoextrakte im Verdacht, genotoxisches Potential zu entfalten. Eine Behandlung der Osteoporose mit diesen Substanzen ist demnach bedenklich.

Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell wurde erstmalig mit dem Analyseverfahren der Biomechanik kombiniert. Ziel dieser Tests ist es, die Wirksamkeiten der verwendeten Substanzklassen durch eine metaphysäre standardisierte Tibiafrakturierung zu messen. Dabei erwies sich die Evaluation als zuverlässig. Zukünftig können weiterführende Untersuchungen an genmanipulierten Mäusen mit den in dieser Arbeit verwendeten sensitiven Methoden das Verständnis der Osteoporoseerkrankung verbessern und eine objektive Bestimmung therapeutischer Interventionen ermöglichen.

Zusammenfassend hat sich in der vorliegenden Studie gezeigt, dass die therapeutische Anwendung mit Genistein und Equol die Knochenqualität verbessert. Da alle Untersuchungen am Osteoporosemodell der Maus durchgeführt wurden, ist es ungewiss, ob die Ergebnisse auf die postmenopausale Osteoporose am Menschen übertragbar sind. Weiterführende Forschungen am Großtiermodell und letztendlich am Menschen müssen die Effizienz als Therapeutikum erneut untersuchen. Nach der derzeit vorliegenden Datenlage ist eine Risikoabschätzung der therapeutischen Anwendung von Phytohormonen beim Menschen nicht möglich.

5 Zusammenfassung

Ein funktionelles Tiermodell wie die Maus, mit der Möglichkeit einer Kombination aus Genmanipulation und Techniken der Knochenauswertung, könnte für die Forschung von Knochenerkrankungen wegweisend und von Vorteil sein. Deshalb ist das Ziel dieser Arbeit, das Mausmodell auf die Effizienz und Zuverlässigkeit der Knochenanalyseverfahren hin zu untersuchen. Ferner sollte der Einfluss von Östradiol und von fünf verschiedenen Phytoextrakten auf die Mikroarchitektur und die biomechanische Festigkeit der Knochen analysiert werden.

Insgesamt wurden 118 Mäuse ovariectomiert. Die Blockade der Östrogenproduktion führt zu einem negativen Einfluss auf die Knochendichte über die Versuchsdauer von 12 Wochen. Die Tiere wurden in sieben Futtergruppen verteilt: neben der sojafreien Negativ-Kontrollgruppe erhielten die Mäuse Östradiol, sowie die Phytohormone Genistein, Equol, OMC, Resveratrol und Bisphenol A.

Die Beurteilung der Wirksamkeiten auf die metaphysären Knochenstrukturen erfolgte anhand radiologischer, biomechanischer und histomorphometrischer Kriterien. Insgesamt erwies sich die Bestimmung der Knochenqualität am Tiermodell „Maus“ als messbar und für wissenschaftliche Zwecke geeignet.

In der vorliegenden Arbeit bestätigte Östradiol seine starke osteoanabole Potenz und erzielte die besten Wirksamkeiten für alle Untersuchungsverfahren. Genistein zeigte ähnlich gute Effekte auf die Knochenfestigkeit sowohl bei der biomechanischen als auch bei der morphologischen Analyse, wobei die uterotrope Wirkung deutlich geringer war als bei Östradiol. Equol bewirkte eine gesteigerte Spongiosadichte im pQCT mit einer tendenziellen Verbesserung der Knochenfestigkeit im Bruchversuch. Dagegen waren die Zufütterungen der Testsubstanzen Resveratrol, OMC und Bisphenol A der osteoporotischen Kontrollgruppe am ähnlichsten und zeigten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf eine verbesserte Knochenqualität.

Zukünftig ist in weiterführenden Untersuchungen zu prüfen, ob die positiven Effekte von Genistein und Equol auch beim Menschen zu den gewünschten Effekten am Knochen führen. Für den therapeutischen Einsatz von Phytohormonen und zur Risikoabschätzung potentieller Nebenwirkungen sind weiterführende Studien notwendig.

6 Literaturverzeichnis

[Adlercreutz und Mazur 1997] = Adlercreutz H, Mazur W (1997): Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med* 29(2): 95-120

[Akhter et al. 2000] = Akhter MP, Iwaniec UT, Covey MA, Cullen DM, Kimmel DB, Recker RR (2000): Genetic variations in bone density, histomorphometry, and strength in mice. *Calcif Tissue Int* 67(4):337-44

[Alekel et al. 2000] = 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(3): 844-52

[Alexander et al. 2001] = Alexander JM, Bab I, Fish S, Muller R, Uchiyama T, Gronowicz G, Nahounou M, Zhao Q, White DW, Chorev M, et al. (2001): Human parathyroid hormone 1-34 reverses bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* 16: 1665-1673

