

Aus der Abteilung für Klinische und Experimentelle Endokrinologie
(Prof. Dr. med. W. Wuttke)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Effekt von Equol, Puerarin, Daidzein und Quercetin auf die Knochenparameter bei der ovarektomierten Ratte

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

vorgelegt von

Susanne Moysich

aus

Mühlhausen in Thüringen

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. M. Schön

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

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Glossar	vi
1 Einleitung und Literaturübersicht	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Epidemiologie der Osteoporose	2
1.3 Fragestellung dieser Arbeit	3
1.4 Phytoöstrogene	3
1.4.1 Definition und Klassifikation	3
1.4.2 Daidzein	6
1.4.3 Equol	7
1.4.4 Puerarin	8
1.4.5 Quercetin	9
1.5 Knochengewebe, Struktur und Umbauvorgänge	10
1.5.1 Osteoblasten	12
1.5.2 Osteoklasten	12
1.5.3 Osteozyten	13
1.5.4 Modeling, Remodeling und Knochenqualität	14
1.6 Endokrine und biomechanische Effekte auf den Knochen	15
1.6.1 Der Einfluss des Hormons Östrogen	15
1.6.2 Östrogenrezeptoren	15
1.6.3 Die biomechanischen Einflüsse auf den Knochen	16
1.7 Die Postmenopausale Osteoporose	17
1.7.1 Osteoporose Typ I bzw. postmenopausale Osteoporose	17
1.7.2 Osteoporose Typ II	18
1.7.3 Die konventionell etablierte pharmakologische Therapie bei Osteoporose	18
1.8 Die ovariectomierte Ratte als Osteoporose-Tiermodell	19
1.8.1 Vorteile der OVX-Ratte	19
1.8.2 Nachteile der OVX-Ratte	20

1.9	Osteoporose-Diagnostik	20
1.9.1	Die Röntgen-basierte Knochenmineraldichte-Messung	20
1.9.2	Die Serum-Diagnostik	22
2	Material und Methoden	24
2.1	Tierexperimentelle Futterstudie	24
2.1.1	Versuchstier und Unterbringung	24
2.1.2	Ovarektomie der Versuchstiere	24
2.1.3	Testsubstanzfutter	25
2.1.4	Versuchsablauf	26
2.1.5	Versuchsende	26
2.2	Radiologische Untersuchungsmethoden	26
2.2.1	Technische Daten des Computertomographie-Gerätes	27
2.2.2	Arbeitsweise des CT-Gerätes	27
2.2.3	Die ausgewerteten CT-Parameter	29
2.2.4	Auswertungsmethoden	30
2.2.5	Calculated bone density (CalcBD)	31
2.2.6	Cortical bone density (CortBD)	31
2.2.7	Dichteabhängige Differenzierung zwischen Metaphyse und Diaphyse der Ratten-Tibia	32
2.3	Serumdiagnostik	32
2.4	Statistische und graphische Methoden	32
3	Ergebnisse	34
3.1	Futter- und Testsubstanzaufnahme	34
3.2	Entwicklung des Körpergewichts	34
3.3	Die Veränderungen des Knochengewebes im Bereich der Tibia	35
3.3.1	Die Veränderung der trabekulären Knochenmineraldichte der Tibia	36
3.3.2	Die Veränderung der kortikalen Knochenmineraldichte der Tibia . .	38
3.3.3	Die Veränderung der Gesamt-Knochenmineraldichte der Tibia . . .	40
3.3.4	Die Veränderung der trabekulären Querschnittsfläche der Tibia . .	42
3.3.5	Die Veränderung der kortikalen Querschnittsfläche der Tibia	44
3.3.6	Die Veränderung der Gesamtquerschnittsfläche der Tibia	45
3.3.7	Die Veränderung des endostalen Umfangs der Tibia	48
3.3.8	Die Veränderung des periostalen Umfangs der Tibia	51

3.4	Die Veränderungen des Knochengewebes im Bereich der Vertebra	53
3.4.1	Die Veränderung der trabekulären Knochenmineraldichte der Vertebra	54
3.4.2	Die Veränderung der kortikalen Knochenmineraldichte der Vertebra	55
3.4.3	Die Veränderung der Gesamtknochenmineraldichte der Vertebra . .	56
3.4.4	Die Veränderung der trabekulären Querschnittsfläche der Vertebra .	57
3.4.5	Die Veränderung der kortikalen Querschnittsfläche der Vertebra . .	58
3.4.6	Die Veränderung der Gesamtquerschnittsfläche der Vertebra	59
3.4.7	Die Veränderung des endostalen Umfangs der Vertebra	60
3.4.8	Die Veränderung des periostalen Umfangs der Vertebra	61
3.5	Die Auswertung der Serumparameter	62
3.5.1	Die Entwicklung des Serum-Osteocalcins	62
3.5.2	Die Entwicklung der Serum- β -CrossLaps	62
4	Diskussion	65
4.1	Phytoöstrogensupplementation am Osteoporose-Tiermodell	65
4.2	Die Wahl des Wirkstoff-Substitutionsweges	66
4.3	Die Entwicklung des Körpergewichts post-OVX	66
4.3.1	Die Wirkung von Östrogen auf das Körpergewicht und die Futteraufnahme	67
4.3.2	Die Wirkung der Phytoöstrogene auf das Körpergewicht und die Futteraufnahme	67
4.4	Östradiol als Positivkontrolle	68
4.5	Die pQCT als ausgewählte Messmethode	70
4.6	Die Knochenveränderungen unter Phytoöstrogen-Einfluss	71
4.6.1	Daidzein	72
4.6.2	Equol	75
4.6.3	Puerarin	77
4.6.4	Quercetin	79
5	Zusammenfassung (deutsch und englisch)	82
6	Tabellenverzeichnis	87
7	Abbildungsverzeichnis	88
8	Literaturverzeichnis	90

Glossar

ANOVA	ANalysis Of VAriance.
BMC	Bone Mineral Content.
BMD	Bone Mineral Density.
BMU	Bone Mineral Unit.
Daidzein h	Daidzein, hoch dosiert.
Daidzein n	Daidzein, niedrig dosiert.
DXA	Dual-X-ray Absorptiometrie.
E ₁	Östron.
E ₂	17 β -Östradiol.
E ₂ h	17 β -Östradiol, hoch dosiert.
E ₂ n	17 β -Östradiol, niedrig dosiert.
Equol h	Equol, hoch dosiert.
Equol n	Equol, niedrig dosiert.
ER α	Östrogenrezeptor alpha.
ER β	Östrogenrezeptor beta.
HRT	Hormone Replacement Therapy.
KG	Körpergewicht.
OPG	Osteoprotegerin.
OVX	Ovarektomie.
pQCT	peripheral Quantitative computed Tomography.
Puerarin h	Puerarin, hoch dosiert.
Puerarin n	Puerarin, niedrig dosiert.

Quercetin h	Quercetin, hoch dosiert.
Quercetin n	Quercetin, niedrig dosiert.
ROI	Region Of Interest.
SEM	Standardfehler der Mittelwerte.
SERM	Selektiver Östrogenrezeptormodulator.
SHBG	Sex Hormone Binding Globulin.
SPA	Single-Photonen-Absorptiometrie.
WHO	World Health Organization.

1 Einleitung und Literaturübersicht

1.1 Einleitung

Phytoöstrogene sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, welche im tierischen und menschlichen Organismus hormonmodulierende Wirkungen auslösen. Als gemeinsames Charakteristikum weisen sie eine dem Östrogen ähnliche chemische Struktur auf, worüber sie mit den Östrogenrezeptoren interagieren und hierbei östrogene oder anti-östrogene Wirkungen auslösen können (Swedenborg et al. 2009; Oseni et al. 2008; Gültekin und Yildiz 2006; Adzersen und Strowitzki 2003). Die Phytoöstrogene spielen eine bedeutende Rolle als Bestandteil der fernöstlichen Ernährung sowie als Therapeutikum in der Traditionellen Chinesischen Medizin. In der vorliegenden Arbeit wurden Daidzein, Equol, Puerarin und Quercetin untersucht. Dabei sind Daidzein und Equol mit der Sojapflanze bzw. ihrer Bohne assoziiert (Maskarinec et al. 2008).

Der hormonmodulierende Einfluss der Phytoöstrogene fand erstmals in den 1940er Jahren Erwähnung (Bennets et al. 1946). Seither thematisierte eine Reihe wissenschaftlicher Publikationen den protektiven Effekt von Phytoöstrogenen auf hormonabhängige Erkrankungen - wie etwa Krebsleiden der Mamma, des Endometriums, der Prostata oder auf arteriosklerotische Gefäßerkrankungen (Cassidy und Faughnan 2000; Adlercreutz und Mazur 1997). In den westlichen Industrienationen haben die Phytoöstrogene mittlerweile bereits zu einer pharmakologischen Relevanz gefunden. Als wesentliche Indikation seien hier klimakterischen Beschwerden (z. B. Hitzewallungen) zu nennen, bei welchen sie als Nahrungsergänzung empfohlen werden (Ferrari 2009; Adzersen und Strowitzki 2003; Yarnell und Abascal 2003).

Für die vorliegende Arbeit sind die Phytoöstrogene vor allem unter dem Aspekt einer therapeutischen Alternative in der Osteoporosetherapie zu sehen. In Deutschland verursacht die osteoporotische Fraktur mehr Hospitalisationstage als der Myokardinfarkt oder Diabetes mellitus (Häussler et al. 2006). Dieser Aspekt weist auf die enorme soziale und gesundheitsökonomische Bedeutung dieser Erkrankung hin (Harvey et al. 2010; Häussler et al. 2006). Allein in Deutschland gab es im Jahre 2006 7,8 Millionen Osteoporosefälle jenseits des 50. Lebensjahres, wobei der Anteil betroffener Frauen bei 83 % lag (Häussler et al.

2006). Diese Zahlen belegen demnach den Stellenwert der postmenopausalen Osteoporose. Ziel einer medikamentösen Osteoporosetherapie ist es, den weiteren Knochenmasseverlust aufzuhalten bzw. zu vermindern. Zu diesem Zweck sind zurzeit Pharmakologika unterschiedlicher Ansätze etabliert. Besonders hervorzuheben ist an dieser Stelle die Hormonersatztherapie (HRT) mit Östrogenen. Neben der Behandlung klimakterischer Beschwerden ist sie auch als Therapeutikum zum Schutz vor der postmenopausalen Osteoporose etabliert. Dabei beinhaltet das Nebenwirkungsprofil der HRT u. a. ein erhöhtes Risiko für Brustkrebserkrankungen, Myokardinfarkte oder Schlaganfälle (Dietel 2010; Mahmud 2010; Rossouw et al. 2002).

Aufgrund der teils erheblichen und unerwünschten Wirkungen der HRT ist die wissenschaftliche Erschließung pharmakologischer Alternativen - wie etwa der Phytoöstrogene - auch weiterhin von großer Bedeutung.

1.2 Epidemiologie der Osteoporose

Die Häufigkeit von pathologischen Frakturen hat eine Indikatorfunktion für epidemiologische Betrachtungen der Osteoporose. Hierbei zeigen sich weltweit interessante Inzidenzunterschiede bei der postmenopausalen Frau.

Geschlecht/Altersgruppe	Europa (Budapest)	Nordamerika	China (Peking)
Frauen im Alter 65 - 69 Jahre	193	252	91.2
Frauen im Alter 70 - 74 Jahre	288.1	437	164.1
Frauen im Alter 75 - 79 Jahre	564.8	850	141.0
Frauen im Alter 80 - 84 Jahre	709	1679	224.2

Tabelle 1.1: Jährliche Inzidenz der postmenopausalen Osteoporose auf 100.000 Einwohner in Europa, Nordamerika und Asien verdeutlicht anhand der Hüftfraktur (Lau et al. 2001; Schwartz et al. 1999).

Die Hüftfraktur tritt in fernöstlichen Ländern deutlich seltener auf als in westlichen Populationen (Oseni et al. 2008; Adzersen und Strowitzki 2003). Dabei haben nordamerikanische Frauen gegenüber chinesischen Frauen in der Postmenopause sogar ein um das 2.5- bis 7.5-fach erhöhte Risiko, eine osteoporotisch bedingte Hüftfraktur zu erleiden (Schwartz et al. 1999; Lau et al. 2001). Aktuellere epidemiologische Erhebungen waren aus der wissenschaftlichen Fachliteratur zwar nicht eruierbar, dennoch weist die niedrigere Osteoporose-Inzidenz in China auf mögliche osteoprotektive Effekte der phytoöstrogenreichen Ernährung dieses Landes hin (Ishimi 2009; Oseni et al. 2008; Adzersen

und Strowitzki 2003).

So gibt es bereits Studien, nach denen das postmenopausale Frakturrisiko der Hüfte durch eine Phytoöstrogensupplementation um bis zu einem Drittel gesenkt werden kann (Koh et al. 2009).

1.3 Fragestellung dieser Arbeit

Die Phytoöstrogene haben in den letzten Jahren vor allem mit der Frage nach therapeutischen Ansätzen diverser hormonmodulierter Erkrankungen zunehmend an wissenschaftlichem Interesse gewonnen. In der Osteoporoseforschung konnte sowohl am Tiermodell als auch am Menschen ein stabilisierender oder sogar steigender Effekt auf die postmenopausale Knochenmineraldichte gezeigt werden (Sehmisch et al. 2010a; Michelfelder 2009; Palumbo et al. 2009; Koh et al. 2009; Marini et al. 2008). Als Tiermodell für die Postmenopause steht bei der vorliegenden Arbeit die ovariectomierte Ratte zur Verfügung. Sie gilt als wissenschaftlich etabliertes Modell in der Osteoporoseforschung. (Lelovas et al. 2008; Wronski et al. 1988; Kalu 1991). In der vorliegenden Arbeit gilt es die folgenden Fragen zu beantworten:

- Kann durch die supplementierten Phytoöstrogene Equol, Daidzein, Puerarin und Quercetin eine Regression der Ovariectomie-induzierten Osteopenie bzw. Osteoporose erzielt werden?
- Welche Knochenstoffwechselveränderungen lassen sich anhand der knochenspezifischen Serumparameter verifizieren?

1.4 Phytoöstrogene

1.4.1 Definition und Klassifikation

Phytoöstrogene sind phenolische Pflanzensubstanzen, welche östrogene sowie anti-östrogene Wirkungen besitzen und damit Organ- und Stoffwechselsysteme des menschlichen Körpers modulieren (Gültekin und Yildiz 2006). Eine allgemeingültige Klassifikation unterscheidet anhand der chemischen Struktur die Flavonoide von den Nicht-Flavonoiden, welche ihrerseits nochmals weiterunterteilt werden. In der vorliegenden Arbeit zählen alle betrachteten Vertreter - bis auf das Quercetin - zu den *Isoflavonen* (siehe Abbildung 1.1).

Für die hormonmodulierenden Eigenschaften sind auf biochemischer Ebene einige östrogenähnliche Charakteristika verantwortlich (Nagata 2010; Swedenborg et al. 2009; Rishi

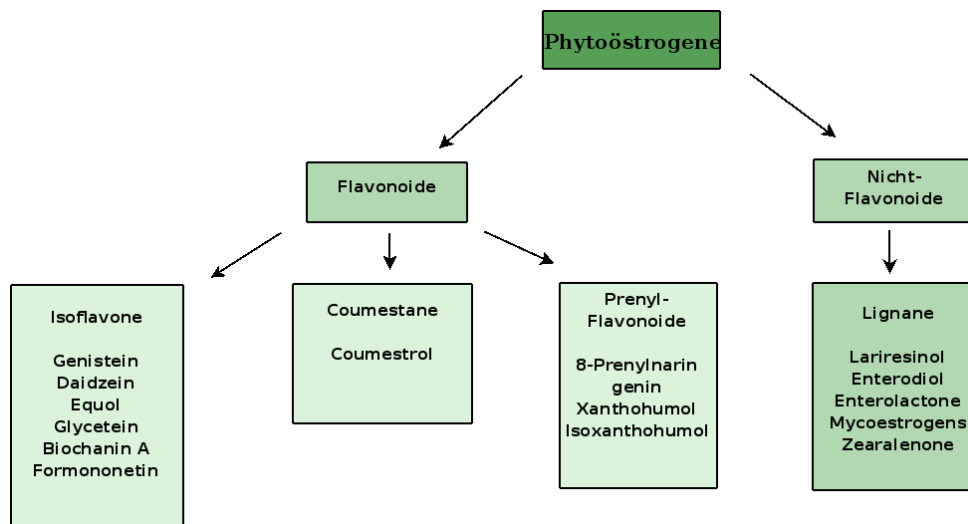


Abbildung 1.1: Klassifikation der Phytoöstrogene nach chemischen Gesichtspunkten in Flavonoide und Nicht-Flavonoide; gemäß einer Einteilung von E. Gültekin und F. Yildiz aus „Phytoestrogens in Functional Foods“, Kapitel 1, Seite 4 (Gültekin und Yildiz 2006).

2006; Gültekin und Yildiz 2006; Roudsari et al. 2005; Adzersen und Strowitzki 2003; Setchell 2001; Nagel et al. 1998; Kuiper et al. 1998). Dazu gehören:

- die *phenolische Struktur*, welche an der Rezeptorbindung beteiligt ist,
- das den Östrogenen ähnelnde Molekulargewicht,
- die östrogen-ähnliche Verteilung der Hydroxylgruppen bei den Isoflavonen.
- Phytoöstrogene binden Schlüsselenzyme der Östrogen-Synthese und wirken auf diese Weise anti-östrogen.
- Isoflavone besitzen zusätzlich anti-proliferative, pro-apoptotische, anti-oxidative, anti-inflammatorische und anti-angiogenetische Eigenschaften.
- Phytoöstrogene beeinflussen die Produktion der knochenspezifischer Serumparameter Osteocalcin, alkalische Phosphatase, β -CrossLaps.
- Einige Phytoöstrogene sind *selektive Östrogenrezeptormodulatoren* (SERM).
- Die Rezeptoraffinität gegenüber E_2 ist unterschiedlich und entspricht folgender Abfolge: $E_2 \geq \text{Equol} > \text{Daidzein} > \text{Quercetin}$.