[Anderson et al. 1995] = Anderson JJ, Ambrose WW and Garner SC (1995): Orally Dosed Genistein from Soy and Prevention of Cancellous Bone Loss in Two Ovariectomized Rat Models. *J Nutr* 125: 799

[Anderson et al. 1998] = 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(3): 345-50

[Atteritano et al. 2008] = Atteritano M, Pernice F, Mazzaferro S, Mantuano S, Frisina A, D'Anna R, Cannata ML, Bitto A, Squadrito F, Frisina N, Buemi M (2008): Effects of phytoestrogen genistein on cytogenetic biomarkers in postmenopausal women: 1 year randomized, placebo-controlled study. *Eur J Pharmacol* 589(1-3): 22-6

[Bachrach et al. 1999] = Bachrach LK, Hastie T, Wang MC, Narasimhan B, Marcus R (1999): Bone mineral acquisition in healthy asian, hispanic, black and caucasian youth: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 84(12): 4702-4712

[Bartl R und Bartl C 2008] = Bartl R, Bartl C: Osteoporose-Prävention, Diagnostik, Therapie; 3. Auflage; Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2008

[Bartl R et al. 2003] = Bartl R, Bartl C, Mutschler W (2003): Diagnosis and therapy of osteoporosis. Strategy for effective treatment after fragility fractures. *Unfallchirurg* 106(7): 526-41

[Benninghoff und Drenckhahn 2003] = Benninghoff A, Drenckhahn D: Anatomie: Bd. 1. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban & Fischer Verlag, München 2003

[Beral 2003] = Beral V (2003): Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 9:362(9382): 419-27

[Böttner et al. 2006] = Böttner M, Christoffel J, Jarry H, Wuttke W (2006): Effects of long-term treatment with resveratrol and subcutaneous and oral estradiol administration on pituitary function in rats. *J Endocrinol* 189(1): 77-88

[Bouxsein et al. 2005] = Bouxsein, ML, Myers KS, Shultz KL, Donahue LR, Rosen CJ, Beamer WG (2005): Ovariectomy-induced bone loss varies among inbred strains of mice. *J Bone Miner Res* 20: 1085-1092

[Cenci et al. 2000] = Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, Pacifici R (2000): Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J Clin Invest* 106: 1229-1237

[Cimafranca et al. 2010] = Cimafranca MA, Davila J, Ekman GC, Andrews RN, Neese SL, Peretz J, Woodling KA, Helferich WG, Sarkar J, Flaws JA, Schantz SL, Doerge DR, Cooke PS (2010): Acute and Chronic Effects of Oral Genistein Administration in Neonatal Mice. *Biol Reprod* 83(1): 114-21

[Cooper et al. 1992 a] = Cooper C, Campion G, Melton LJ III (1992): Hip fractures in the elderly: a worldwide projection. *Osteoporos Int* 2(6): 285-9

[Cooper et al. 1992 b] = Cooper C, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd (1992): Incidence of clinically diagnosed vertebral fractures: a population-based study in Rochester, Minnesota, 1985-1989. *J Bone Miner Res* 7: 221-227

[Dai et al. 2008] = Dai R, Ma Y, Sheng Z, Jin Y, Zhang Y, Fang L, Fan H, Liao E (2008): Effects of genistein on vertebral trabecular bone microstructure, bone mineral density, microcracks, osteocyte density, and bone strength in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab* 26(4): 342-9

[D'Anna et al. 2009] = D'Anna R, Cannata ML, Marini H, Atteritano M, Cancellieri F, Corrado F, Triolo O, Rizzo P, Russo S, Gaudio A, Frisina N, Bitto A, Polito F, Minutoli L, Altavilla D, Adamo EB, Squadrito F (2009): Effects of the phytoestrogen genistein on hot flashes, endometrium, and vaginal epithelium in postmenopausal women: a 2-year randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Menopause* 16(2): 301-6

[Decroos et al. 2005] = Decroos K, Vanhemmens S, Cattoir S, Boon N, Verstraete W (2005): Isolation and characterisation of an equol-producing mixed microbial culture from a human faecal sample and its activity under gastrointestinal conditions. *Arch Microbiol* 183: 45-55

[Di Carlo et al. 2002] = Di Carlo C, Tommaselli GA, Nappi C. (2002): Effects of sex steroid hormones and menopause on serum leptin concentrations. *Gynecol Endocrinol* 16(6): 479-91

[Dimai 2005] = Dimai HP. Strontium ranelate (2005): a novel concept for the treatment of osteoporosis. *Wien Klin Wochenschr* 117: 728-38

[DVO 2009] = DVO-Leitlinie 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen. Dachverband Osteologie e.V 2009, http://www.dvosteologie.org/uploads/leitlinien/DVOLeitlinie%202009%20Langfassung_Druck.pdf

[Ettinger et al. 1997] = Ettinger B, Sidney S, Cummings SR, Libanati C, Bikle DD, Tekawa IS, Tolan K, Steiger P (1997): Racial differences in bone mineral density between young adult black and white subjects persist after adjustment for anthropometric, lifestyle, and biochemical differences. *J Clin Endocrinol Metab* 82 (2): 429-4347

[Frost 1992] = Frost HM (1992): The role of changes in mechanical usage set points in the pathogenesis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 7: 253-261

[Fujioka et al. 2004] = Fujioka M, Uehara M, Wu J, Adlercreutz H, Suzuki K, Kanazawa K, Takeda K, Yamada K, Ishimi Y (2004): Equol, a metabolite of daidzein, inhibits bone loss in ovariectomized mice. *J Nutr* 134(10): 2623-7

[Gautam und Jachak 2009] = Gautam R, Jachak SM (2009): Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Med Res Rev* 29(5): 767-820

[Goodman et al. 2009] = Goodman MT, Shvetsov YB, Wilkens LR, Franke AA, Le Marchand L, Kakazu KK, Nomura AM, Henderson BE, Kolonel LN (2009): Urinary phytoestrogen excretion and postmenopausal breast cancer risk: the multiethnic cohort study. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* 2(10): 887-94

[Grampp et al. 1999] = Grampp S, Henk CH und Imhof H (1999): Osteodensitometrie: Signifikanz und Limitationen im methodischen Vergleich. *Wien Med Wochenschr* 149(16-17): 472-8.

[Greenspan et al. 2007] = Greenspan SL, Bone HG, Ettinger MP, et al. (2007): Treatment of Osteoporosis with Parathyroid Hormone Study Group. Effect of recombinant human parathyroid hormone (1–84) on vertebral fracture and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 146: 326–39

[Habold et al. 2010] = Habold C, Momken I, Ouadi A, Bekaert V, Brasse D (2010): Effect of prior treatment with resveratrol on density and structure of rat long bones under tail-suspension. *J Bone Miner Metab* 29(1): 15-22

[Hayes und Bouxsein 1997] = Hayes WC, Bouxsein ML (1997): Biomechanics of cortical and trabecular bone: implications for assesement of fracture risk. Mow VC, Hayes WC, Eds. *Basic Orthopaedic Biomechanics* 2: 69-111

[Hayes et al. 1991] = Hayes WC, Piazza SJ, Zysset PK (1991): Biomechanics of fracture risk prediction of the hip and spine by quantitative computed tomography. *Radiol Clin North Am* 29: 1-18

[He et al. 2010] = He X, Andersson G, Lindgren U, Li Y (2010): Resveratrol prevents RANKL-induced osteoclast differentiation of murine osteoclast progenitor RAW 264.7 cells through inhibition of ROS production. *Biochem Biophys Res Commun* 22;401(3): 356-62

[Hertrampf et al. 2009] = Hertrampf T, Schleipen B, Offermanns C, Velders M, Laud (2009): Comparison of the bone protective effects of an isoflavone-rich diet with dietary and subcutaneous administrations of genistein in ovariectomized rats. *Toxicol Lett* 184(3): 198-203

[Heufelder 1981] = Heufelder P (1981): The leglength-difference, *Statistics of a general practice. Z Orthop Ihre Grenzgeb* 119(5): 469-74

[Hofbauer et al. 2000] = Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL (2000): The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15(1): 2-12

[Hofbauer et al. 2004] = Hofbauer LC, Kühne CA, Viereck V (2004): The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 4(3): 268-75

[Imai et al. 2010] = Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, Kato S (2010): Minireview: osteoprotective action of estrogens is mediated by osteoclastic estrogen receptor-alpha. *Mol Endocrinol* 24(5): 877-85

[Ishani et al. 2008] = Ishani A, Blackwell T, Jamal SA, Cummings SR, Ensrud KE (2008): MORE Investigators. The effect of raloxifene treatment in postmenopausal women with CKD. *J Am Soc Nephrol* 19: 1430-8

[Ishimi 2009] = Ishimi Y (2009): Nutrition and bone health. Isoflavones in bone health. *Clin Calcium* 19(10): 1506-13

[Iwaniec et al. 2006] = Iwaniec UT, Yuan D, Power RA, Wronski TJ (2006): Strain-dependent variations in the response of cancellous bone to ovariectomy in mice. *J Bone Miner Res* 21(7): 1068-74

[Jergas und Schmid 1999] = Jergas M, Schmid G (1999): Conventional radiology of osteoporosis and radiographic absorptiometry. *Radiologe* 39(3): 174-85