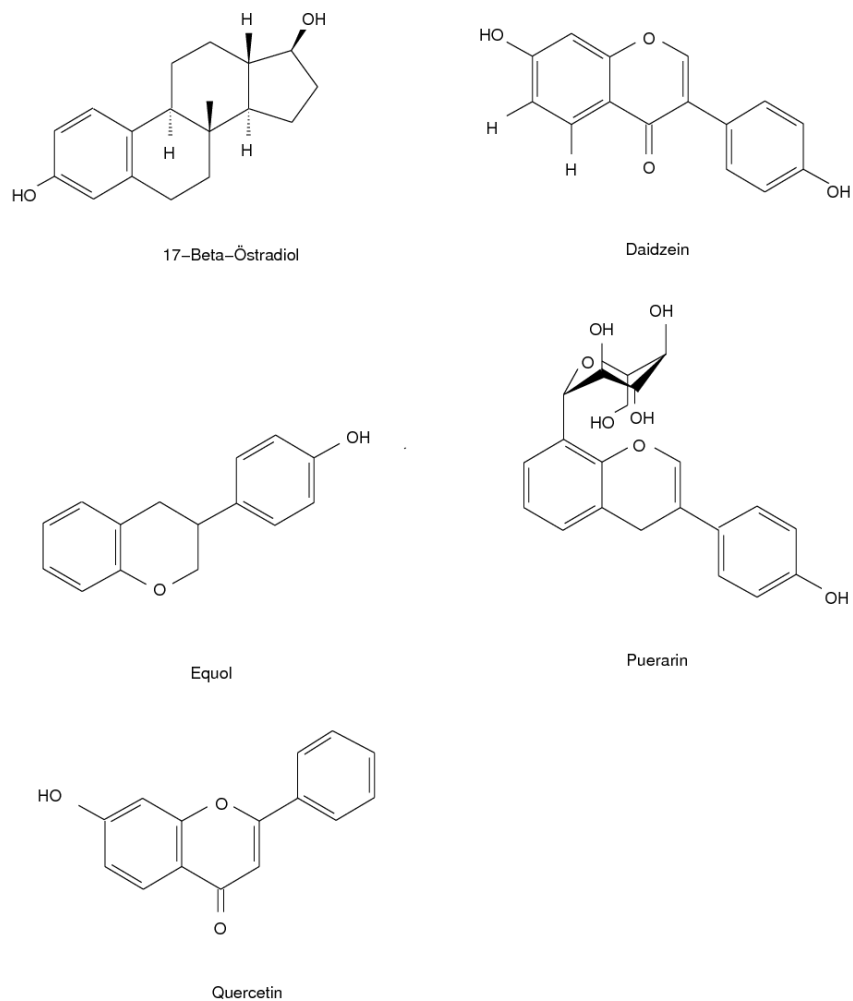


Abbildung 1.2: Übersicht über die chemische Struktur von 17- β -Östradiol und aller in dieser Arbeit untersuchten Phytoöstrogene. Charakteristisch und maßgeblich sind die phenolische Struktur sowie die Verteilung der Hydroxylgruppen.

Eine östrogene Wirkung wurde in der westlichen Literatur erstmals in den 1940er Jahren erwähnt. Der Grund waren neu aufgetretene Fertilisationsstörungen bei Schafen, welche auf deren Rotklee futter zurückgeführt wurde (Bennets et al. 1946).

Heute stützt sich das besondere Interesse der Humanmedizin auf die Effekte dieser Stoffgruppe gegenüber hormonmodulierten Erkrankungen: Beispielsweise ist die Inzidenz verschiedener Krebs- und Herz-, Kreislauf- und Gefäßerkrankungen, Adipositas sowie der Osteoporose in ost-asiatischen Populationen gegenüber den westlichen Zivilisationen vermindert (Zhang Y-B et al. 2010; Gu et al. 2009; Lye et al. 2009; Setchell 2001; Cassidy und Faughnan 2000; Watanabe et al. 1998; Adlercreutz und Mazur 1997). Die Nahrung dieser Populationen besteht zu einem hohen Anteil aus pflanzlichen Lebensmitteln mit phytoöstrogenem Ursprung. So nimmt ein Einwohner Japans täglich eine 15 bis 45-fache

Menge von Isoflavonen gegenüber einem Mitteleuropäer zu sich (Setchell 2001).

Zahlreiche tierexperimentelle sowie human-medizinische Untersuchungen wiesen auch auf die osteo-anabolen Effekte der Phytoöstrogene hin. Sie belegen eine Zunahme des Knochenanbaus sowie eine Verminderung der Knochenresorption (Legette et al. 2009; Yamaguchi 2006).

Die in dieser Arbeit untersuchten Phytoöstrogene Daidzein, Equol, Puerarin und Quercetin werden nun in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

1.4.2 Daidzein

Daidzein gehört zu den Isoflavonen und wird hauptsächlich in der Sojapflanze bzw. Sojabohne nachgewiesen (Om und Shim 2007; Yamaguchi 2006; Karahalil 2006; Lee et al. 2004; Lamartiniere et al. 2002; Zhang Ya et al. 2001) (chemische Struktur siehe Abbildung 1.2). Im Vergleich mit anderen daidzeinhaltigen Pflanzen und Lebensmitteln enthält dabei das Sojamehl den höchsten Gehalt mit 99.27 mg dieses Isoflavones pro 100 g des untersuchten Stoffes (Bhagbat et al. 1999 – 2000). Abhängig von der Verarbeitung liegt dieses Isoflavon in der nicht-fermentierten Form als das Glycosid *6-O-Acetyldaidzin* oder im fermentierten Zustand als das Aglycon Daidzin vor. Daidzein wird durch die β -Glucosidase der Darmbakterien aus Daidzin erschlossen und kann anschließend resorbiert werden. Das intestinal verbleibende Daidzein ist darüber hinaus ein Intermediärprodukt für die Synthese des Isoflavons Equol (Raimondi et al. 2009; Thawornkuno et al. 2009). Hinsichtlich seiner therapeutischen Effekte wurde Daidzein bereits vor ca. 600 Jahren in China eingesetzt (Keung und Vallee 1998; Keung et al. 1997): Damals schätzte man seine unterstützende Wirkung auf die Heilung alkoholkranker Menschen.

Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit den östrogenen Eigenschaften des Daidzeins: Seine hormon-äquivalente Potenz entspricht etwa einem Viertel des Soja-Isoflavons Genistein (Lamartiniere et al. 2002) und eine Interaktion des Daidzeins mit den Östrogenrezeptoren ist erwiesen (Naciff et al. 2004). Die Affinität von Daidzein gegenüber dem E_2 beträgt ca. 0.2 % am Östrogenrezeptor α ($ER\alpha$) sowie ca. 1 % am Östrogenrezeptor β ($ER\beta$) (Lamartiniere et al. 2002; Selvaraj et al. 2004). Innerhalb zahlreicher In-Vitro-Studien konnte die Hemmung von Human- und Tierosteoklasten über die Induktion der Apoptose, die Inhibition von Zytokinen, die Regulation des intrazellulären Kalziumstatus und über die Veränderung der Membranpolarisation nachgewiesen werden (Setchell und Lydeking-Olsen 2003). Dabei existieren Untersuchungen über die osteo-anabole Wirkung von Daidzein häufig unter der Betrachtung eines supplementierten Soja-Extraktes, welcher gleichzeitig weitere Phytoöströgene enthält.

Am ovariectomierten Rattenmodell konnte ein potenter Osteoporose-Schutz durch eine mehrwöchige Daidzein-Supplementation über das Futter erzielt werden (Om und Shim 2007; Picherit et al. 2000). In einer interessanten Studie von Mathey et al. konnte der osteoprotektive Effekt des Daidzeins noch durch die Supplementation von *Lactobacillus casei*-Bakterien verbessert werden (Mathey et al. 2007).

Darüber hinaus bestätigen zahlreiche epidemiologische Studien eine postmenopausal stabile oder erhöhte Knochenmineraldichte unter einem regelmäßigen Daidzein-haltigem Soja-Konsum (Newton et al. 2006; Setchell und Lydeking-Olsen 2003).

1.4.3 Equol

Im Jahre 1932 wurde dieses Isoflavon erstmals von Marrian und Haslewood aus dem Urin einer trächtigen Pferdestute isoliert (Marrian und Haslewood 1932) (chemische Struktur siehe Abbildung 1.2). Der Ursprung dieser Entdeckung begründet den Namen durch die Bezeichnung Equol für *pferdeartig*.

Equol entsteht auf dem Wege der intestinalen Biotransformation. Die wichtigste Nahrungsquelle hierfür sind Sojaprodukte - allen voran die Sojabohne. Sie enthalten in größeren Mengen das glykosidisch gebundene Isoflavonoid Daidzein (Yamaguchi 2006; Fujioka et al. 2004). Daidzein gilt dabei als Precursor-Isoflavon (Raimondi et al. 2009; Thawornkuno et al. 2009; Setchell et al. 2002). Erst die Abspaltung des Glucoseresestes auf dem Wege der Hydrolyse bringt eine resorbierfähige Verbindung für den Organismus hervor. Wesentlicher Bestandteil dieser Reaktion ist das Enzym β -Glucosidase der intestinalen Bakterienflora sowie der Bürstensaummembran des Darms, welche einen Teil des Daidzeins zu Equol umwandelt. Die Fähigkeit, Equol zu produzieren besitzen ca. 30 bis 50 % der Menschen (Fujioka et al. 2004; Lampe et al. 2001). Sie ist u. a. abhängig von der intestinalen mikrobiellen Flora, der Darmmotilität und nimmt mit zunehmendem Lebensalter ab (Gleason et al. 2009). Darüber hinaus wird Equol in 2 chemischen Konfigurationen - dem S-Equol und dem R-Equol - produziert, welche beide das Gonadal-Endokrinium beeinflussen (Setchell et al. 2009a). Im Serum wird Equol über die Bindung an das **sex hormone binding globulin** (SHBG) transportiert. Untersuchungen von Nagel et al. zur Folge liegt Equol dabei zu ca. 50 % in der freien Form im Serum vor. Damit übersteigt es erheblich den freien Anteil von E_2 , der bei 4.6 % liegt (Nagel et al. 1998). Hinsichtlich seiner Effekte konnte für Equol eine östrogene Wirkung auf das Uterusgewicht nachgewiesen werden, was eine Interaktion mit $ER\alpha$ nahelegt (Rachón et al. 2007c; Setchell et al. 2002). Eine Stimulation über $ER\beta$ ist für das Enantiomer S-Equol bereits bekannt (Setchell et al. 2009b; Keiko et al. 2001).

Equol wurde auch mit der Frage nach anti-osteoporotischen Effekten am Kleintiermodell untersucht: Dabei konnten u. a. nach Tezval et al., Sehmisch et al. und Rachoń et al. der charakteristische ovariectomie-induzierte Knochenmineraldichte-Verlustes bei den Osteoporose-Modellen Maus und Ratte signifikant aufgehalten werden (Tezval et al. 2010; Sehmisch et al. 2010b, a; Rachoń et al. 2007a; Legette et al. 2009; Fujioka et al. 2004). Weitere Wissenschaftler postulieren einen begünstigenden Effekt von Equol auf die Knochenmineralisation (Weaver und Legette 2010; Legette et al. 2009).

Es gibt einige klinische Interventionsstudien über die knochenspezifischen Effekte bei der postmenopausale Frau. So konnten beispielsweise Wu et al. einen signifikanten osteoanabolen Effekt auf die Knochenmineraldichte im Bereich des Hüftknochens nachweisen. Gleichzeitig ist dieser Benefit an die Fähigkeit zur Equol-Produktion gebunden (Wu et al. 2007).

1.4.4 Puerarin

Erste Aufzeichnungen über das Isoflavon Puerarin existierten bereits vor 3000 Jahren (Keung 2002) (chemische Struktur siehe Abbildung 1.2). Es wird aus der Kudzu-Pflanze (*Pueraria lobata Willd. Ohwi*) gewonnen, deren natürliches Habitat sich in Südostasien befindet. Von Interesse ist ihr isoflavonhaltiger Blätter- und Wurzelextrakt, welcher zu etwa 90 % Puerarin sowie in niedriger Konzentration eine Reihe weiterer Phytoöstrogene enthält (Daidzein, Genistein, Rutin oder Biochanin A) (Benlhabib et al. 2002, 2004).

Die chemische Struktur von Puerarin beinhaltet die isoflavon-typische Grundstruktur. In der chinesisch-medizinischen Literatur wurde der Kudzu-Extrakt zur Behandlung kardio- und cerebrovaskulärer Erkrankungen erwähnt und findet darüber hinaus Anwendung in der therapeutischen Begleitung des Alkoholabusus (Keung 2002; Benlhabib et al. 2004). Eine Untersuchung über das pharmakokinetische Profil von oral aufgenommenem Puerarin zeigt beim Menschen eine rasche intestinale Resorption. Dabei wird die höchste Serumkonzentration nach zwei Stunden erreicht und die Plasmahalbwertszeit beträgt 4.3 Stunden (Penetar et al. 2006). An dieser Stelle fand auch die Metabolisierung im Rattenorganismus Erwähnung, wo Puerarin zu seinem Metaboliten Daidzein und dann weiter zu Equol dekonjugiert wird, welches im Rattenurin nachgewiesen werden kann (Penetar et al. 2006).

Einige Studien beschäftigten sich mit dem Einfluss von Puerarin auf den postmenopausalen Stoffwechsel sowie auf hormonsensitive Organe. So belegten Rachoń et al. einen uterotrophen Effekt von Puerarin an der ovariectomierten Ratte (Rachoń et al. 2007b). Der Einfluss auf den Knochenstoffwechsel wurde tierexperimentell durch Wang untersucht:

In dieser Studie wurde ovariectomierten Mäusen 4 Wochen lang *Puerariae radix* supplementiert. Die histologischen Ergebnisse der Femurmetaphyse zeigten dosisselektiert teilweise eine vollständige Erhaltung der ursprünglichen trabekulären Knochenmineraldichte (Wang et al. 2003). In einer in-vitro-Untersuchung von Zang et al. konnte eine Stimulation der Osteoblastenproliferation und eine erhöhte Aktivität der alkalischen Phosphatase im Rattenschädelknochen nachgewiesen werden (Zang et al. 2005).

1.4.5 Quercetin

Quercetin wurde erstmals 1858 in der Literatur erwähnt (Rochleder 1858) (chemische Struktur siehe Abbildung 1.2). Dahinter verbirgt sich ein Flavonoid, welches zunächst als Pflanzenfarbstoff unter dem Namen Quercitrin bekannt wurde. Damals wurde es als Rindenbestandteil der amerikanischen Eiche *Quercus tinctoria* selektiert.

Quercetin liegt in Pflanzengewebe glykosidisch gebunden vor. Als Beispiel ist die Gemüsezwiebel zu erwähnen, deren Fruchtschale Quercetin in Form des Glykons *Spiraeosid* (Quercetin-4'-O-Glykosid) enthält (Starke und Herrmann 1976). So erreicht Quercetin nach der oralen Aufnahme die höchste Plasmakonzentration nach zwei Stunden und wird später im Intestinum zum Aglykon Quercetin verstoffwechselt. Die Art und chemische Konfiguration der Zuckerkomponente scheint dabei einen Einfluss auf die enterale Resorption sowie seine intestinale Metabolisierung auszuüben (Gräfe und Veit 1999). Die systemische Verfügbarkeit sowie sein pharmakologisches Profil wird wesentlich von der Darreichungsform des Quercetins mitbeeinflusst. Die westliche Ernährungsweise erlaubt eine durchschnittliche Quercetinaufnahme von circa 16 mg pro Tag (van der Woude et al. 2005).

Quercetin sowie seinen Metaboliten werden antioxidative Eigenschaften zugeschrieben (Gräfe und Veit 1999). Dazu gehört auch die Fähigkeit, Eisen-Ionen in Chelatkomplexe einzubinden, wodurch die antioxidative Wirkung weiter erhöht wird (Morel et al. 1993). Beim heutigen Stand der Forschung gibt es weiterhin Anhaltspunkte dafür, dass Quercetin auch antikarzinogene Wirkungen hervorbringt (Cruz-Correa et al. 2006).

Im Hinblick auf das östrogene Wirkungsspektrum von Quercetin zeigen wissenschaftliche Studien unterschiedliche Ergebnisse: So konnte eine Interaktion mit den Östrogenrezeptoren spezifischer Karzinomzellen der Mamma und des Colons (MCF7-Zellen und T47D-Zellen) nachgewiesen werden (van der Woude et al. 2005). Dabei zeigte Quercetin eine höhere Affinität zu ER β als zu ER α (van der Woude et al. 2005).

Die Erforschung der Wirkung von Quercetin auf das Knochengewebe beschränkt sich aktuell auf wenige Studien. Eine in-vitro-Untersuchung zeigte eine gesteigerte Aktivität

der osteoblastären Alkalischen Phosphatase, welche u.a. über die Östrogenrezeptoren reguliert wird (Prouillet et al. 2004). In einer anderen tierexperimentellen Studie konnte eine Inhibition der Differenzierung von Mäuse-Osteoklasten gezeigt werden (Woo et al. 2004). Darüber hinaus fördert Quercetin auf chemischer Ebene eine Deaktivierung reifer Osteoklasten (Woo et al. 2004).

1.5 Knochengewebe, Struktur und Umbauvorgänge

Das Knochengewebe zählt zu den härtesten Geweben des Organismus. Mit diesem Merkmal erfüllt es maßgeblich Schutz- und Stützfunktionen für den Organismus. Darüber hinaus ist das Knochengewebe auch an der Mineralstoffhomöostase und der Hämatopoese beteiligt (Morgan et al. 2008). Die örtliche Funktion entscheidet dabei über die Knochenarchitektur und ihre äußere Form. Die Struktur eines Röhrenknochens lässt sich einerseits in funktionelle Ebenen einteilen oder andererseits nach dessen Dichte- und Beschaffenheit. An Röhrenknochen unterscheidet man anatomisch (siehe dazu auch Abbildung 1.3):

- Die gelenkig kommunizierende *Epiphyse* an den Enden eines Röhrenknochens.
- Die *Diaphyse* in Form des zentralen Knochenschaftes beinhaltet die Markhöhle.
- Die *Metaphyse* verbindet proximal und distal Epiphyse und Diaphyse. Sie beinhaltet während Kindheit und Adoleszenz die für das Knochenwachstum bedeutsame Epiphysenfuge.

Im Sagittalschnitt unterscheidet man die folgenden Strukturen (Clarke 2008):

- *Substantia corticalis* bzw. *compacta*; sie stellt ca. 80 % des gesamten skeletalen Knochenvolumens und erscheint makroskopisch als feste Hüllschicht.
- *Substantia spongiosa* bzw. *trabecularis*; sie präsentiert sich als der innere, locker verbundene Knochen mit einer schwammartigen Struktur und macht ca. 20 % des gesamten Knochenvolumens aus.

Die Substantia corticalis erfüllt vor allem eine Schutzfunktion und schafft die Grundlage für die ansetzenden Muskelsehnen. Sie organisiert sich in Einheiten – den sogenannten Osteonen. Ein Osteon beinhaltet einen in Knochenwuchsrichtung ausgerichteten Zentralkanal, welcher Blutgefäße und Nerven führt. Ausgehend von den Zentralkanälen erfolgt ein stetiger Umbau der Substantia corticalis. Darüberhinaus kommunizieren die Osteone transversal über Volkmann-Kanäle. Die innerossäre Struktur entwickelt sich bereits embryonal.

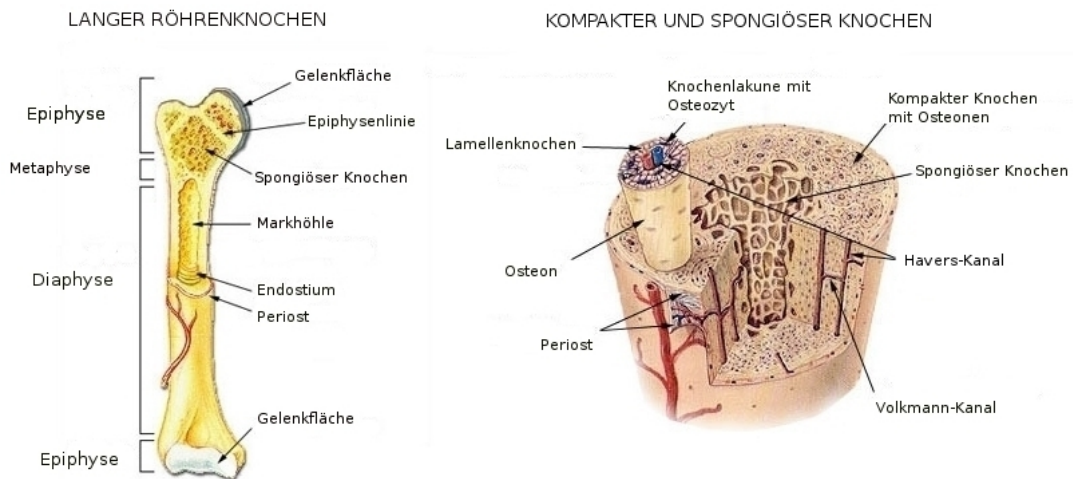


Abbildung 1.3: Strukturschema eines langen Röhrenknochens mit Darstellung der typischen Strukturebenen: Epiphyse, Metaphyse, Diaphyse sowie einem Sagittalschnitt (NIH, abgerufen unter URL: <http://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/tissue.html> am 31. Juli 2010).

Die Substantia spongiosa hat keinen Kontakt zur Knochenoberfläche und kann nur in den innerossären Anteilen gefunden werden. Sie ist für die Stabilität des Knochens gegenüber Druck, Hebelkräften und Torsionsbelastungen verantwortlich. Dazu unterliegt sie einem stetigen Umbau. Diese beiden Kompartimente kann man anhand ihrer Dichte unterscheiden.

Die Festigkeit des Knochens resultiert aus seiner Zusammensetzung aus ca. 60 % mineralisierter Substanz, ca. 30 % nicht-mineralisierter organischer Matrix, ca. 8 bis 10 % Wasser und ca. 3 % Lipiden (Morgan et al. 2008; Clarke 2008; Gong et al. 1964). Die organische Matrix besteht aus Typ-I-Kollagen-Fasern. Auf molekularer Ebene handelt es sich dabei um Polypeptidtripelhelices, welche über Wasserstoffbrücken zu Fibrillen vereinigt sind. Innerhalb dieses Kollagenverbundes lassen sich diverse stoffwechselrelevante Proteine - darunter Osteocalcin, Osteonectin und Osteoprotegerin - nachweisen (Morgan et al. 2008). Die anorganische Substanz besteht hauptsächlich aus Hydroxylapatit - einer Calcium-Phosphat-Verbindung. Es bestehen zeitlebens strukturelle Umbauvorgänge. Diese werden durch ein ausgewogenes Zusammenspiel von Resorptions- und Aufbauvorgängen gewährleistet. Auf diesem Wege reagiert das Knochengewebe u.a. auf mechanische Belastungsreize (Frost 1992).

Am Stoffwechsel des Knochengewebes sind drei verschiedene Zellreihen beteiligt, welche in den nächsten Abschnitten kurz vorgestellt werden sollen.

1.5.1 Osteoblasten

Die Osteoblasten sind während des skeletalen Wachstums oder bei Frakturheilung für die Neubildung von organischer Knochensubstanz verantwortlich. Diese Zelllinie ist mesenchymalen Ursprungs (Lian und Stein 2008). Ihre Expression und Differenzierung bis hin zum adulten Osteoblasten wird durch Kaskaden von Signalstoffen reguliert (Lian und Stein 2008). Der adulte Osteoblast sezerniert kollagene und nicht-kollagene Proteine für die extrazelluläre Matrix (Morgan et al. 2008), welche eine netzartige Struktur und damit die Grundlage für die spätere Mineralisierung ausbildet (Lian und Stein 2008).

Histologisch lassen sich die Osteoblasten an ossären Oberflächen nachweisen, von wo aus sie neue extrazelluläre Matrix anlagern und sich teils selbst dabei in den neu entstandenen Knochen einschließen (Lian und Stein 2008). Speziell aus diesen im Osteoid einzeln selektierten Osteoblasten gehen später die Osteozyten hervor (Lian und Stein 2008; Manolagas 2000). Dieser Vorgang wird u. a. durch hormonelle Einflüsse determiniert.

Die Interaktion von Osteoblasten und Östrogen erfolgt über die exprimierten Östrogenhormonrezeptoren $ER\alpha$ und $ER\beta$ (Manolagas 2000). Das Hormon stimuliert dabei die Genese und verlängert die Lebenszeit der Osteoblasten, in dem es transkriptionsrelevante Apoptosesignale inhibiert (Bradford et al. 2010). Schließlich beeinflussen sich Osteoblasten und Osteoklasten gegenseitig in ihrer Proliferation und Differenzierung.

1.5.2 Osteoklasten

Bei den Osteoklasten handelt es sich um multi-nukleäre Zellen monozytären Ursprungs (Blair et al. 2008; Clarke 2008). Die Aufgabe der Osteoklasten ist der Abbau von mineralisierter Knochensubstanz. Dazu binden sie an der ossären Matrix (Clarke 2008). Ihr morphologisches Charakteristikum ist ihre fingerförmig gestülpte Zellmembran, welches aus diesem Grund auch als **ruffled border** bezeichnet wird (Manolagas 2000). Daneben besitzen sie die **clear zone**, welche die osteoklastäre Aktivität auf eine bestimmte Lokalisation begrenzt (Manolagas 2000). Für die Resorption von extrazellulärer Matrix sezernieren sie Wasserstoff-Ionen und Cathepsin K entlang den **ruffled borders**. Auf diese Weise werden mineralisierter Knochen und die kollagenen Proteine aufgelöst (Clarke 2008). Es entstehen mikroskopisch erkennbare Resorptionszonen, welche als Howship-Lakunen bezeichnet werden.

An der Rekrutierung und Differenzierung von Osteoklasten sind eine Reihe von Zytokinen sowie verschiedene Rezeptoren beteiligt (Morgan et al. 2008). Diese Vorgänge können aber u. a. durch das osteoblastär produzierte Osteoprotegerin (OPG) inhibiert werden (Clarke 2008).

Auch die Osteoklasten werden durch das Endokrinium reguliert, da sie $ER\alpha$ exprimieren (Imai et al. 2009). Östrogen reguliert die Osteoklastendifferenzierung sowie ihre Aktivität herab. Darüber hinaus modifiziert es die Lebenszeitspanne der Osteoklasten, indem es die Apoptoseprogramme zu aktivieren vermag (Imai et al. 2009; Riggs et al. 2002). Auf diese Weise wird die Knochenresorption in Gegenwart von Östrogen reduziert. Am Rande sei zu erwähnen, dass das Aktivitätsausmaß der Osteoklasten dem Stimulationsgrad der Osteozyten folgt, welche wiederum mechanischen als auch endokrinen Reizen unterliegen (Frost et al. 2002; Manolagas 2000).

1.5.3 Osteozyten

Die Osteozyten differenzieren sich aufgrund bestimmter Signalstoffe aus den Osteoblasten. Sie sind die am längsten überdauernden Knochenzellen und werden bis zu 25 Jahre alt (Morgan et al. 2008). Sie liegen in einer Lakune, sind von extrazellulärer Matrix umschlossen und kommen im Knochengewebe 10 mal so häufig vor wie Osteoblasten (Manolagas 2000). Charakteristisch sind ihre langen Zellfortsätze. Über **Gap junctions** bilden sie damit eine Art Kommunikationsnetzwerk aus und stehen auf diese Weise mit zirkulierenden Zellen oder dem Knochenmark in Verbindung (Clarke 2008; Manolagas 2000). Im Knochengewebe fungieren sie als Mechanosensoren und stimulieren kraft-adaptiert den Knochenumsatz und -zuwachs (Manolagas 2000; Frost 1992). Bislang konnte die Art und Weise der Signaltransduktion nur teilweise wissenschaftlich erschlossen werden. Wie Piekarski et al. erstmals entdeckten, wird die Sensibilität gegenüber mechanischer Belastung mittels eines interstitiellen Flüssigkeitsstromes vermittelt (Fritton und Weinbaum 2009; Manolagas 2000; Piekarski und Munro 1977). Zu diesem Thema gibt es eine Vielzahl an Publikationen mit unterschiedlichen Hypothesen über das sogenannte **fluid-flow modell** (Fritton und Weinbaum 2009). Die physikalische Stimulation des Osteozyten reguliert dabei gleichzeitig seine Lebenszeitspanne. Ein mechanisch nicht stimulierter Osteozyt fließt in die Apoptose ein (Aguirre et al. 2007). Osteozyten regulieren auch das Remodeling (den Knochenumbau, siehe Abschnitt 1.5.4) über diesen Flüssigkeitsstrom und interagieren so mit den Osteoblasten (Clarke 2008). So hat die Stimulation eines Osteozyten seinerseits einen vermehrten Anbau neuer extrazellulärer Matrix zur Folge (Manolagas 2000). Die Osteozyten sind auch in einer Interaktion mit dem Endokrinium eingebunden, in dem sie $ER\alpha$ und $ER\beta$ exprimieren (Komm et al. 2008; Aguirre et al. 2007). Die postmenopausale Östrogendefizienz aktiviert dabei das Apoptoseprogramm der Osteozyten (Manolagas 2000).

1.5.4 Modeling, Remodeling und Knochenqualität

In wissenschaftlichen Erläuterungen über den Knochenstoffwechsel wird man wiederholt auf die Begriffe **Modeling**, **Remodeling** und **bone mineral units** (BMU) aufmerksam gemacht, welche im Folgenden kurz erklärt werden sollen:

- **Modeling** passt die Gestalt eines Knochens seiner mechanischen Belastung an. Die einwirkenden Kräfte entscheiden über das Maß von Anbau oder Abbau der Knochensubstanz. Diese Vorgänge werden durch Osteoblasten und Osteoklasten realisiert und finden an endostalen und periostalen Oberflächen statt. Wissenschaftlich bestätigt ist eine vermehrte Stimulation des Modelings in der Adoleszenz und bei einem Hypoparathyreoidismus (Lelovas et al. 2008; Clarke 2008).
- **Remodeling** dient der Erhaltung der ossären Festigkeit und ist in die Kalzium-Homöostase eingebunden. Es wird endostal Knochenmatrix resorbiert und der daraus entstandene Defekt erneut mit kollagenem Gewebe gefüllt und anschließend mineralisiert. Am Remodeling sind ebenfalls Osteoblasten und Osteoklasten beteiligt. Die Vorgänge laufen endostal oder entlang des Havers-Kanalsystems ab und sind in einem gesunden, erwachsenen Skelettsystem gegeneinander ausgeglichen. Postmenopausal kommt es zu einer vermehrten Stimulation des Remodelings mit dominierender Aktivität der Osteoklasten und damit einhergehendem Knochenstoffverlust (Clarke 2008; Riggs et al. 2002).
- **bone mineral units** (BMU) sind funktionelle sowie metabolische Einheiten von Osteoblasten und Osteoklasten, welche das Remodeling realisieren. Ein Zyklus beginnt mit der osteoklastären Resorption, welcher ca. 2 Wochen beansprucht. Erst nach der Apoptose der Osteoklasten wandern über umliegende Blutgefäße Osteoblastenvorläuferzellen ein, welche die Lakune mit Osteoid verschließen (Morgan et al. 2008; Riggs et al. 2002).

Die BMUs durchlaufen ständig Perioden der aktiven Knochenresorption, des Wiederaufbaus und einer anschließenden Ruhephase. Unter physiologischen Bedingungen bleibt die Knochenmasse unter diesen Umbauvorgängen dennoch annähernd konstant (Morgan et al. 2008). Darüber hinaus existiert eine genetisch determinierte Reizschwelle, anhand derer die ortsständigen Mechanosensoren - der Osteozyten - eine Anpassung an die einwirkende Kraft signalisieren (Frost et al. 2002; Marotti 2000). Dabei stehen die Mechanosensoren unter dem Einfluss körpereigener oder pharmakologisch verabreichter Botenstoffe. Ein Mangel an Östrogen oder Androgen bewirkt dabei eine Anhebung der Reizschwelle

und hat eine Zunahme des Remodeling zur Folge (Frost et al. 2002). Dies führt über einen längeren Zeitraum schließlich zu einer Rarifizierung der ossären Mikroarchitektur.

Die Beschaffenheit des Knochengewebes wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Diese lassen sich in endokrine, pharmakologisch induzierte sowie biomechanische Einflüsse unterscheiden und werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

1.6 Endokrine und biomechanische Effekte auf den Knochen

1.6.1 Der Einfluss des Hormons Östrogen

Die Östrogene bewirken verschiedene Effekte innerhalb des ausgewachsenen Knochens. Während der Geschlechtsreife balancieren die Östrogene die resorbierenden und die proliferierenden Effekte auf die BMUs gegeneinander aus. Die Lebenszeitspanne der Knochenzellen ist in dieser Phase des Lebens nahezu konstant. Dabei steuern die Östrogene die Proliferation, die Aktivität und den Zeitpunkt der Apoptose in den beiden Zelllinien. Hughes et al. konnten 1996 aufzeigen, dass die Apoptose von Mäuse-Osteoklasten unter dem Einfluss von 17β -Östradiol sowohl in vitro als auch in vivo gesteigert ist (Hughes et al. 1996). Hingegen wird die Genese und die Aktivität von Osteoblasten unter östrogenen Einwirkungen gesteigert (Majeska et al. 1994; Qu et al. 1998). In einem normalentwickelten, gesunden Organismus führen diese Mechanismen zur Erhaltung der Knochenmineraldichte auf einem konstant hohen Niveau. Die beteiligten Komponenten, welche die Knochenmineraldichte beeinflussen, sind das Östrogen und seine korrespondierenden Rezeptoren im Knochengewebe. Vor der Menopause sind die Ovarien Hauptproduktionsort der Östrogene. Dabei setzen sie zu 95 % das 17β -Östradiol (E_2) und zu 5 % Östron (E_1) frei (Riggs et al. 2002), welche über das **sex hormone binding globulin** (SHBG) im Serum transportiert werden. Postmenopausal erfolgt die Östrogenbiosynthese durch die extragonadalen Produktionsgewebe wie Nebennierenrinde sowie durch das Fett- und Muskelgewebe (Riggs et al. 2002). Dennoch erreicht die absolute Östrogenproduktion dann nur noch einen geringen Anteil der prä-menopausalen effektiven Hormonausschüttung.

1.6.2 Östrogenrezeptoren

Die Östrogenrezeptoren gehören zu den nukleären, ligandeninduzierten Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription bestimmter Gene vermitteln. In den 1980 er Jahren gelang erstmals die Klonierung eines Östrogenrezeptors (Gorski et al. 1984). Schließlich gelang es

Kuiper et al. 1996, einen weiteren östrogenen Hormonrezeptor aus der Prostata von Ratten zu isolieren (Kuiper et al. 1996). Seither unterscheidet man bei den Östrogenrezeptoren die Subtypen $ER\alpha$ und $ER\beta$. Die physiologischen Liganden der Östrogenrezeptoren sind die Östrogene. Sie agieren als Agonisten an den Rezeptorsubtypen $ER\alpha$ und $ER\beta$.

Östrogenrezeptoren im Knochengewebe

Im Knochengewebe sind beide Östrogenrezeptorsubtypen in allen Gewebezellen eruierbar (Riggs et al. 2002). Allerdings zeigen unterschiedliche Kompartimente charakteristische Verteilungsmuster der Rezeptoren:

- In der Substantia corticalis ist $ER\alpha$ der dominierende Rezeptorsubtyp (Syed et al. 2005; Riggs et al. 2002).
- In der Substantia spongiosa sind $ER\alpha$ und $ER\beta$ nachweisbar, wobei einige Wissenschaftler hier von einer Dominanz des $ER\beta$ ausgehen (Syed et al. 2005; Riggs et al. 2002).

1.6.3 Die biomechanischen Einflüsse auf den Knochen

Die Wissenschaftler Wolff und Frost leisteten die bedeutendsten Beiträge zum Verständnis der *Mechanostat-Theorie des Knochengewebes* (Wolff 1986; Frost 1992). So stellte Frost Vermutungen über Mechanosensoren im Knochengewebe auf, welche als Synchronisationsstelle zwischen den einwirkenden Muskelkräften und der dazu äquivalenten Knochenmineraldichte fungieren (Frost 1992). Die Osteozyten sind die wissenschaftlich bestätigten Repräsentanten dieser Mechanosensoren. Diese Zellen sind von einer minder-mineralisierten Knochenmatrix umgeben, welche die Intensität des einwirkenden Kraftimpulses modifiziert (Nicoletta et al. 2008). Dieser Knochenanteil wird auch als *elastisches Modul* bezeichnet (Nicoletta et al. 2008). Die weitere Signaltransduktion ist noch nicht vollständig wissenschaftlich erschlossen. Bislang ist bekannt, dass die Kraftimpulse u. a. durch Adhäsionsproteine wie Integrin auf den Osteozyten übertragen werden, um dort anti-apoptotische Effekte auszulösen (Aguirre et al. 2007).

Es gibt Hypothesen über die Wirkung der Gonadalhormone auf die Osteozyten: Bereits Frost vermutete einen Einfluss des Östrogens auf die Sensibilität der Mechanosensoren. Demnach bewirkt ein Östrogenmangel eine Erhöhung der Reizschwelle dieser Sinneszellen. Die Mechanosensoren senden dann vermindert Stimulationsimpulse für den Knochengewebe-Anbau aus. In der Folge kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Modeling- und Remodelingvorgängen zugunsten eines Knochenmineralmasse-Verlustes.

Dieser Mechanismus hilft den postmenopausalen Knochenmasseverlust zu erklären (Riggs et al. 2002). An ovariectomierten Ratten (OVX) konnte gezeigt werden, dass sich der Volumenanteil der peri-osteozytären elastischen Module um ca. 35 % vergrößert, wenn der Östrogenspiegel absinkt. Dadurch wird der auf den Osteozyten einwirkende Kraftimpuls abgeschwächt (Nicolella et al. 2008).