[Klammer et al. 2005] = Klammer H, Schlecht C, Wuttke W, Jarry H (2005): Multi-organic risk assessment of estrogenic properties of octyl-methoxycinnamate in vivo A 5-day sub-acute pharmacodynamic study with ovariectomized rats. *Toxicology* 215(1-2): 90-6

[Kuiper et al. 1998] = 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(10): 4252-63

[Kulling und Watzl 2003] = Kulling SE, Watzl B (2003): Basiswissen aktualisiert: Phytoöstrogene. *Ernährungsumschau* 50(6): 234-239

[Lauderdale et al. 1997] = Lauderdale DS, Jacobsen SJ, Furner SE, Levy PS, Brody JA, Goldberg J. Department (1997): Hip fracture incidence among elderly Asian-American populations. *Am J Epidemiol* 146(6): 502-9

[Legette et al. 2009] = Legette LL, Martin BR, Shahnazari M, Lee WH, Helferich WG, Qian J, Waters DJ, Arabshahi A, Barnes S, Welch J, Bostwick DG, Weaver CM (2009): Supplemental dietary racemic equol has modest benefits to bone but has mild uterotrophic activity in ovariectomized rats. *J Nutr* 139(10): 1908-13

[Li und Yu 2003] = Li B, Yu S (2003): Genistein prevents bone resorption diseases by inhibiting bone resorption and stimulating bone formation. *Biol Pharm Bull* 26(6): 780-6

[Lim et al. 1999] = Lim SK, Won YJ, Lee HC, Huh KB, Park YS (1999): A PCR analysis of ER α and ER β mRNA abundance in rats and the effect of ovariectomy. *J Bone Miner Res* 14(7): 1189-1196

[Liu et al. 2005] = Liu ZP, Li WX, Yu B, Huang J, Sun J, Huo JS, Liu CX (2005): Effects of trans-resveratrol from *Polygonum cuspidatum* on bone loss using the ovariectomized rat model. *J Med Food* 8(1): 14-9

[Maehlmeyer 2011] = Maehlmeyer S: Einfluss von Estradiol, Genistein, Equol und Resveratrol auf verschiedene östrogensensitive Organe und Parameter der ovariectomierten Maus. Medizinische Dissertation. Göttingen 2011

[Marini et al. 2007] = Marini H, Minutoli L, Polito F, Bitto A, Altavilla D, Atteritano M, Gaudio A, Mazzaferro S, Frisina A, Frisina N, Lubrano C, Bonaiuto M, D'Anna R, Cannata ML, Corrado F, Adamo EB, Wilson S, Squadrito F (2007): Effects of the phytoestrogen genistein on bone metabolism in osteopenic postmenopausal women: a randomized trial. *Ann Intern Med* 146(12): 839-47

[Marini et al. 2008] = Marini H, Bitto A, Altavilla D, Burnett BP, Polito F, Di Stefano V, Minutoli L, Atteritano M, Levy RM, D'Anna R, Frisina N, Mazzaferro S, Cancellieri F, Cannata ML, Corrado F, Frisina A, Adamo V, Lubrano C, Sansotta C, Marini R, Adamo EB, Squadrito F (2008): Breast safety and efficacy of genistein aglycone for postmenopausal bone loss: a follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 93(12): 4787-96

[Martin-Millan et al. 2010] = Martin-Millan M, Almeida M, Ambrogini E, Han L, Zhao H, Weinstein RS, Jilka RL, O'Brien CA, Manolagas SC (2010): The estrogen receptor-alpha in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone. *Mol Endocrinol* 24(2): 323-34

[Mathey et al. 2007] = Mathey J, Mardon J, Fokialakis N, Puel C, Kati-Coulibaly S, Mitakou S, Bennetau-Pelissero C, Lamothe V, Davicco MJ, Lebecque P (2007): Modulation of soy isoflavones bioavailability and subsequent effects on bone health in ovariectomized rats: the case for equol. *Osteoporos Int* 18(5): 671-9

[Messina 2002] = Messina M (2002): Soy foods and soybean isoflavones and menopausal health. *Nutr Clin Care* 5(6): 272-82

[Messina et al. 2004] = Messina M, Ho S, Alekel DL (2004): Skeletal benefits of soy isoflavones: a review of the clinical trial and epidemiologic data. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7(6): 649-58

[Meunier et al. 2004] = Meunier PJ, Roux C, Seeman E (2004): The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 350: 459– 68

[Mizutani et al. 1998] = Mizutani K, Ikeda K, Kawai Y, Yamori Y (1998): Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 253(3): 859-63

[Mizutani et al. 2000] = Mizutani K, Ikeda K, Kawai Y, Yamori Y (2000): Resveratrol attenuates ovariectomy-induced hypertension and bone loss in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 46(2): 78-83

[Morabito et al. 2002] = Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, D'Anna R, Corrado F, Pizzoleo MA, Cincotta M, Altavilla D, Ientile R, Squadrito F (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(10): 1904-12

[Mueller et al. 2004] = Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach KS (2004): Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxicol Sci* 80: 14-25

[Muthyala et al. 2004] = Muthyala RS, Ju YH, Sheng S, Williams LD, Doerge DR, Katzenellenbogen BS, Helferich WG, Katzenellenbogen JA (2004): Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. *Bioorg Med Chem* 12: 1559-1567

[Nagata et al. 1998] = Nagata C, Takatsuka N, Inaba S, Kawakami N, Shimizu H (1998): Effect of soymilk consumption on serum estrogen concentrations in premenopausal Japanese women. *J Natl Cancer Inst* 90(23): 1830-5

[Nakajima et al. 2002] = Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, Shimizu S, Moriya H, Einhorn TA, Yamazaki M (2002): Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34). *J Bone Miner Res* 17(11): 2038-47

[Neer et al. 2001] = Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH (2001): Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 344(19): 1434-41

[Neumann 1992] = Neumann S (1992): Handedness in comparison with the asymmetry of the upper extremities. *Z Morphol Anthropol* 79(2): 183-95

[NIH 2001] = NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis (2001): Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 285: 785-95

[Ohta et al. 2002] = Ohta, A, Uehara M, Sakai K, Takasaki M, Adlercreutz H, Morohashi T, Ishimi Y (2002): A combination of dietary fructooligosaccharides and isoflavone conjugates increases femoral bone mineral density and equol production in ovariectomized mice. *J. Nutr* 132: 2048–2054

[Ohtomo et al. 2008] = Ohtomo T, Uehara M, Peñalvo JL, Adlercreutz H, Katsumata S, Suzuki K, Takeda K, Masuyama R, Ishimi Y (2008): Comparative activities of daidzein metabolites, equol and O-desmethylangolensin, on bone mineral density and lipid metabolism in ovariectomized mice and in osteoclast cell cultures. *Eur J Nutr* 47(5): 273-9

[Onoe et al. 1997] = Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, Nozawa S, Suda T (1997): Expression of Estrogen Receptor β in Rat Bone. *Endocrinology* 138(10): 4509-4512

[Oseni et al. 2008] = Oseni T, Patel R, Pyle J, Jordan VC (2008): Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. *Planta Med* 74(13): 1656-65

[Pacchierotti et al. 2008] = Pacchierotti F, Ranaldi R, Eichenlaub-Ritter U, Attia S, Adler ID (2008): Evaluation of aneugenic effects of bisphenol A in somatic and germ cells of the mouse. *Mutat Res* 651(1-2): 64-70

[Parfitt et al. 1987] = 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(6): 595-610

[Pino et al. 2000] = Pino AM, Valladares LE, Palma MA, Mancilla AM, Yáñez M, Albala C (1998): Dietary isoflavones affect sex hormone-binding globulin levels in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 85(8): 2797-800

[Rachon et al. 2007 a] = Rachon D, Vortherms T, Seidlová-Wuttke D, Menche A, Wuttke W (2007): Uterotropic effects of dietary equol administration in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Climacteric* 10(5): 416-26

[Rachon et al. 2007 b] = Rachoń D, Seidlová-Wuttke D, Vortherms T, Wuttke W (2007): Effects of dietary equol administration on ovariectomy induced bone loss in Sprague-Dawley rats. *Maturitas* 58(3): 308-15

[Rachon et al. 2008] = Rachon D, Menche A, Vortherms T, Seidlová-Wuttke D, Wuttke W (2008): Effects of dietary equol administration on the mammary gland in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Menopause* 15(2): 340-5

[Recker et al. 1992] = Recker RR, Davies M, Hinders M (1992): Bone gain in young adult women. *JAMA* 268: 2403-2408

[Reginster et al. 2005] = Reginster JY, Seeman E, De Vernejoul MC, et al. (2005): Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peri- pheral Osteoporosis (TROPOS) study. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 2816–22

[Rickard et al. 2003] = Rickard DJ, Monroe DG, Ruesink TJ, Khosla S, Riggs BL, Spelsberg TC (2003): Phytoestrogen genistein acts as an estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptors alpha and beta. *J Cell Biochem* 89(3): 633-46

[Riggs et al. 2003] = Riggs BL, Khosla S, Atkinson EJ, Dunstan CR, Melton LJ (2003): Evidence that type I osteoporosis results from enhanced responsiveness of bone to estrogen deficiency. *Osteoporos Int* 14(9): 728-33

[Ringe 1995] = Ringe JD: Osteoporose. G.Thieme-Verlag, Stuttgart, New York 1995

[Rossouw et al. 2002] = Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288(3): 321-33