1.7 Die Postmenopausale Osteoporose

1.7.1 Osteoporose Typ I bzw. postmenopausale Osteoporose

In der Perimenopause beginnt die Involution der Ovarien. Das Organstroma stellt zu dieser Zeit die Östradiolproduktion sukzessive ein, so dass der Östradiolserumspiegel stark absinkt. Im Knochengewebe der Frau kommt es zu Veränderungen der ossären **Modeling-Remodeling-Balance**.

Dabei führt das E₂-Defizit der Postmenopause zu einer (Riggs et al. 2002; Manolagas 2000):

- Stimulation der Osteoblastogenese und verkürzten Lebenszeitspanne der Osteoblasten,
- Stimulation der Osteoklastogenese und verlängerten Lebenszeit der Osteoklasten,
- verkürzten Lebenszeit der Osteozyten und einer
- verminderten Sensitivität der Osteozyten gegenüber biomechanischer Belastung.

Typisch für diese frühe Phase des Knochenmineraldichte-Verlustes ist ein vornehmlich spongiöser Substanzverlust. Es kommt zu einem intensivierten Remodeling, da die östrogenen Apoptosesignale fehlen. Zusätzlich nimmt die Sensitivität der Osteozyten gegenüber mechanisch einwirkenden Kraftimpulsen ab (Riggs et al. 2002; Manolagas 2000). Röntgen-morphologisch bewirkt dies eine zunehmende Rarifizierung des spongiösen Knochens und gipfelt in einer erhöhten Frakturanfälligkeit. Die Osteoporose Typ I betrifft häufig zunächst das Wirbelsäulen- und Achsenskelett, aber auch den Unterarm (Riggs et al. 1998). Charakteristisch sind Kompressionsfrakturen innerhalb der Wirbelsäule, Schenkelhalsfrakturen oder handgelenksnahe Unterarmfrakturen. Bei Patienten mit diesem Erkrankungsmuster bestätigt sich dann zu einem hohen Prozentsatz eine starke Erniedrigung der Knochenmineraldichte (Häussler et al. 2006; Riggs et al. 1998).

1.7.2 Osteoporose Typ II

Die späte Phase des Knochenmineraldichte-Verlustes (Osteoporose Typ II) ist Ausdruck eines sekundären Hyperparathyreoidismus. Aufgrund einer gestörten extraskelatalen Kalzium-Homöostase wird das Remodeling zusätzlich stimuliert (Riggs et al. 2002). Die Osteoporose Typ II findet lediglich Erwähnung, da sie thematisch nicht Gegenstand dieser Arbeit ist.

1.7.3 Die konventionell etablierte pharmakologische Therapie bei Osteoporose

Die medikamentöse Osteoporose-Therapie hat vorwiegend einen prophylaktischen Charakter, dient der Schmerzreduktion sowie der Verminderung des Frakturrisikos. Für die medikamentöse Therapie stehen der osteotrope und der osteoanabole Wirkungsansatz zur Verfügung. Nachfolgend werden für diese Arbeit relevante Vertreter vorgestellt:

- 17β -Östradiol ist Bestandteil der **hormone replacement therapy (HRT)**. Es beeinflusst das Remodeling, indem es die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten reduziert und damit den postmenopausalen Knochenmineraldichteverlust vermindert (Lindsay und Cosman 2008; Seidlová-Wuttke et al. 2008). Die Hormonersatztherapie ist jedoch auch mit einem erhöhten Risiko von thromboembolischen Erkrankungen, Insulten sowie Mamma-Karzinomen verbunden (McGowan und Stefanick 2008).
- Selektive Östrogen Rezeptor-Modulatoren (SERM) wie Tamoxifen oder Raloxifen zeigen Gewebe-selektiv östrogenagonistische sowie -antagonistische Wirkungen und wirken am Knochen Östrogen-äquivalent (Lindsay und Cosman 2008). Sie ermöglichen einen signifikanten Anstieg der Knochenmineraldichte, sind jedoch ebenfalls mit einem erhöhten Tumorrisiko assoziiert (McGowan und Stefanick 2008; Lindsay und Cosman 2008).
- Bisphosphonate wie Alendronat, Risedronat oder Ibandronat interagieren mit den aktiven Resorptionszonen des Knochens. Sie werden von Osteoklasten phagozytiert und induzieren deren Apoptose (Lindsay und Cosman 2008; Miller 2008). Dazu inhibieren Sie den ATP-Stoffwechsel der Osteoklasten. Auf diese Weise wird die Knochenumbaurate sowie der Knochenmasseverlust reduziert.
- Phytoöstrogene besitzen ein osteo-anaboles Wirkungsprinzip und sind Gegenstand der Osteoporoseforschung.

1.8 Die ovariectomierte Ratte als Osteoporose-Tiermodell

Die Etablierung der Ratte als Tiermodell für die Osteoporoseforschung geht auf Definitionen von Kalu zurück: Demnach gilt es, ein lebendes Tier zu untersuchen, bei welchem infolge eines ovariellen Hormondefizits ein spontaner oder induzierter Knochenmasseverlust messbar ist (Kalu 1991). Dieses Tiermodell sollte dabei eine Vergleichbarkeit zur postmenopausalen Osteoporose gewährleisten (Kalu 1991).

Die Ovariectomie-induzierte, osteopene Entwicklung des Rattenskeletts konnte in den 1980er Jahren wissenschaftlich gesichert werden (Wronski et al. 1988, 1989; Dempster et al. 1995). Seither fand sie Bestätigung in zahlreichen Studien an der ovariectomierten Ratte (Tezval et al. 2010; Sehmisch et al. 2010b; Rachoń et al. 2007a; Seidlová-Wuttke et al. 2003). Dennoch sind hier Studienergebnisse des Östrogen-defizienten Knochenmineraldichteverlustes bei der Ratte nur eingeschränkt untereinander vergleichbar. Gründe hierfür sind in der Physiologie der Tiere, dem Ovariectomiezeitpunkt und den Versuchstechniken zu suchen (Lelovas et al. 2008; Kalu 1991).

1.8.1 Vorteile der OVX-Ratte

Wronski studierte als einer der ersten Wissenschaftler die ossäre Entwicklung bei Ratten, welche zum Zeitpunkt der Ovariectomie (OVX) 3 Monate alt waren. Er stellte biphasische, morphologische Veränderungen vor allem in der Metaphyse der proximalen Tibia fest (Wronski et al. 1988). Er verdeutlichte erste Verluste der Knochenmineraldichte in der Substantia spongiosa bereits 2 Wochen post-OVX. Daraus errechnete er einen schnellen Verlust von spongiosen Knochen von etwa 0.82 % pro Tag. Histomorphologisch nachweisbar geht diese mit einer vermehrten Stimulation von Osteoblasten und Osteoklasten einher. Daran schließt sich eine Periode des langsamen spongiosen Knochensubstanzverlustes an, der ca. 0.08 % pro Tag beträgt (Wronski et al. 1988). Dieser Verlauf aus anfänglich zügiger, später verlangsamter Knochenmineraldichte-Reduktion wird auch bei der postmenopausalen Frau beobachtet (Raisz 2005). In der Serundiagnostik können sowohl in der Humanmedizin als auch bei der OVX-Ratte Anzeichen vermehrt stimulierter Modeling- und Remodelingvorgänge nachgewiesen werden. So sind auch bei der OVX-Ratte die Surrogatparameter Osteocalcin-Spiegel und β -CrossLaps-Spiegel im Serum erhöht (Rissanen et al. 2008; Ikeda et al. 1993; Kalu 1991).

Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass auch die OVX-Ratte einen Zuwachs des Körpergewichtes entwickelt (Hanstein 2007; van Seumeren 2000). Dies hängt mit der Bedeutung der Östrogene für die Energiehomöostase und für die Initiierung des Hungergefühls zusammen (Bernstein 2007). Die entscheidenden Mechanismen werden scheinbar

sowohl bei der postmenopausalen Frau als auch bei der OVX-Ratte durch den Östrogenmangel ausgelöst, wodurch eine Gewichtszunahme begünstigt wird. Darauf aufbauend wurde die postmenopausale Gewichtszunahme in mehreren Studien bezüglich ihrer knochenprotektiven Aspekte untersucht und interpretiert.

1.8.2 Nachteile der OVX-Ratte

Das Skelettwachstum der laborisierten Ratten endet erst im Lebensalter von ca. 15. Monaten, so dass bis dahin eine offene Epiphysenfuge nachgewiesen werden kann (Lelovas et al. 2008). Dadurch kommt es auch bei Jung-OVX-Ratten zu einem erhöhten Modeling und begünstigt so den weiteren Anstieg der Knochenmineraldichte (Francisco et al. 2011; Lelovas et al. 2008). Ein anderer Kritikpunkt ist die Verteilung des intensivierten Remodelings im Rattenskelett. Demnach sind die Lokalisationen für signifikante Knochenmineraldichteverluste eingeschränkt mit der postmenopausalen Entwicklung der Frau zu vergleichen. Der Substanzverlust vollzieht sich bei OVX-Ratten vorwiegend in der Substantia spongiosa der proximalen Tibiametaphyse, der lumbalen Wirbelkörper und des Femurhalses – nicht jedoch in der distalen Tibiametaphyse oder der Epiphyse langer Röhrenknochen (Jee und Yao 2001). Für die Substantia corticalis wird nur ein geringfügiger Knochen-substanzverlust beschrieben, welcher sich entlang des Endostiums vollzieht (Lelovas et al. 2008; Wronski et al. 1988). Abschließend sei bei der OVX-Ratte noch das Fehlen einer Remodelingaktivität für das Havers-Kanalsystem der Substantia corticalis erwähnt, welches bei der postmenopausalen Frau sowie bei einigen OVX-Tiermodellen wie Hase oder Hund sogar vermehrt stimuliert nachgewiesen werden kann (Lelovas et al. 2008).

1.9 Osteoporose-Diagnostik

1.9.1 Die Röntgen-basierte Knochenmineraldichte-Messung

Die Knochenmineraldichte gilt als Maß für die Stabilität und Festigkeit eines Knochens gegenüber mechanischer Belastung (Ferretti et al. 2002). Die Aufgabe eines diagnostischen Mediums ist es folglich, den Mineralgehalt des Knochens aussagekräftig zu erfassen.

Hierfür wurde in der vorliegenden Arbeit die *periphere quantitative Computertomographie* (pQCT) angewandt. Dieses Verfahren misst den Knochenmineralgehalt eines Knochens aufgrund von dessen Absorptionsprofil gegenüber ausgesandter Röntgenstrahlung (Faulkner und Miller 2008). Die pQCT wird sowohl in der Humanmedizin als auch in der tierexperimentellen Osteoporoseforschung zur Knochenmineraldichte-Bestimmung angewandt (Faulkner und Miller 2008; Guglielmi et al. 2000). Ihren Namen verdankt diese

Methode dem Einsatz an peripheren Skelettanteilen wie distalem Radius oder Tibia. Ein wesentlicher Vorteil der pQCT gegenüber anderen Röntgen-basierten Messverfahren ergibt sich aus der Möglichkeit, ein dreidimensionales Bild des Messobjektes zu erzeugen. Dazu dreht sich die Strahlungsquelle um den Knochen (siehe Abbildung 1.4).

Die technischen Anfänge derartiger Untersuchungen bestanden in den 1960er Jahren in der *SPA-Densitometrie* (SPA), welche mit einer Röntgenröhre arbeitet. Die *Dual-Röntgen-Absorptiometrie* (DEXA oder DXA) stellt die Weiterentwicklung der SPA dar und enthält zwei Strahlungsquellen. Gegenüber dem Ursprungsverfahren hat sie den Vorteil, zwischen Knochen- und Weichteilgewebe unterscheiden zu können (Faulkner und Miller 2008). Beide Systeme ermitteln den Mineralgehalt planar - d. h. als ein Flächenmaß in g/cm^2 . Daher wird hier auch nicht von Knochenmineraldichte, sondern von Knochenmineralgehalt oder **bone mineral content** (BMC) bzw. Knochenmasse gesprochen.

Daraus ergibt sich ein wesentlicher Nachteil dieser Messmethoden: Sie bestimmen den Mineralgehalt der gesamten Schnittebene. Folglich können sie einerseits nicht zwischen Kompartimenten - wie Substantia spongiosa und Substantia corticalis - unterscheiden (Faulkner und Miller 2008). Andererseits berücksichtigt die Flächendichte nicht die Größe der evaluierten Fläche. Aus diesem Grund wird für einen Knochen größeren Umfangs eine größere (falsch-hohe) Flächendichte ermittelt (Ferretti et al. 2002). Bei der pQCT wird für die Knochenmineraldichte hingegen ein volumetrischer Wert in g/cm^3 ermittelt (Faulkner und Miller 2008; Ferretti et al. 2002).

- Die Knochenmineraldichtemessungen erfolgen in der ROI - der **region of interest**. Die ROI wird auf der vorhandenen CT-Aufnahme geometrisch durch den Untersucher definiert (siehe auch Abschnitt 2.2.4).

Die Auswertung der erfassten Parameter erfolgt schließlich dreidimensional und erlaubt zusätzlich eine Differenzierung zwischen dem trabekulären und dem kortikalen Knochenanteil.

Um eine Vergleichbarkeit der Messdaten zu schaffen und damit deren Interpretation zu erleichtern, werden in der humanen Osteoporosediagnostik keine absoluten Dichtewerte verwandt, sondern Standardabweichungen ermittelt. Sie werden in Form eines **Scores** vergeben und bilden die Grundlage für die allgemeingültigen Diagnosekriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (Kanis et al. 1994):

- *T-Score*: entspricht der Standardabweichung, welche sich im Vergleich mit den Werten eines knochengesunden Studienkollektivs junger Erwachsener ergibt. Dabei weist gesunder Knochen einen T-Score > -1 auf, osteopener Knochen zwischen -1.0 und -2.5 und osteoporotischer Knochen < -2.5 .

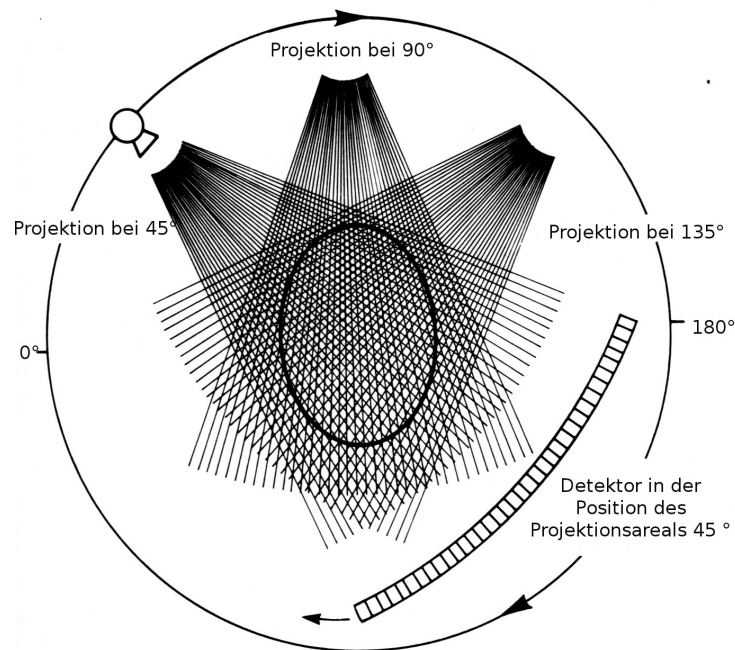


Abbildung 1.4: Das Mess-Objekt liegt auf einem Untersuchungstisch. Die fahr- und drehbare Anbringung der Röntgenröhre sowie des gegenüberliegenden Detektors, ermöglicht eine dreidimensionale Messung der ROI (siehe Abschnitt 1.9.1). Dazu besteht dieses Areal aus mehreren Schnittebenen, welche wiederum aus verschiedenen Winkelpositionen gemessen werden, abgerufen unter URL: <http://www.uni-ulm.de/med/fakultaet/studium-und-lehre/dozenten.html> am 24. Juli 2011 (Schorlemmer).

- *Z-Score*: stellt die Abweichung des Messwertes von dem Durchschnittswert eines gleichaltrigen Referenzkollektivs dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Veränderungen der Knochenmineraldichte jedoch anhand von Absolutwerten ermittelt und miteinander verglichen.

1.9.2 Die Serum-Diagnostik

Für die vorliegende Arbeit wurden die Konzentration von *Osteocalcin* und *β -CrossLaps* im Serum der Versuchstiere bestimmt. Die Quantifizierung beider Parameter ist heute in der humanen Osteoporose-Diagnostik etabliert, da sie eine Einschätzung bezüglich der Aktivität dieser Knochenstoffwechselerkrankung erlauben.

Dazu werden Knochenaufbau und Knochenresorptionsmarker unterschieden, welche teils im Serum, teils im Urin messbar sind. Zu den Aufbaumarkern gehören u. a. *Osteocalcin* und die knochenspezifische alkalische Phosphatase, welche beide von den Osteo-

blasten sezerniert werden (Mihaljević et al. 2009; Srivastava et al. 2005). Das Osteocalcin ist dabei größtenteils in die organische Knochenmatrix eingebunden und zirkuliert nur zu einem kleinen Teil im Serum, welcher zügig renal eliminiert wird (Szulc und Delmas 2008).

Die Aktivität der Knochenresorption kann anhand der β -CrossLaps-Quantifizierung im Serum und Urin eingeschätzt werden. Hierbei handelt es sich um das C-terminale Telopeptid des Kollagens Typ I (Martínez et al. 2009; Christgau et al. 1998). Dieses Protein wird durch die Osteoklasten aus der resorbierten Knochenmatrix herausgelöst (Christgau et al. 1998).

Sowohl für Osteocalcin als auch für β -Crosslaps ergeben sich im Rahmen einer postmenopausalen Osteoporose erhöhte Surrogatparameter in Serum und Urin (Martínez et al. 2009; Lumachi et al. 2009). Die Bestimmung dieser Marker lässt damit Rückschlüsse auf die Aktivierung der Remodeling-Vorgänge zu (Wada et al. 2009). Dieser Umstand erleichtert sowohl die Osteoporosediagnostik als auch die Überwachung einer anti-resorptiven Therapie (Ohtori et al. 2010). In der Osteoporose-Forschung findet die Bestimmung dieser Parameter darüber hinaus eine modellhafte Anwendung bei der ovariectomierten Ratte (Kawakita et al. 2009; Rissanen et al. 2008).

2 Material und Methoden

2.1 Tierexperimentelle Futterstudie

Die Datenerhebung erfolgte auf der Grundlage einer tierexperimentellen Futter-Studie. Der Versuch wurde seitens der zuständigen Bezirksregierung Braunschweig unter dem Aktenzeichen Az.:509.42502/01-36.03 genehmigt.

2.1.1 Versuchstier und Unterbringung

Für diese Studie wurden von der tierexperimentellen Abteilung der Universitätsmedizin der Georg-August-Universität Göttingen 127 weibliche Sprague-Dawley-Ratten aus eigener Zucht zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um Tiere des ersten Wurfes von sojafrei gefütterten Mutter-Tieren. Zu Versuchsbeginn waren die Tiere zwischen 12 und 13 Wochen alt - bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 243 g. Die Unterbringung erfolgte in Kleingruppen zu je 6 Exemplaren in separierten Käfiganlagen. Dabei wurden die Käfige entsprechend der supplementierten Testsubstanz gekennzeichnet (siehe Gruppenbezeichnung gemäß Tabelle 2.1). Den Tieren wurde sojafreies sowie testsubstanzangereichertes Spezialfutter (V 1355, Firma Sniff, Soest) angeboten. Die Dosierung der supplementierten Substanzen wird in Abschnitt 2.1.3 dargestellt. Sowohl das Futter als auch Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung. Hinsichtlich der Unterbringung der Tiere galten die folgenden Bedingungen:

Die Räume waren zwischen 22 und 24 °C temperiert. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug circa 55 %. Die Beleuchtung der Unterbringungsräume wechselte in einem zwölfstündigen Rhythmus jeweils um 6:00 Uhr und um 18 Uhr unter Ausschluss des Tageslichts.

2.1.2 Ovariectomie der Versuchstiere

Zum Versuchsbeginn wurden die circa 3 Monate alten Tiere ovariectomiert (OVX). Der Eingriff erfolgte in einer Isofluran-Inhalationsnarkose (Isofluran, Hersteller Abbott GmbH & Co. KG Wiesbaden) unter fachärztlicher Aufsicht von Dr. Dana Seidlová-Wuttke. Anschließend wurde jedem Tier ein Transponder (12 mm lang) subkutan unter die Nacken-

epidermis implantiert. Diese Transponder gehörten zu einem Identifikationssystem (UNO-Roesvaststaal BV, Hersteller Zevenaar, Holland) und dienten der einwandfreien Kennzeichnung der Tiere für den weiteren Versuchsverlauf.

2.1.3 Testsubstanzfutter

Die separierten Tiergruppen erhielten ab dem Tag der Ovariectomie Testsubstanz-sortiertes Spezialfutter. Als Futtergrundlage diente ein sojafreies Pelletfutter (Hersteller ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Zur Herstellung der einzelnen Spezialfuttersorten, wurden die einzelnen Phytoöstrogene (Changzhou Dahua Import and Export Group, China) sowie β -Östradiol-3-Benzolat (E-8515, Lot 121K1402, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, USA) dem Futtermittelhersteller ssniff zur Verfügung gestellt. Dabei wurden die zu untersuchenden Wirkstoffe in zwei verschiedenen Dosierungen beigemischt, so dass sich später eine Aufteilung der Tiere in die Untergruppen "hoch dosiert" und "niedrig dosiert" ergab. Die Tabelle 2.1 verdeutlicht die Substanzverteilung und ihre Dosierungen.

Gruppe	Testsubstanzfutter	Dosierung in mg/kg Futter	Gruppen- bezeichnung
sojafreie Kontrollgruppe	sojafrei und testsubstanzfrei		Kontrolle
Östradiolgruppe, niedrig dosiert	E Östradiolbenzoat	4.3	E ₂ n
Östradiolgruppe, hoch dosiert	Östradiolbenzoat	17.3	E ₂ h
Equol, niedrig dosiert	Equol	50	Equol n
Equol, hoch dosiert	Equol	400	Equol h
Daidzein, niedrig dosiert	Daidzein	250	Daidzein n
Daidzein, hoch dosiert	Daidzein	1.000	Daidzein h
Puerarin, niedrig dosiert	Puerarin	600	Puerarin n
Puerarin, hoch dosiert	Puerarin	3.000	Puerarin h
Quercetin, niedrig dosiert	Quercetin	200	Quercetin n
Quercetin, hoch dosiert	Quercetin	1.000	Quercetin h

Tabelle 2.1: Einteilung der Versuchstiergruppen nach Testsubstanzen und Dosierungen

2.1.4 Versuchsablauf

Die intakten Versuchstiere erhielten vor der Ovariectomie eine differenzierte Knochenmineraldichtemessung. Für die Messung stand ein für die Kleintieruntersuchung spezialisierter Computertomograph zur Verfügung (XCT Research SA+, Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim). Diese Untersuchung wurde unter einer Isofluran-Inhalationsnarkose durchgeführt. Dabei erfolgten die Messungen am 4. Lendenwirbel sowie auf Höhe der Tibiametaphyse. Zu diesem Zwecke erfolgte die Lagerung der Versuchstiere in Rückenlage zur Vertebralmessung bzw. mit fixiertem Bein zur Tibiamessung.

Die Auswertung dieser erhobenen Messdaten erfolgte mit einer vom Hersteller speziell entwickelten Software (XCT Research SA+ Softwareversion 5.40, Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim). Gemäß denselben Vorgaben erfolgte am Ende des 3-monatigen Futtermessversuchs eine zweite quantitative Computertomographie. Anschließend flossen die erhaltenen Daten vergleichend in die graphische Auswertung dieser Arbeit ein (siehe auch Abschnitt 2.2.1).

In jeder Versuchswoche erfolgte zweimalig eine tiermedizinische Inspektion sowie die Ermittlung der Futtermenge. Auf dieser Grundlage wurde die durchschnittliche Futteraufnahme in den einzelnen Testsubstanzgruppen ermittelt. Das Körpergewicht der Tiere wurde einmalig im Monat bestimmt.

2.1.5 Versuchsende

Am Ende des Versuchszeitraums wurden alle Tiere in einer CO₂-Kurznarkose betäubt und anschließend dekapitiert. Das Blut der Versuchstiere wurde gesammelt und stand nach Zentrifugierung (20 Minuten bei 3000 g) für die Auswertung zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden den Tieren beide Tibiae als Knochenpräparat entnommen, einzeln verpackt, sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C tiefkühl-gelagert. Ferner wurden für weitere Fragestellungen diverse Organe entnommen und der entsprechenden Aufarbeitung zugeführt.

2.2 Radiologische Untersuchungsmethoden

Die Knochenmineraldichte wurde bei dieser Futterstudie mittels einer quantitativen Computertomographie erhoben. Dazu wurde ein Computertomograph (XCT Research SA+) zur Kleintierknochenuntersuchung verwendet.

2.2.1 Technische Daten des Computertomographie-Gerätes

Die Untersuchungseinheit besteht aus dem CT-Gerät und einem DOS-kompatiblen Personalcomputer. Das CT-Gerät beinhaltet 2 wesentliche Bausteine. Hierzu gehört eine Röntgenröhre als Photonenentsender sowie 12 Halbleiterdetektoren, welche dieser Strahlungsquelle gegenüberstehen. Jeder Detektor ist mit einem Vorverstärker verbunden und bildet mit ihm zusammen eine der 12 Detektoreinheiten. Die Detektoren dienen der Registrierung der emittierten Photonen aus verschiedenen Winkeleinstellungen. Dieser Vorgang wird durch die Computereinheit gesteuert, welche anschließend aufgrund der gemessenen Daten ein CT-Bild erstellt (siehe auch Abschnitt 2.2.2). Die Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über die technische Ausrüstung des verwendeten Computertomographen.

Gerätebaustein	Technische Ausstattungsmerkmale
Röntgenröhre	Hochspannung 50 kV, Anodenstrom < 0.3 mA, mittlere Röntgenenergie 37 keV, Energie nach Filterung 18 keV
Detektoren	12 Halbleiterdetektoren mit Verstärker
Positionierhilfe	Diodenlaser < 1mW
Computer	DOS-kompatibler Computer, Schnittstelle zum Messgerät V24, 38400 Baud
Gerätemechanik	Translations-Rotationsprinzip, Rotationswinkel: 186°, Messgeschwindigkeit: max 40 mm/Sekunde, Auflösung 90-500 μm

Tabelle 2.2: Technisches Ausstattungsprofil des verwendeten CT-Gerätes "XCT Research SA+ von der Stratec Medizintechnik GmbH" (Stratec Medizintechnik GmbH Pforzheim 2000)

2.2.2 Arbeitsweise des CT-Gerätes

Für die vorliegende Arbeit wurden computertomographische Messungen im Bereich der linken Tibiametaphyse sowie auf Höhe des Lendenwirbelkörpers 4 durchgeführt. Der verwendete Computertomograph vollzog die Messungen in 2 Durchläufen. Zunächst erfolgte eine Übersichtsaufnahme - der sogenannte **Scout-View**. Dafür wird der entsprechende Körperteil longitudinal in 100 μm Abständen erfasst und liefert eine niedrigaufgelöste Aufnahme. Anschließend wird manuell eine Referenzlinie für den zweiten Messdurchlauf festgelegt. Siehe dazu Abbildungen 2.1 und 2.2.

Im zweiten Scan-Durchlauf erfolgte die Detailaufnahme. Für die Mess-Abstände existierten einheitliche Vorgaben. Demnach erfolgte der CT-Scan der Tibia diaphysenwärts

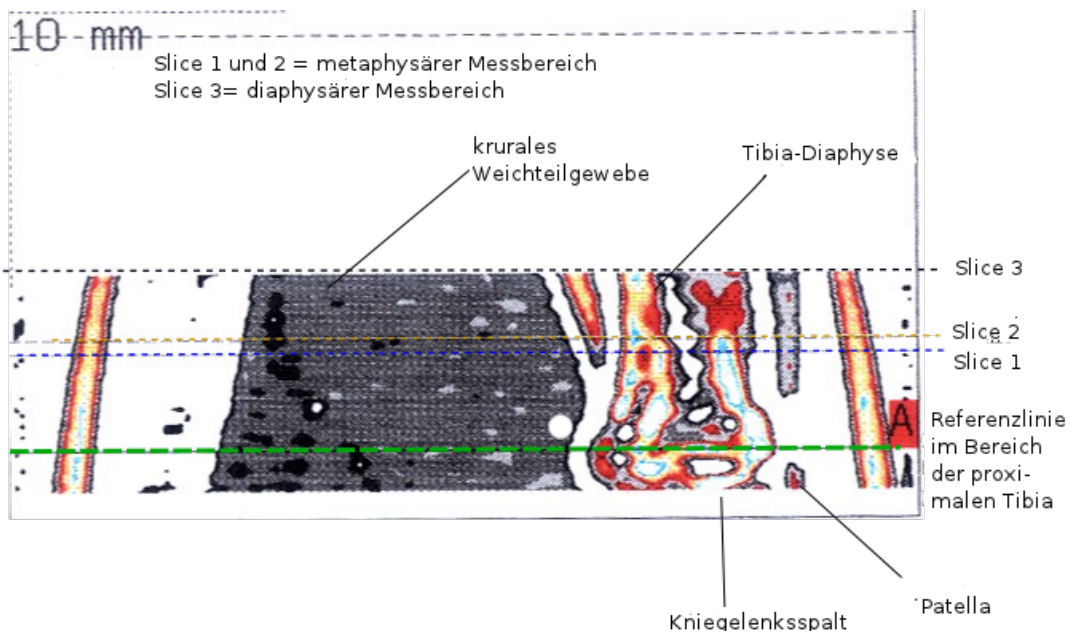


Abbildung 2.1: Scout-View der proximalen Ratten-Tibia aufgenommen mit XCT Research SA+ Bone Scanner. Dargestellt sind die manuell festgelegte Referenzlinie (grün) sowie die 3 Schnittebenen (Slice 1 bis 3)

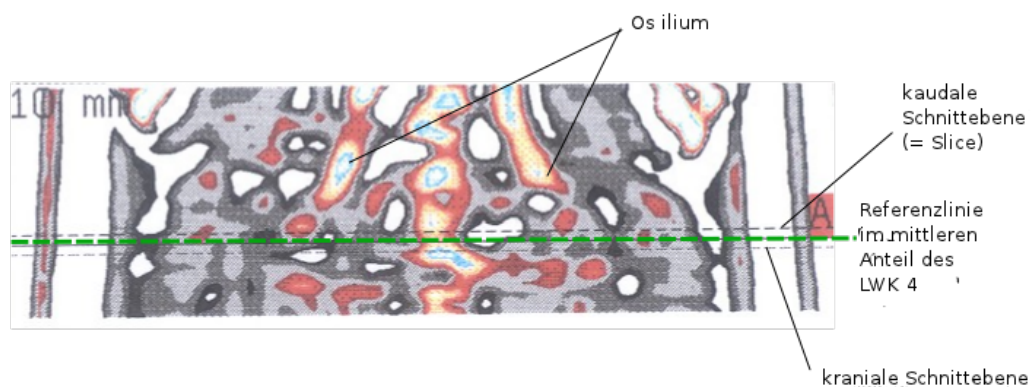


Abbildung 2.2: Scout-View im Bereich der Ratten-Lendenwirbelsäule aufgenommen mit XCT Research SA+ Bone Scanner. Die Referenzlinie (grün) wurde manuell auf das Zentrum des 4. Lendenwirbelkörpers festgelegt. Die kraniale und die kaudale Schnittebene werden durch die unterbrochenen Linien dargestellt.

1.5 mm, 3.75 mm und 4.75 mm distal der festgelegten Referenzlinie. Im Bereich der Vertebra wurde die Messung 1 mm proximal und distal der Referenzlinie durchgeführt. Die Computertomographie erfolgt nach dem folgenden physikalischen Prinzip: Jede Materie, welche einer Röntgenstrahlung ausgesetzt wird, erzeugt ein messbares Absorptionsprofil. Dabei durchqueren die Photonen Knochen und Weichteilgewebe senkrecht zur Längsachse

und werden abgeschwächt von den gegenüberliegenden Detektoren registriert. Jede Messung bestand bei diesem CT-Gerät aus 180 einzelnen Winkelschnitten, die aus 15 verschiedenen Positionen erstellt wurden. Die Detektoreinheiten rotierten nach jedem Einzelscan in 12°-Schritten um die Messebene. Das registrierte Absorptionsprofil wurde von den Detektoren erfasst und an das angeschlossene Computersystem übertragen. Bei der Auswertung wurde sowohl die Strahlaufhärtung als auch die Totzeit berücksichtigt. Die Erstellung eines CT-Bildes erfolgte schließlich durch mathematische Faltung der Absorptionsprofile sowie durch Nutzung von Korrekturalgorithmen. Das Ergebnis waren 3 zweidimensionale Abbildungen in Querschnittsdarstellung. Jedes dieser Bilder spiegelt anhand verschiedener Schwächungskoeffizienten die unterschiedlichen Gewebeortsdichten wider (siehe dazu Abbildung 2.3). Dazu sind diese Koeffizienten bestimmten Farbabstufungen einer Skala zugeordnet. Die dargestellte Farbverteilung auf dem ausgegebenen Bild lässt somit einen näherungsweisen Rückschluss auf die Verteilung von Weichteilgewebe, kortikalem und spongiosen Knochen im CT-Bild zu.



Abbildung 2.3: Farbskala entsprechend der computertomographischen Darstellung; sortiert nach den gewebespezifischen Dichtewerten

Mittels der Kalibrierung des Computertomographen auf ein Phantom ¹ können die Schwächungskoeffizienten einer bestimmten Gewebedichte zugeordnet werden. Diese Kalibrierung ist die Grundlage für die exakte Messung der Knochenmineraldichte.

2.2.3 Die ausgewerteten CT-Parameter

Die CT-morphologisch messbaren Knochenveränderungen wurden anhand verschiedener Dichte-, Flächen- und Umfangparameter an Tibia und Vertebra ermittelt. Die folgende Aufstellung sowie die Abbildung 2.4 verdeutlichen die räumliche Orientierung der ermittelten Werte:

¹Phantom aus Hydroxylapatit mit einer bekannten Dichte

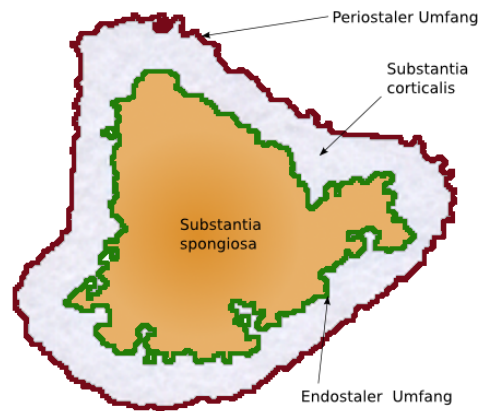


Abbildung 2.4: Die Abbildung zeigt einen schematischen Transversalschnitt durch die proximale Tibiametaphyse der Ratte mit den einzelnen Messbereichen.

- **Trabekuläre Knochenmineraldichte:** Dichte der Substantia spongiosa, innerhalb der grünen Linie
- **Kortikale Knochenmineraldichte:** Dichte der Substantia corticalis, graue Zone
- **Gesamt-Knochenmineraldichte:** Gemeinsame Dichte von Substantia spongiosa und corticalis
- **Trabekuläre Querschnittsfläche:** Transversalschnitt durch die Substantia spongiosa, orange-farbige Zone
- **Kortikale Querschnittsfläche:** Transversalschnitt durch die Substantia corticalis, graue Zone
- **Gesamt-Querschnittsfläche:** Transversalschnitt innerhalb der roten Linie, orange Zone + graue Zone
- **Endostaler Umfang:** Grenzlinie zwischen Substantia spongiosa und corticalis, grüne Linie
- **Periostaler Umfang:** Äußere Zirkumferenz um den Knochen, rote Linie

2.2.4 Auswertungsmethoden

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mittels Anwendersoftware der Firma Stratec auf der Grundlage der vorliegenden 3 CT-Schnittbilder. Uns interessierte vor allem die Gesamtknochenmineraldichte sowie die jeweilige Dichte von Substantia spongiosa und Substantia corticalis. Dazu wurde auf den Schnittbildern der Auswertungsbereich ROI ma-

nuell festgelegt (siehe dazu auch Abbildung 2.5). Die rechnerische Differenzierung der einzelnen Kompartimente erfolgte anschließend mittels Schwellenwertalgorithmen. Das Ergebnis sind lineare Schwächungskoeffizienten für die gemessenen Gewebearten. Die Berechnungsmodi werden in den folgenden Abschnitten erklärt.