[Rossouw et al. 2007] = Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML (2007): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288(3): 321-33

[Rowland et al. 2000] = Rowland IR, Wiseman H, Sanders TA, Adlercreutz H, Bowey EA (2000): Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr. Cancer* 36: 27-32

[Sathyamoorthy und Wang 1997] = Sathyamoorthy N, Wang TT (1997): Differential effects of dietary phyto-oestrogens daidzein and equol on human breast cancer MCF-7 cells. *Eur J Cancer* 14: 2384-9

[Scheidt-Nave und Starker 2003] = Scheidt-Nave C, Starker A (2003): The prevalence of osteoporosis and associated health care use in women 45 years and older in Germany. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 48(12): 1338-47

[Schlumpf et al. 2001] = Schlumpf M, Cotton B, Conscience M, Haller V, Steinmann B, Lichtensteiger W (2001): In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ Health Perspect* 109(3): 239-44

[Sehmisch et al. 2008] = Sehmisch S, Hammer F, Christoffel J, Seidlová-Wuttke D, Tezval M, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2008): Comparison of the phytohormones genistein, resveratrol and 8-prenylnaringenin as agents for preventing osteoporosis. *Planta Med* 74(8): 794-801

[Sehmisch et al. 2010 a] = Sehmisch S, Erren M, Kolios L, Tezval M, Seidlová-Wuttke D, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2010): Effects of isoflavones equol and genistein on bone quality in a rat osteopenia model. *Phytother Res* Suppl 2: S168-74

[Sehmisch et al. 2010 b] = Sehmisch S, Uffenorde J, Maehlmeyer S, Tezval M, Jarry H, Stuermer KM, Stuermer EK (2010): Evaluation of bone quality and quantity in osteoporotic mice-the effects of genistein and equol. *Phytomedicine* 17(6): 424-30

[Seidlová-Wuttke et al. 2004] = Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W (2004): Pure estrogenic effect of benzophenone-2 (BP2) but not of bisphenol A (BPA) and dibutylphthalate (DBP) in uterus, vagina and bone. *Toxicology* 205(1-2): 103-12

[Seidlová-Wuttke et al. 2006] = Seidlová-Wuttke D, Christoffel J, Rimoldi G, Jarry H, Wuttke W (2006): Comparison of effects of estradiol with those of octylmethoxycinnamate and 4-methylbenzylidene camphor on fat tissue, lipids and pituitary hormones. *Toxicol Appl Pharmacol* 214: 1-7

[Selvaraj et al. 2004] = Selvaraj V, Zakroczymski MA, Naaz A, Mukai M, Ju YH, Doerge DR, Katzenellenbogen JA, Helferich WG, Cooke PS (2004): Estrogenicity of the isoflavone metabolite equol on reproductive and non-reproductive organs in mice. *Biol Reprod* 71(3): 966-72

[Setchell und Cole 2006] = Setchell KD, Cole SJ (2006): Method of defining equol-producer status and its frequency among vegetarians. *J Nutr* 136(8): 2188-93

[Shakibaei et al. 2011] = Shakibaei M, Buhrmann C, Mobasheri A (2011): Resveratrol-mediated sirt-1 interactions with P300 modulate RANKL-activation of NF-kappa B signaling and inhibit osteoclastogenesis in bone-derived cells. *J Biol Chem* 286(13): 11492-505

[Silfverswärd et al. 2007] = Silfverswärd CJ, Larsson S, Ohlsson C, Frost A, Nilsson O (2007): Reduced cortical bone mass in mice with inactivation of interleukin-4 and interleukin-13. *J Orthop Res* 25(6): 725-31

[Singh et al. 2000] = Singh SU, Casper RF, Fritz PC, Sukhu B, Ganss B, Girard B Jr, Savouret JF, Tenenbaum HC (2000): Inhibition of dioxin effects on bone formation in vitro by a newly described aryl hydrocarbon receptor antagonist, resveratrol. *J Endocrinol* 167(1): 183-95

[Stürmer et al. 2006] = Stürmer EK, Seidlová-Wuttke D, Sehmisch S, Rack T, Wille J, Frosch KH, Wuttke W, Stürmer KM (2006): Standardized bending and breaking test for the normal and osteoporotic metaphyseal tibias of the rat: effect of estradiol, testosterone, and raloxifene. *J Bone Miner Res* 21(1): 89-96

[Takahashi und Ozawa 2005] = Takahashi N, Ozawa H (2005): A new treatment for osteoporosis using fully human monoclonal antibody to RANKL, AMG 162. *Clin Calcium* 15(1): 43-8

[Taylor et al. 2009] = Taylor CK, Levy RM, Elliott JC, Burnett BP (2009): The effect of genistein aglycone on cancer and cancer risk: a review of in vitro, preclinical, and clinical studies. *Nutr Rev* 67(7): 398-415