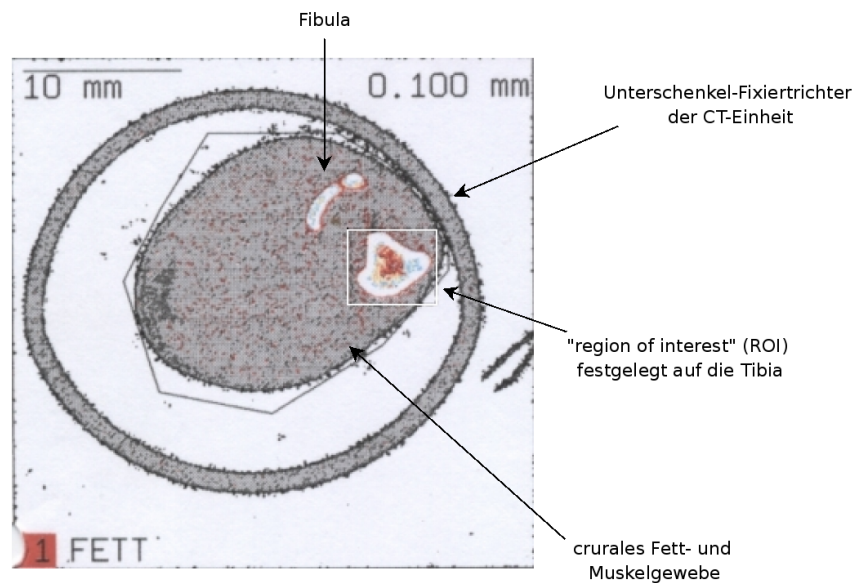


Abbildung 2.5: Schnittbild eines Ratten-Unterschenkels auf der Höhe der Tibiametaphyse; aufgenommen mit dem Stratec-Computertomographen der Abteilung für Experimentelle und Klinische Endokrinologie, Prof Dr. W. Wuttke. Der weiße Rahmen markiert die **ROI**, in welcher die Knochenmineraldichte bestimmt werden soll.

2.2.5 Calculated bone density (CalcBD)

Durch mathematische Rückprojektion wurde hiermit die äußere Knochenkontur von den Weichteilgeweben getrennt. Kalibriert auf die bekannte Mineraldichte eines Hydroxylapatit-Phantoms, berechnet der Computer die durchschnittliche Gesamtknochenmineraldichte sowie die Dichte der Substantia spongiosa in mg/cm^3 . Diese Berechnungen erfolgen für die **ROI** der Schnittebenen 1 und 2. Ein manuell festgelegter Dichtekoeffizient bildet die Grundlage für die weitere Differenzierung zwischen Substantia spongiosa und corticalis. Dieser Schwellenwert war für diese Arbeit auf $400 \text{ mg}/\text{cm}^3$ voreingestellt.

2.2.6 Cortical bone density (CortBD)

Dieser Modus diente der Bestimmung der kortikalen Knochenmineraldichte. Gemessen für die **ROI** war hier ein Schwellenwert von $710 \text{ mg}/\text{cm}^3$ vorgegeben. Die kortikale Dichte

wurde diaphysär auf der 3. CT-Schnittebene gemessen.

2.2.7 Dichteabhängige Differenzierung zwischen Metaphyse und Diaphyse der Ratten-Tibia

Die nach Schnittebenen getrennte Aufarbeitung der erfassten Dichteparameter ergab den höchsten Anteil an spongiösem Knochen für die CT-Schnittebenen 1 und 2. Dabei handelt es sich vermutlich um den Übergang von Tibiametaphyse (Schnitt 1 und 2) zur Tibia-diaphyse (Schnitt 3). Daher erfolgten Prozent-relativierte und graphische Auswertungen später getrennt für die Metaphyse (CT-Schnitt 1 und 2) und proximale Diaphyse (CT-Schnitt 3).

2.3 Serumdiagnostik

Die Aufarbeitung des gewonnenen Rattenserums diente der Beurteilung des Knochenstoffwechsels unter dem Einfluss der Testsubstanzen. Dazu wurde die Menge des osteoblastär gebildeten Proteins Osteocalcin und des Knochenabbaumarkers β -CrossLaps bestimmt. Die Quantifizierung dieser Parameter erfolgte mittels ELISA. So stand für die Bestimmung des Osteocalcinspiegels der Elecsys-Test als konventionelles System der Firma Roche Diagnostics, Mannheim zur Verfügung, der in der humanen Osteoporose-Diagnostik etabliert ist. Die β -CrossLaps wurden in einem vergleichbaren Verfahren quantifiziert (Nordic Biosciences, Herlev, Dänemark).

2.4 Statistische und graphische Methoden

Für die statistische Auswertung der erhaltenen Daten wurde das Computerprogramm Prism® des Software-Herstellers GraphPad, San Diego, USA verwendet. Um eine Vergleichbarkeit zu garantieren, wurden die durchschnittlichen Messwerte der Kontrolltiergruppe sowie der Testsubstanzen vor der Ovariectomie als 100%-Wert definiert. Aus den Messdaten der einzelnen Testsubstanzen wurden ebenfalls Mittelwerte berechnet und diese in Relation zu dem 100%-Wert gesetzt. Auf dieser Grundlage konnten für alle Testsubstanzen prozentrelativierte Mittelwerte erstellt sowie der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) berechnet werden. Anschließend wurden die Ergebnisse mittels des verwendeten Computerprogrammes als Säulen-Diagramme dargestellt. Weiterhin wurde eine einfaktorische Varianzanalyse nach ANOVA (**analysis of variance**) zwischen den Kontrollgruppen und den Testsubstanzen durchgeführt. Diese diente der Signifi-

kanzüberprüfung. Die Ergebnisse fließen anschließend in einen multiplen Vergleichstest nach Dunnett ein. Für die vorliegende Arbeit wurde das Signifikanzniveau auf einen Wert von $p < 0.05$ festgelegt. Entsprechend wurden signifikante Ergebnisse bei der graphischen Aufarbeitung mit * hervorgehoben.

Die Abbildung 2.6 zeigt am Beispiel die in dieser Arbeit verwendete graphische Aufarbeitung.

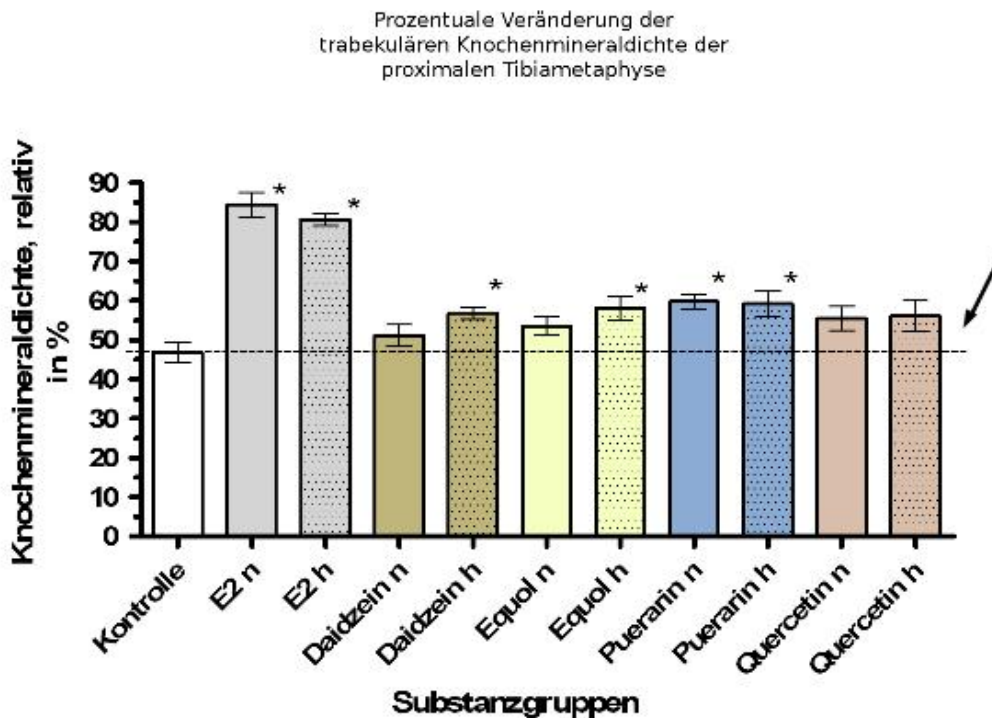


Abbildung 2.6: Für jede Substanzgruppe werden prozentrelativierte Veränderungen vom Ausgangswert angegeben. Der schwarze Pfeil deutet auf die gestrichelte Linie, welche sich an den Resultaten der Kontrolltiere orientiert. Sie verbessert die Vergleichbarkeit der hier ausgewerteten Daten.

3 Ergebnisse

3.1 Futter- und Testsubstanzaufnahme

Die Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die durchschnittliche Aufnahme des Testsubstanzfutters während der 3-monatigen Tier-Futter-Studie. Die tägliche Futtermenge variierte zwischen 11.65 g pro Tier bei den mit E₂ h gefütterten Tieren und maximal 18.42 g pro Tier in der Quercetin-h-Gruppe.

3.2 Entwicklung des Körpergewichts

Es wurde die Gewichtsentwicklung aller Tiere zwischen dem Zeitpunkt der Ovariectomie sowie dem Versuchsende ermittelt. Die Tiere erhielten gruppenselektiert entweder sojafreies Futter, E₂-haltiges Futter oder testsubstanz-aufbereitetes Futter nach dem Schema der Tabelle 3.1. Dabei lag das Anfangsgewicht durchschnittlich bei 243 g pro Tier.

Die graphische Abbildung 3.1 verdeutlicht für alle Tiergruppen - außer der Gruppe E₂ h - eine Gewichtszunahme. Ergänzend gibt die Tabelle 3.2 die durchschnittliche Veränderung des Körpergewichtes in % an. Wie Übersicht 3.1 und Tabelle 3.2 zeigen, entwickelten die Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe einen durchschnittlichen Gewichtszuwachs von 40.3 % ihres Ursprungsgewichtes. Die herausragendste Entwicklung der anderen Versuchstiergruppen zeigte E₂ h. Hier konnten wir einen signifikanten Gewichtsverlust von durchschnittlich 4.7 % nachweisen. Zusätzlich zeigte diese Gruppe die geringste durchschnittliche Futtermenge von 11.65 g pro Tier (siehe Tabelle 3.1). Unter E₂ n zeigte sich ebenfalls eine signifikante Entwicklung im Sinne eines gehemmten Gewichtszuwachses um durchschnittlich 12.9 %. Von den untersuchten Phytoöstrogenen wirkte nur Puerarin h signifikant und verminderte die post-OVX-Gewichtszunahme um 21.8 % gegenüber den Kontrolltieren.

Testsubstanz (Substanzdosis in mg/kg)	Durchschnittliche Futteraufnahme in g/Tag	Durchschnittliche Substanzaufnahme in mg/Tag
sojafreie Kontrollgruppe	17.65	-
E ₂ , niedrig dosiert (4.3 mg/kg)	16.33	0.07
E ₂ , hoch dosiert (17.3 mg/kg)	11.65	0.2
Daidzein, niedrig dosiert (250 mg/kg)	17.89	4.47
Daidzein, hoch dosiert (1.000 mg/kg)	15.84	15.84
Equol, niedrig dosiert (50 mg/kg)	18.35	0.92
Equol, hoch dosiert (400 mg/kg)	16.36	6.54
Puerarin, niedrig dosiert (600 mg/kg)	17.49	10.49
Puerarin, hoch dosiert (3.000 mg/kg)	16.08	48.24
Quercetin, niedrig dosiert (200 mg/kg)	17.73	3.55
Quercetin, hoch dosiert (1.000 mg/kg)	18.42	18.42

Tabelle 3.1: Durchschnittliche aufgenommene Futtermenge für die einzelnen Tiere pro Tag sowie die darin enthaltene tägliche Testsubstanzmenge.

3.3 Die Veränderungen des Knochengewebes im Bereich der Tibia

Die erste computertomographische Messung wurde zu Beginn des Futtersversuches unter Ausschluss der Testsubstanzen vorgenommen. Damit entsprechen die hier ermittelten Knochenparameter physiologischen Werten östrischer Ratten vor ihrer Menopause. Für die Tibia wurden die Messwerte der CT-Schnitte 1 und 2 getrennt vom CT-Schnitt 3 ausgewertet, da sie die spongiosareiche Metaphyse enthielten. Die Ergebnisse der ersten computertomographischen Messung zeigen unter physiologischen Bedingungen der östrischen Ratte einen deutlich geringeren Anteil von trabekulärem Knochengewebe in der proximalen Tibiadiaphyse (CT-Schnitt 3).

Anmerkung zu den graphischen Abbildungen Bei allen folgenden Darstellungen entsprechen die graphisch aufgetragenen Werte der prozentualen Relation des zweiten CT-Scans zum ersten CT-Scan.

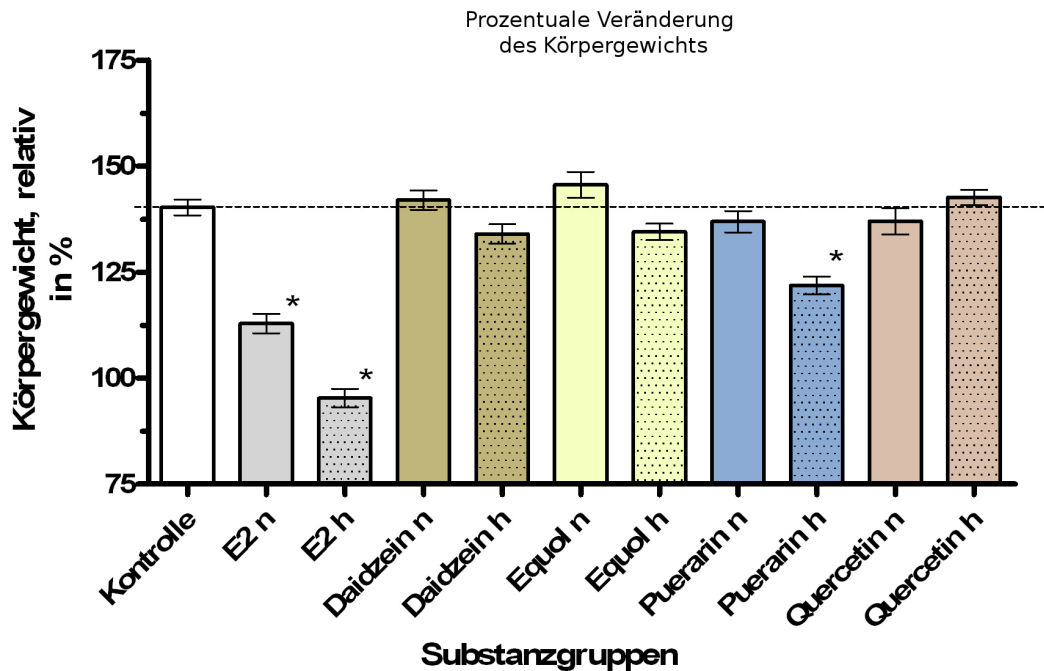


Abbildung 3.1: Dargestellt ist die prozentuale Veränderung des Körpergewichts nach 3-monatiger E₂- bzw. Phytoöstrogensupplementation gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Die Veränderung wurde in % aufgetragen. * entspricht $p < 0.05$

3.3.1 Die Veränderung der trabekulären Knochenmineraldichte der Tibia

Metaphyse (CT-Schnitt 1 und 2)

Zu Versuchsbeginn wurde für die Substantia spongiosa der Tibiametaphyse eine durchschnittliche Knochenmineraldichte von 265.2 mg/cm³ ermittelt. Durch die anschließende Ovariectomie wurde bei den Tieren ein Östrogenmangelstoffwechsel herbeigeführt, der eine osteoporotische Entwicklung des Knochengewebes erwarten ließ. Die Abbildung 3.2 bestätigte diese Erwartung und zeigt für alle Tiergruppen eine Reduktion der trabekulären Knochenmineraldichte. Die Knochenmineraldichte der unbehandelten Tiere sank auf durchschnittlich 46.52 % des Ursprungswertes der geschlechtsreifen, intakten Ratte. Durch E₂ n und E₂ h konnte der Verlust von trabekulärem Knochengewebe signifikant vermindert werden. Die durchschnittliche Abnahme der trabekulären Knochenmineraldichte erfolgte unter E₂ n auf 81.97 % und unter E₂ h auf 80.14 %. Unter den phytoöstrogenen Testsubstanzen erreichte Puerarin in beiden Dosierungsstärken eine signifikante Vermin-

Testsubstanzgruppe	Durchschnittliche relative Gewichtsentwicklung in %
Kontrolle, sojafrei	140.3
E ₂ , niedrig dosiert	112.9
E ₂ , hoch dosiert	95.3
Daidzein, niedrig dosiert	142
Daidzein, hoch dosiert	134
Equol, niedrig dosiert	145.6
Equol, hoch dosiert	134.5
Puerarin, niedrig dosiert	136.9
Puerarin, hoch dosiert	121.8
Quercetin, niedrig dosiert	137
Quercetin, hoch dosiert	142.6

Tabelle 3.2: Die Tabelle zeigt die prozentrelativen Gewichtsentwicklung der einzelnen Tierversuchsgruppen nach 3-monatiger Supplementation von E₂ sowie den ausgewählten Phytoöstrogenen. Die Werte entsprechen der prozentualen Relation des Endgewichtes vom Ausgangsgewicht der intakten Ratte.

derung der osteoporotischen Entwicklung. So sank die trabekuläre Knochenmineraldichte hier durchschnittlich auf 58.72 % für Puerarin n und auf 58.77 % bei Puerarin h. Daidzein h erhielt den Dichtewert signifikant auf 55.03 %, Equol h auf 59.19 %.

Proximale Diaphyse (CT-Schnitt 3)

Der Knochenmineraldichteverlust der E₂-supplementierten Positivkontrolle wurde im Versuchsverlauf signifikant gemildert. Gegenüber der Kontrollgruppe erfolgte die durchschnittliche Abnahme dieses Parameters unter E₂ n auf 84.34 % sowie unter E₂ h auf 80.53 % des Ursprungsniveaus. Von den eingesetzten Phytoöstrogenvertretern zeigte Puerarin n einen signifikanten, östrogenäquivalenten Effekt. So sank die trabekuläre Knochenmineraldichte nur auf durchschnittliche 59.75 % gegenüber dem Ausgangswert. Die Substanzgruppen Puerarin h und Equol h erzielten ähnlich hohe Durchschnittswerte (siehe Abbildung 3.3).

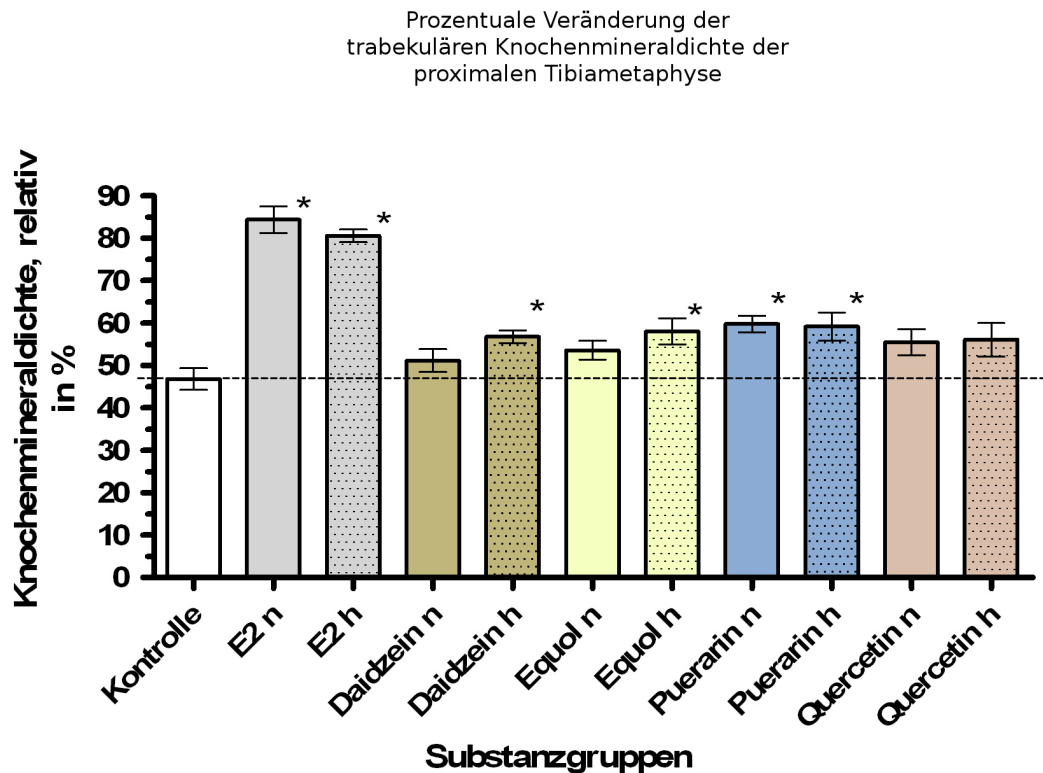


Abbildung 3.2: In der Abbildung wird die Reduktion der metaphysär ermittelten Knochenmineraldichte der Substantia spongiosa dargestellt. * entspricht $p < 0.05$

3.3.2 Die Veränderung der kortikalen Knochenmineraldichte der Tibia

Metaphyse (CT-Schnitt 1 und 2)

Der Ausgangswert der kortikalen Knochenmineraldichte in der Tibiametaphyse betrug vor Beginn des Futtersversuchs durchschnittlich 1077 mg/cm^3 . Ausgehend von diesem Wert entwickelten alle Tierversuchsgruppen eine Zunahme der kortikalen Knochenmineraldichte (siehe Abbildung 3.4). Die deutlichste Zunahme dieses Parameters wurde hier von der Kontrollgruppe mit einem Zuwachs von 12.7 % und von Equol h mit einem Zuwachs von 14.4 % erzielt. Die einzige signifikante Entwicklung erzielte Puerarin n. Hier wurde dieser Zuwachs der Knochenmineraldichte auf 6.6 % limitiert (siehe Abbildung 3.4).

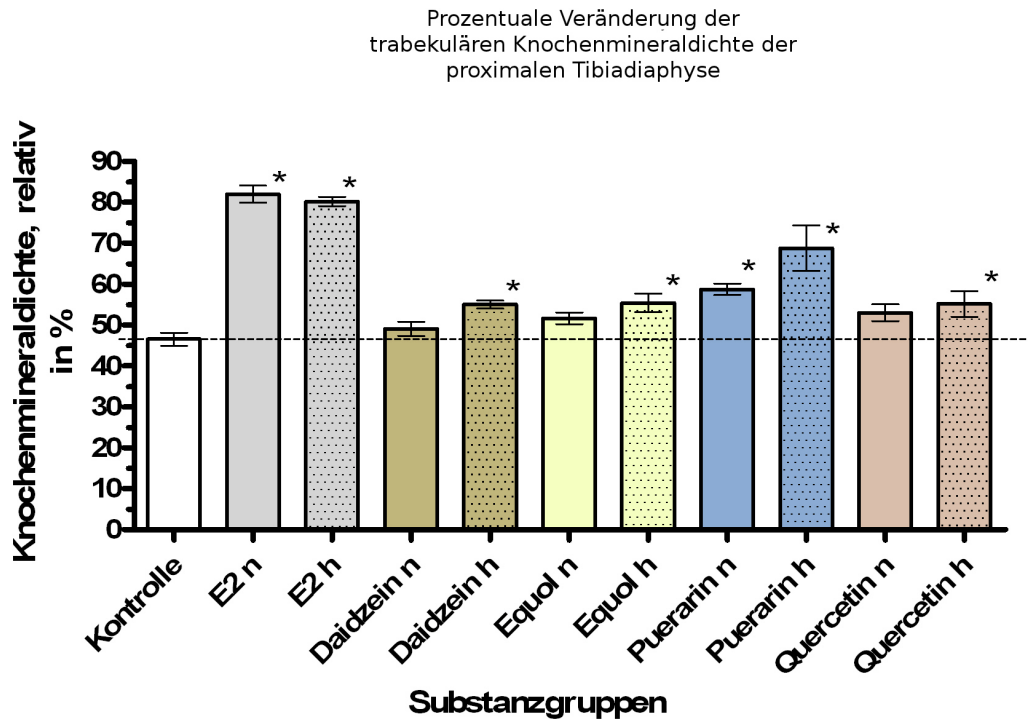


Abbildung 3.3: In der Abbildung wird die Reduktion der diaphysär ermittelten Knochenmineraldichte der Substantia spongiosa dargestellt. * entspricht $p < 0.05$

Proximale Diaphyse (CT-Schnitt 3)

Die Abbildung 3.5 verdeutlicht auch für den distal orientierten CT-Schnitt 3 einen Zuwachs der kortikalen Knochenmineraldichte in allen Tiergruppen. Ursprünglich betrug die durchschnittliche Kortikalismineraldichte hier 1267.35 mg/cm^3 . Demnach liegt dort bei der intakten Ratte bereits physiologisch eine um durchschnittlich $190,4 \text{ mg/cm}^3$ höhere Knochenmineraldichte als in den metaphysären CT-Schnittebenen 1 und 2 vor.

Zum Versuchsende ergaben die Messwerte für die Kontrollgruppe im CT-Schnitt 3 eine Zunahme der kortikalen Knochenmineraldichte von 4.8 % gegenüber 12.7 % in den CT-Schnitten 1 und 2. Signifikante Entwicklungen waren nicht zu verzeichnen. Allerdings zeigte Equol h einen nicht-signifikant reduzierten Dichtezuwachs von durchschnittlich 2.2 % (siehe Abbildung 3.5).

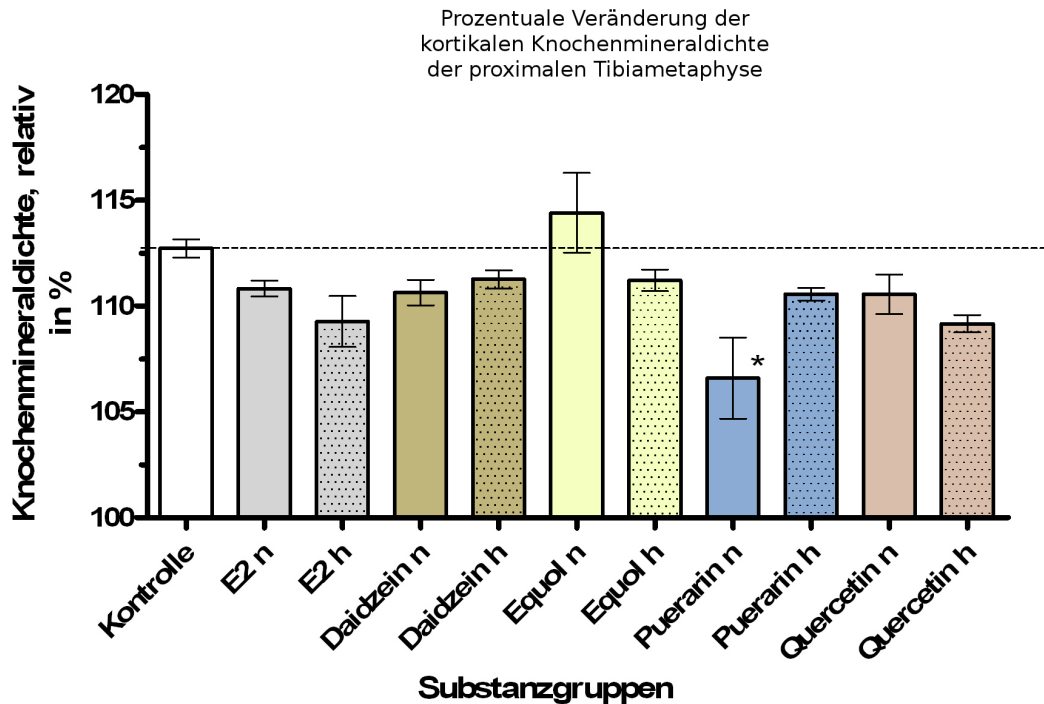


Abbildung 3.4: Die Abbildung zeigt die Reduktion der kortikalen Knochenmineraldichte die in Metaphyse der Tibia auf Höhe der CT-Schnitte 1 und 2 gemessen wurde. * entspricht $p < 0.05$

3.3.3 Die Veränderung der Gesamt-Knochenmineraldichte der Tibia Metaphyse (CT-Schnitt 1 und 2)

Zu Beginn des Futtersversuchs wurde für die Tibiametaphyse eine totale Knochenmineraldichte von durchschnittlich 656.6 mg/cm^3 gemessen und ist als physiologischer Ausgangspunkt anzusehen. Für die Kontrollgruppe ließ sich am Ende des Versuchszeitraums eine Reduktion der Gesamtknochenmineraldichte um 4.9 % auf 650.9 mg/cm^3 quantifizieren. Die Abbildung 3.6 zeigt für die E_2 -supplementierten Tiere beider Dosisstärken eine deutliche, jedoch nicht-signifikante Zunahme der Gesamtknochenmineraldichte. Außer Quercetin n entwickelte sich in allen weiteren Testsubstanzgruppen ein nicht-signifikanter Zuwachs der Gesamtknochenmineraldichte. Der einzige deutliche - jedoch nicht signifikante - Knochenmasseverlust wurde durch die Supplementation von Quercetin n verursacht (Abbildung 3.6). Da sich in der hoch-Dosis-gefütterten Tiergruppe durchaus eine Zunahme der Knochenmineraldichte zeigte, ist hier ein Dosis-Wirkungs-Zusammenhang zu vermuten.

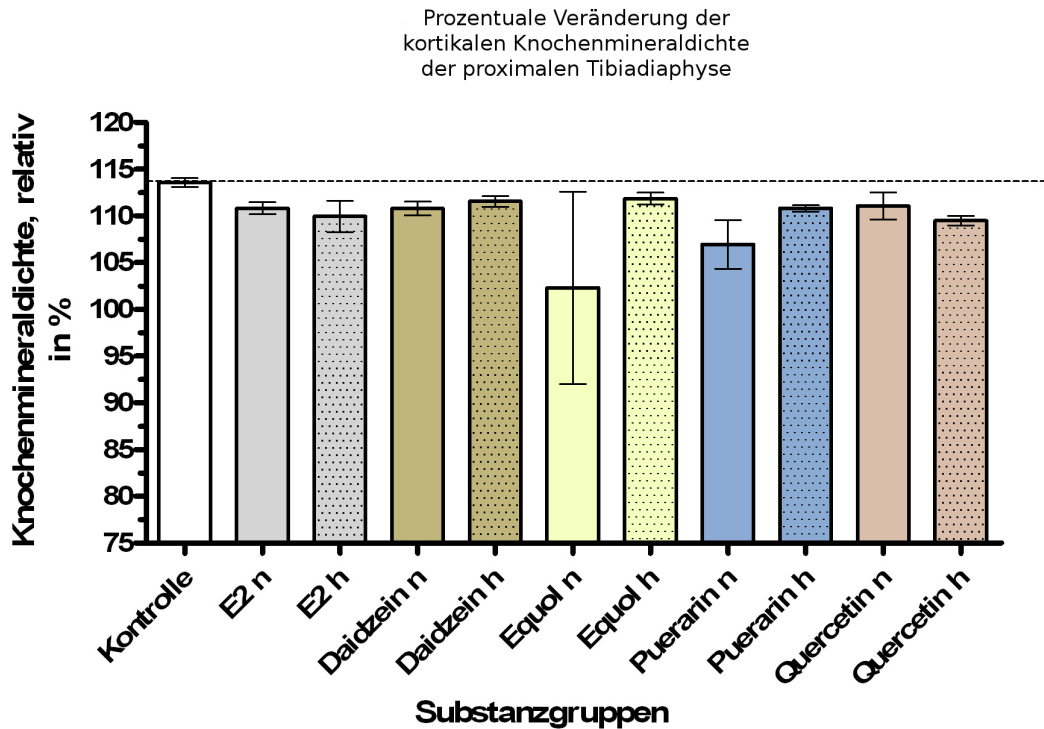


Abbildung 3.5: In dieser Abbildung wurde die Reduktion der computertomographisch ermittelten Knochenmineraldichtewerte der Substantia corticalis auf Höhe des CT-Schnitts 3 aufgetragen.

Proximale Diaphyse (CT-Schnitt 3)

Die Abbildung 3.7 zeigt unterschiedliche Entwicklungen der Gesamtknochenmineraldichte auf der 3. CT-Schnittebene. Als physiologischer Ausgangswert der intakten Ratte, wurde zu Versuchbeginn eine totale Knochenmineraldichte von 833.2 mg/cm^3 bestimmt. Wie bereits in Abschnitt 3.3.2 angedeutet, ist der physiologische Anteil trabekulären Knochens in diesem Bereich reduziert und liegt bei 51.4 % im Verhältnis zur Metaphyse. Die Gesamtknochenmineraldichte der unbehandelten Kontrollgruppe zeigte nur einen minimalen Substanzverlust von 1.84 %. Insgesamt konnten keine signifikanten Entwicklungen nachgewiesen werden. Bei den eingesetzten Testsubstanzen konnten lediglich die E₂-Positivkontrollen eine geringe Zunahme der Gesamt-Knochenmineraldichte erzielen (siehe Abbildung 3.7). Die deutlichste Östrogen-inverse Entwicklung wurde für Quercetin n nachgewiesen. Unter dieser Supplementation entwickelten die Tiere einen durchschnittlichen Verlust von 10.89 % gegenüber der ursprünglichen Gesamtknochenmineraldichte. Unter Quercetin h sank dieser Parameter nur um 3.9 %, so dass für CT-Schnittebene 3 dosis-abhängige Mechanismen als Ursache für dieses Resultat zu diskutieren sind.

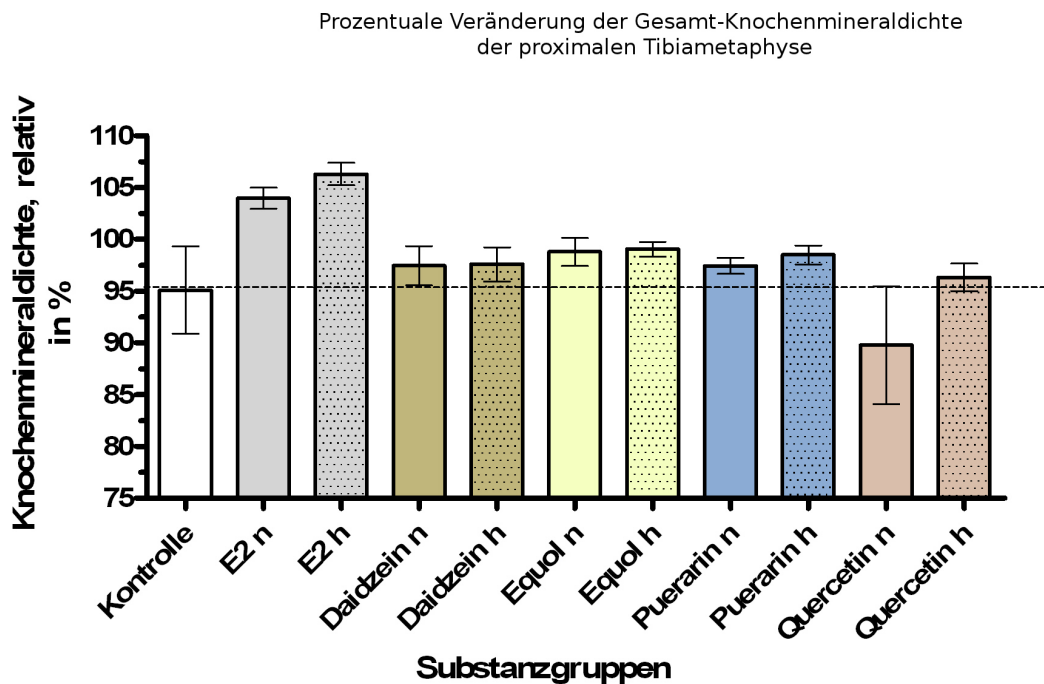


Abbildung 3.6: Die Abbildung zeigt die Reduktion der gesamten Knochenmineraldichte über den kompletten Knochenquerschnitt der Tibiametaphyse. Die Substantia spongiosa sowie die Substantia corticalis gehen nach der logarithmischen Schwellendifferenzierung vom Weichteilgewebe gemeinsam in die Berechnung der Gesamtknochenmineraldichte ein. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um einen aufkumulierten Wert aus den Einzeldichte-Parametern der beiden Teilgewebe. Vielmehr handelt es sich hierbei um einen Schwächungskoeffizienten, welcher durch das Zusammenspiel von Substantia spongiosa und corticalis erzeugt werden.