[Tempfer et al. 2009] = Tempfer CB, Froese G, Heinze G, Bentz EK, Hefler LA, Huber JC (2009): Side effects of phytoestrogens: a meta-analysis of randomized trials. *Am J Med* 122(10): 939-46.e9

[Tezval et al. 2010] = Tezval M, Sehmisch S, Seidlová-Wuttke D, Rack T, Kolios L, Wuttke W, Stürmer KM, Stürmer EK (2010): Changes in the histomorphometric and biomechanical properties of the proximal femur of ovariectomized rat after treatment with the phytoestrogens genistein and equol. *Planta Med* 76(3): 235-40

[Turner et al. 2001] = Turner CH, Hsieh YF, Muller R, Bouxsein ML, Rosen CJ, McCrann ME, Donahue LR, Beamer WG (2001): Variation in bone biomechanical properties, microstructure, and density in BXH recombinant inbred mice. *J Bone Miner Res* 16(2): 206-13

[Toda et al. 2002] = Toda K, Miyaura C, Okada T, Shizuta Y (2002): Dietary bisphenol A prevents ovarian degeneration and bone loss in female mice lacking the aromatase gene (Cyp19). *Eur J Biochem* 269(8): 2214-22

[Van der Meulen 2001] = Van der Meulen MC, Jepsen KJ, Mikic B (2001): Understanding bone strength: size isn't everything. *Bone* 29(2): 101-104

[Vatanparast und Chilibeck 2007] = Vatanparast H, Chilibeck PD (2007): Does the effect of soy phytoestrogens on bone in postmenopausal women depend on the equol-producing phenotype? *Nutr Rev* 65(6 Pt 1): 294-9

[Velasco-Murillo 2007] = Velasco-Murillo (2007): Low dose estrogens and synthetic estrogens. Options for hormone replacement therapy in climacteric women. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 45(4): 381-7

[Wade et al. 1985] = Wade GN, Gray JM, Bartness TJ (1985): Gonadal influences on adiposity. *Int J Obes* 9 Suppl 1: 83-92

[WHO 1994] = WHO (1994): Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 843: 1-129

[WHO 2003] = Prevention and Management of Osteoporosis. Report of the WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 921: 1- 192

[Wu et al. 2007] = 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(5): 866-74

[Wuttke et al. 2010] = Wuttke W, Jarry H, Seidlová-Wuttke D (2010): Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. *Hormones (Athens)* 9(1): 9-15

[Yamagishi et al. 2001] = Yamagishi T, Otsuka E, Hagiwara H (2001): Reciprocal control of expression of mRNAs for osteoclast differentiation factor and OPG in osteogenic stromal cells by genistein: evidence for the involvement of topoisomerase II in osteoclastogenesis. *Endocrinology* 142(8): 3632-7

[Yan et al. 2007] = Yan D, Gurumurthy A, Wright M, Pfeiler TW, Loba EG, Everett ET (2007): Genetic background influences fluoride's effects on osteoclastogenesis. *Bone* 41(6): 1036-44

[Ziegler 1995] = Ziegler R (1995): Der Knochen und seine Erkrankungen - Der Dialog zwischen Osteoblasten und Osteoklasten. *Dtsch Med Wochenschr* 120: 571-572

7 **Abbildungsverzeichnis**

<u>Abbildung 1:</u> Unterschiedliche Schweregrade des Knochenschwunds im kortikalen Röhrenknochen.....	5
<u>Abbildung 2:</u> Strukturformel Genistein.....	13
<u>Abbildung 3:</u> Strukturformel Resveratrol.....	14
<u>Abbildung 4:</u> Strukturformel Octylmethoxycinnamat.....	15
<u>Abbildung 5:</u> Strukturformel Equol.....	15
<u>Abbildung 6:</u> Strukturformel Bisphenol A.....	16
<u>Abbildung 7:</u> Mediale Ansicht der unteren rechten Extremität der Maus.....	19
<u>Abbildung 8:</u> Detailansicht von der Dreipunktbiege und -bruchtestung.....	20
<u>Abbildung 9:</u> Deformations-Belastungskurve; typischer Kurvenverlauf der metaphysären Tibiafraktur am Beispiel einer Maustibia.....	22
<u>Abbildung 10:</u> Mikroradiographisches Bild einer auszuwertenden metaphysären Tibia.....	23
<u>Abbildung 11:</u> Tibia mit Schnittebenen.....	24
<u>Abbildung 12:</u> Mikroradiographisches Bild mit Kennzeichnung der anatomischen Ausrichtung.....	26
<u>Abbildung 13:</u> Auswertung der Mikroradiographien: Graudetektion.....	27
<u>Abbildung 14:</u> Auswertung der Mikroradiographien: Flächendefinition.....	27
<u>Abbildung 15:</u> Auswertung der Mikroradiographien: Vektoren.....	28
<u>Abbildung 16:</u> Platzierung des medialen und lateralen Bezugskreises.....	28
<u>Abbildung 17:</u> Auswertung der Mikroradiographien: Flächendefinition	29
<u>Abbildung 18:</u> „ <i>Scatterplot</i> “ (Streudiagramm) von den Ergebnissen der metaphysären Bruchversuche im Rechts-Links-Vergleich.....	32
<u>Abbildung 19:</u> Durchschnittliche Maximalkraft bei der Tibiafraktur der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter maximale Bruchkraft.....	33
<u>Abbildung 20:</u> Durchschnittlicher Kortikalisbruch bei der Tibiafraktur der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter Bruchlast („ <i>failure load</i> “)......	33
<u>Abbildung 21:</u> Durchschnittliche Elastizität bei der Tibiafraktur der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter Elastizität („ <i>Stiffness</i> “)......	34
<u>Abbildung 22:</u> Durchschnittliche Strecklast bei der Tibiafraktur der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter Strecklast („ <i>yield load</i> “)......	34

<u>Abbildung 23:</u> Durchschnittliche Knochenquerschnittsfläche bei der histomorphologischen Untersuchung der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter Knochenquerschnittsfläche.....	35
<u>Abbildung 24:</u> Durchschnittliche absolute Trabekelfläche bei der histomorphologischen Untersuchung der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter absolute Trabekelfläche.....	36
<u>Abbildung 25:</u> Durchschnittlich absolute Kortikalisfläche bei der histomorphologischen Untersuchung der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter absolute Kortikalisfläche.....	36
<u>Abbildung 26:</u> Durchschnittliche Trabekel Kreuzungspunkte bei der histomorphologischen Untersuchung der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter Trabekelkreuzungspunkte.....	37
<u>Abbildung 27:</u> Durchschnittliche gesamte Trabekelkreuzungspunkte bei der histomorphologischen Untersuchung der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter gesamte Trabekelkreuzungspunkte.....	37
<u>Abbildung 28:</u> Durchschnittliche Gesamtzahl der Trabekelarme bei der histomorphologischen Untersuchung der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter dem jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter Trabekelarme Gesamtzahl.....	38
<u>Abbildung 29:</u> Durchschnittliche Anzahl der Trabekelarme bei der histomorphologischen Untersuchung der ovariectomierten Maus nach 3monatiger Substitutionstherapie unter der jeweiligen Einfluss von E, RES, GEN, OMC, EQO und BPA für den Parameter Anzahl der Trabekelarme.....	38
<u>Abbildung 30:</u> Einfluss von Östradiol, Genistein, Resveratrol, OMC und Bisphenol A auf das durchschnittliche Körpergewicht der Versuchstiere am Tag der Obduktion.....	44
<u>Abbildung 31:</u> Wirkung von sojafreiem Kontrollfutter, Östradiol (0,011 mg/Tier/Tag), Genistein (2,34 mg/Tier/Tag), Equol (0,83 mg/Tier/Tag), Resveratrol (2,12 mg/Tier/Tag), OMC (2,75mg/Tier/Tag) und Bisphenol A (1,10 mg/Tier/Tag) über 3 Monate auf das Uterusfeuchtgewicht von ovariectomierten Mäusen.....	45

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Stadieneinteilung der Osteoporose.....	2
Tabelle 2: Aufführung der spezifischen Futterzusätze.....	19
Tabelle 3: Gruppenzuordnung der Tiere.....	19
Tabelle 4: Messparameter der mikroradiographischen Auswertung mit der jeweiligen Definition.....	25
Tabelle 5: Konzentration der Substanzen im Futter.....	31
Tabelle 6: Zusammenfassung der Messergebnisse	39

Danksagung

Ich danke Frau PD Dr. med. Ewa Klara Stürmer für die Überlassung dieser interessanten Aufgabenstellung und die langjährige Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Stephan Schmisch, für die gute Betreuung und seine Hilfsbereitschaft.

Außerdem danken möchte ich dem Biologen, Dipl. biol. Fritz Kauer und der MTA Annette Witt, für die außerordentlich präzise Anfertigung der Mikroradiographieschnitte sowie ihre freundliche und geduldige Unterstützung im Forschungslabor. Dr. rer. nat. Marina Komrakova, sage ich vielen Dank für ihre zügige Bearbeitung und Hilfestellung bei der statistischen Auswertung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Jarry, Frau Dr. med. D. Seidlová-Wuttke und Herrn Prof. Dr. med. W. Wuttke sowie Frau Dr. med. S. Mählmeyer für die Bereitstellung der pQCT-Resultate.