3.3.4 Die Veränderung der trabekulären Querschnittsfläche der Tibia Metaphyse (CT-Schnitt 1 und 2)

Die Abbildung 3.8 zeigt die prozentuale Veränderung der trabekulären Querschnittsfläche an. Dabei wurde zu Beginn des Futtermittelsversuchs eine durchschnittliche Querschnittsfläche der metaphysären Substantia spongiosa von 4.3 mm^2 gemessen. Davon ausgehend entwickelten die unbehandelten Kontrolltiere einen durchschnittlichen Flächenzuwachs von 44.4 %. Die einzige signifikante Entwicklung wurde durch E₂ h erreicht. In dieser Versuchsgruppe wurde der Flächenparameter mit 99.19 % auf dem Ursprungsniveau der intakten Ratte gehalten. Unter der Supplementation von E₂ n entwickelte sich ein reduzierter

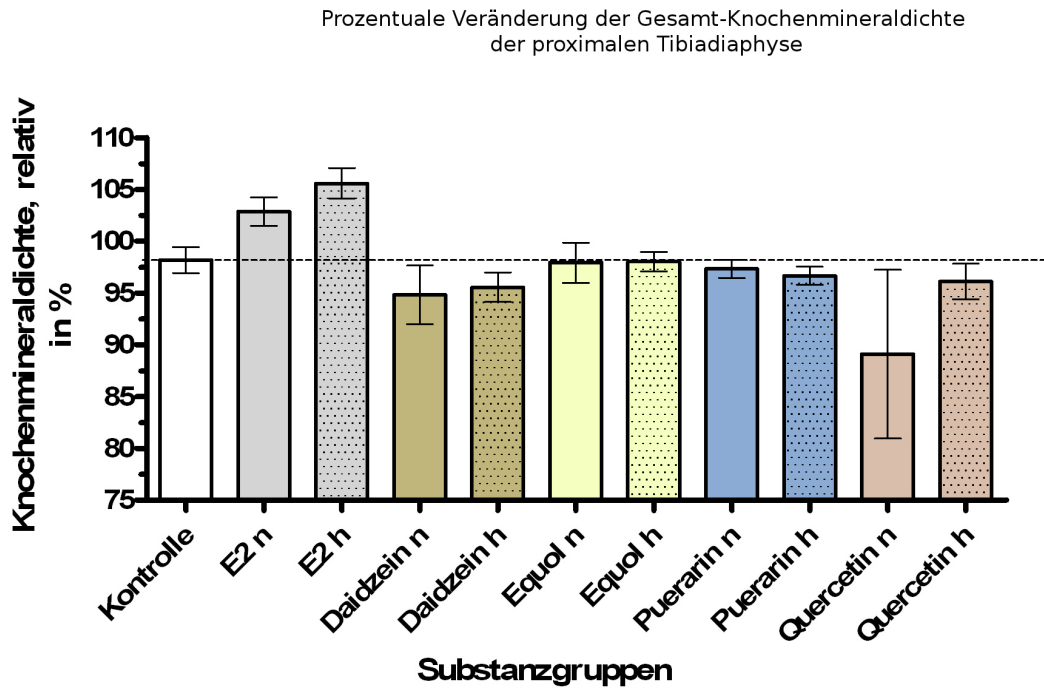


Abbildung 3.7: In dieser Abbildung ist die Reduktion der computertomographisch ermittelten Gesamtknochenmineraldichte aufgetragen, wie sie durch den diaphysenwärts gerichteten CT-Schnitt 3 erfasst wurde. Genauso wie in den metaphysären Schnitten 1 und 2, wird das Knochengewebe mittels Schwellenwertlogarithmen rechnerisch von dem umgebenden Weichteilgewebe selektiert.

Flächenzuwachs von 32.9 %. Von den phytoöstrogenen Substanzgruppen zeigte am ehesten Puerarin h eine Östrogen-ähnliche Entwicklung. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten wir hier einen nicht-signifikanten Zuwachs von nur 132.9 % ermitteln (siehe Abbildung 3.8). Interessant ist auch der deutliche Flächenzuwachs um 63.5 %, welcher für Equol h gezeigt werden konnte.

Proximale Diaphyse (CT-Schnitt 3)

Die Abbildung 3.9 zeigt für den 3. CT-Schnitt mehrheitlich einen deutlichen Zuwachs der trabekulären Querschnittsfläche. Die unbehandelten Tiere der Kontrollgruppe entwickelten eine Zunahme dieses Parameters um 51.6 %. Die einzige signifikante Entwicklung erbrachte lediglich E₂ h. Hierunter wurde die Größe der trabekulären Querschnittsfläche auf 102.1 % stabilisiert. Für Daidzein h konnte mit 71.8 % der größte nicht-signifikante

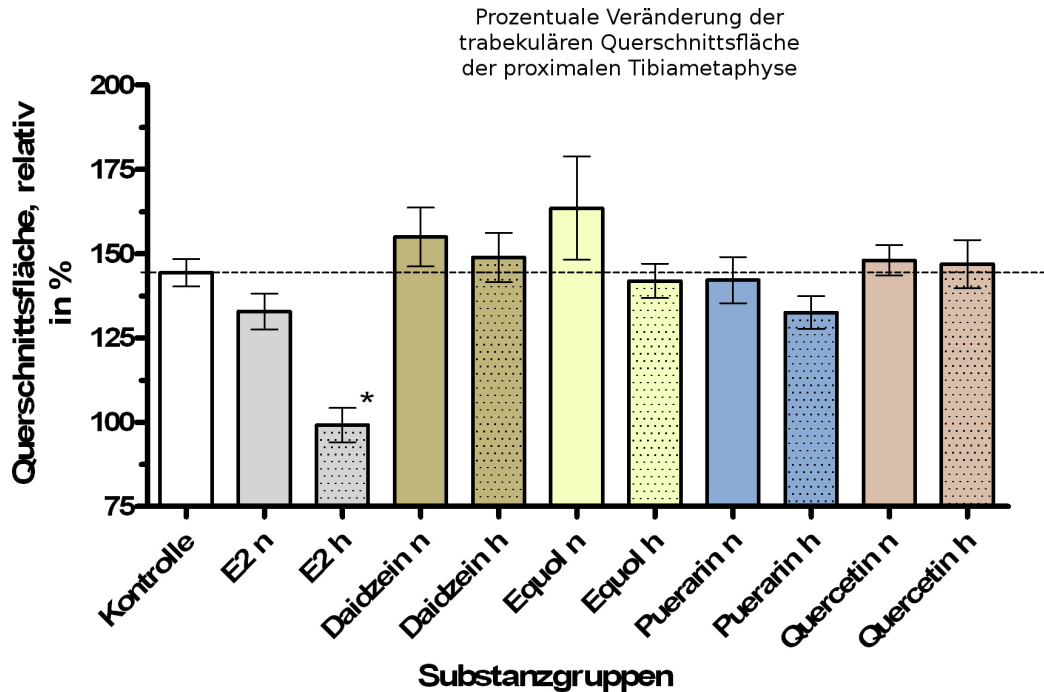


Abbildung 3.8: In der Abbildung werden die Veränderungen der trabekulären Querschnittsfläche aus den metaphysären CT-Schnitten 1 und 2 aufgetragen. Dazu wurden aus den computertomographisch ermittelten Schnittbildern 1 und 2 die verschiedenen Kompartimente über Schwächungskoeffizienten rechnerisch voneinander getrennt. * entspricht $p < 0.05$

Flächenzuwachs erhoben werden (siehe Abbildung 3.9).

3.3.5 Die Veränderung der kortikalen Querschnittsfläche der Tibia

Metaphyse (CT-Schnitt 1 und 2)

Die Abbildung 3.10 zeigt graphisch die Entwicklung der kortikalen Querschnittsfläche. Vor Beginn des Futtersversuchs betrug die durchschnittliche Kortikalisfläche 5.15 mm^2 . Davon ausgehend stieg dieser Parameter in der unbehandelten Kontrollgruppe um 13.1 %. Die einzige signifikante Entwicklung brachte die Substanzgruppe E₂ h hervor. Hierunter wurde der Ursprungswert stabilisiert. Von den phytoöstrogenen Testsubstanzen erzielten Daidzein h und Puerarin h eine Reduktion des Flächenzuwachses, ohne jedoch signifikant zu werden. So stieg dieser Wert unter Daidzein h durchschnittlich um 5.2 % und unter Puerarin h um 2.4 % (siehe Abbildung 3.10). Demnach könnte hier eine Östrogen-ähnliche Wirkungsweise vermutet werden.

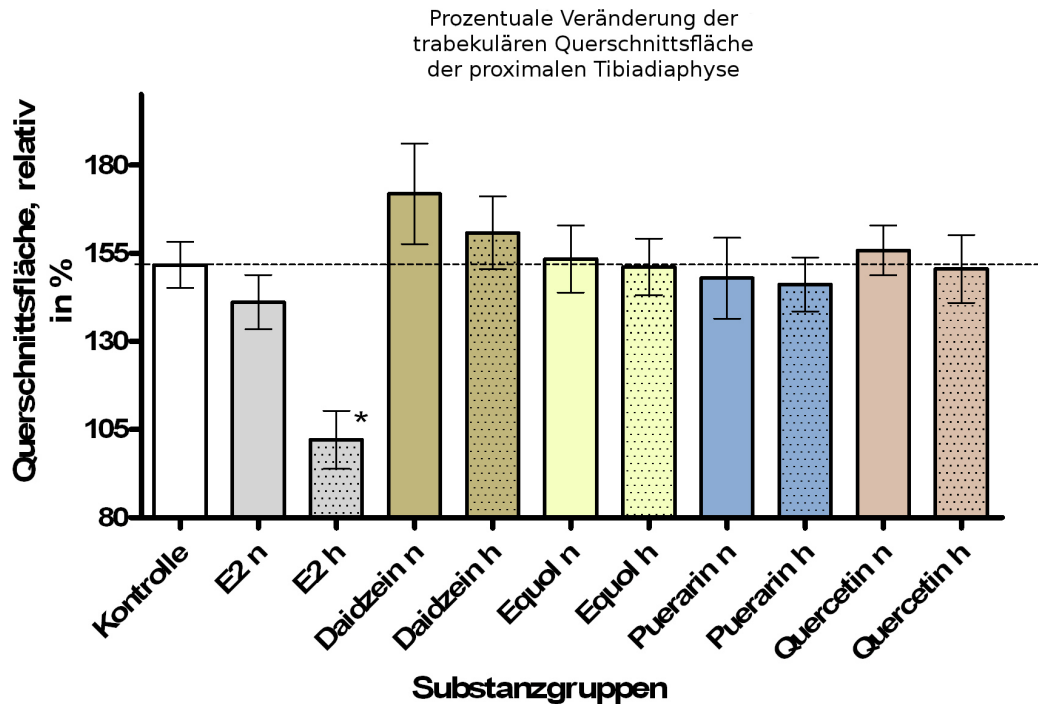


Abbildung 3.9: Dargestellt ist die Prozent-relativierte Veränderung der computertomographisch ermittelten trabekuläre Querschnittsfläche auf Höhe des CT-Schnitts 3. * entspricht $p < 0.05$

Diaphyse (CT-Schnitt 3)

Im zugrundeliegenden Futtermittelsversuch ließen sich für die kortikale Querschnittsfläche auch für den 3. CT-Schnitt ähnliche Tendenzen zeigen wie für die Metaphyse (siehe Abbildungen 3.10 und 3.11). Ausgehend von einer durchschnittlichen Kortikalisfläche von 4.1 mm^2 erreichten die unbehandelnden Kontrolltiere einen Zuwachs um 11.9 %. Von den eingesetzten Substanzen entwickelten nur die E_2 -supplementierten Tiere eine Zuwachshemmung - ohne signifikantes Ausmaß. So stieg die kortikale Fläche unter E_2 n durchschnittlich um 8.08 % und sank unter E_2 h durchschnittlich um 3.66 %. Auch im 3. CT-Schnitt konnten Daidzein h und Puerarin h eine Östradiol-ähnliche, nicht-signifikante Entwicklungstendenz hervorbringen (siehe Abbildungen 3.11). So bewirkte Daidzein h einen durchschnittlichen Zuwachs von 4.8 %. Unter Puerarin h stieg dieser Parameter um durchschnittlich 1.6 %.

3.3.6 Die Veränderung der Gesamtquerschnittsfläche der Tibia

Die Gesamtquerschnittsfläche ist nach computertomographischer und rechnerischer Aufarbeitung als kumulativer Wert aus der trabekulären und der kortikalen Querschnittsfläche

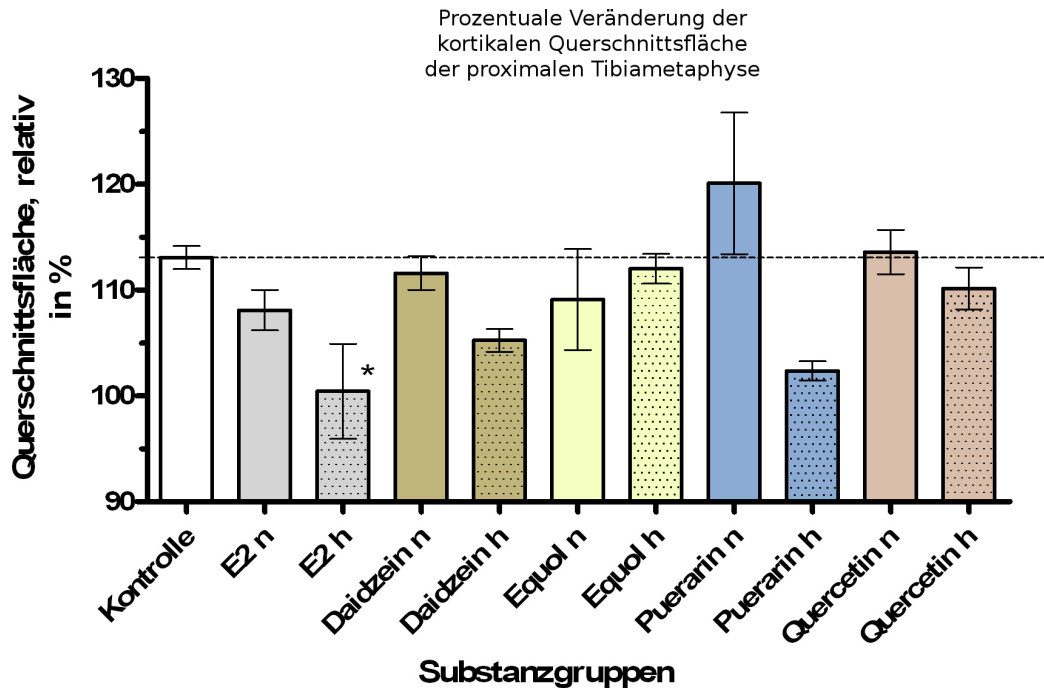


Abbildung 3.10: Dargestellt ist die Reduktion bzw. der Zuwachs der computertomographisch ermittelten kortikalen Querschnittsfläche auf Höhe des CT-Schnitts 1 und 2. * entspricht $p < 0.05$

zu betrachten. Ähnlich wie bei der Bewertung der tibialen Gesamtknochenmineraldichte im Abschnitt 3.3.3 ist auch die Aussagekraft der Gesamtquerschnittsfläche für die vorliegende Arbeit eingeschränkt. Durch gegenläufige Entwicklungstendenzen des trabekulären gegenüber des kortikalen Flächenparametern, heben sich Signifikanzen zum Teil auf.

Metaphyse (CT-Schnitt 1 und 2)

Vor dem Futtermittelversuch wurde bei der östrischen intakten Ratte eine Gesamtquerschnittsfläche der Tibiametaphyse von 14.7 mm^2 bestimmt. Unter alleinigem Östrogenmangelstoffwechsel blieb dieser Parameter bei den Kontrolltieren annähernd konstant auf 100.5 % (siehe Abbildung 3.12). Unter der hoch-dosierten E_2 -Supplementation wurde eine deutliche - nicht-signifikante - Reduktion der metaphysären Querschnittsfläche um 9.49 % ermittelt. Hintergrund für die fehlende Signifikanz ist vermutlich die extreme Wertestreuung. Innerhalb der phytoöstrogenen Testsubstanzgruppen wurde für Puerarin n eine signifikante Zunahme der metaphysären Querschnittsfläche von 15.8 % bestimmt. Dabei erzielte Puerarin vorwiegend in der Substantia corticalis eine Zunahme der Querschnitts-

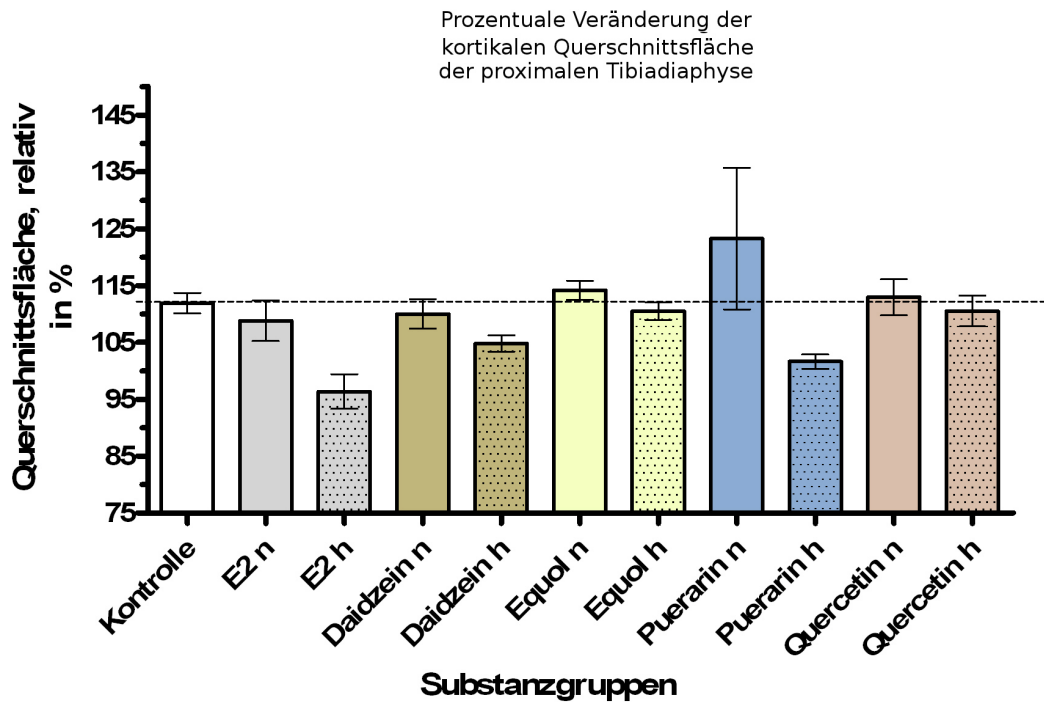


Abbildung 3.11: Dargestellt sind die Veränderungen der computertomographisch ermittelten kortikalen Querschnittsfläche auf Höhe des CT-Schnitts 3.

fläche (siehe dazu Abschnitte 3.3.4 und 3.3.5). Da unter Puerarin h ein nicht-signifikanter Flächenverlust von 2.73 % verursacht wurde, ist eine Östradiol-ähnliche Wirkungsweise zu vermuten. Für den starken Anstieg des Flächenparameters unter Puerarin n sind andere Ursachen wie die Dosis-Wirkungs-Beziehung oder die Metabolisierungsrate zum phytoöstrogenen Aglykon zu erwägen.

Diaphyse (CT-Schnitt 3)

Die Abbildung 3.13 zeigt für die einzelnen Versuchstiergruppen unterschiedliche Entwicklungen der Gesamtquerschnittsfläche auf Höhe des 3. CT-Schnitts. Der Ursprungswert der intakten Ratte betrug durchschnittlich 7.31 mm². Bei den unbehandelten Kontrolltieren blieb dieser Wert mit 99.73 % nahezu konstant. Im Gesamtvergleich bewirkte E₂ h eine deutliche, nicht-signifikante Reduktion der Gesamtquerschnittsfläche um durchschnittlich 11.5 %. Aufgrund vereinzelter starker Wertestreuungen wurde bereits wie in Abschnitt beschrieben 3.3.6 auch hier keine Signifikanz erreicht. Von allen Phytoöstrogenen zeigte auch im 3. CT-Schnitt Puerarin die auffallendste Entwicklung. Unter der Supplementation von Puerarin n stieg dieser Flächenparameter um 13.5 %. Hingegen entwickelten die Tiere

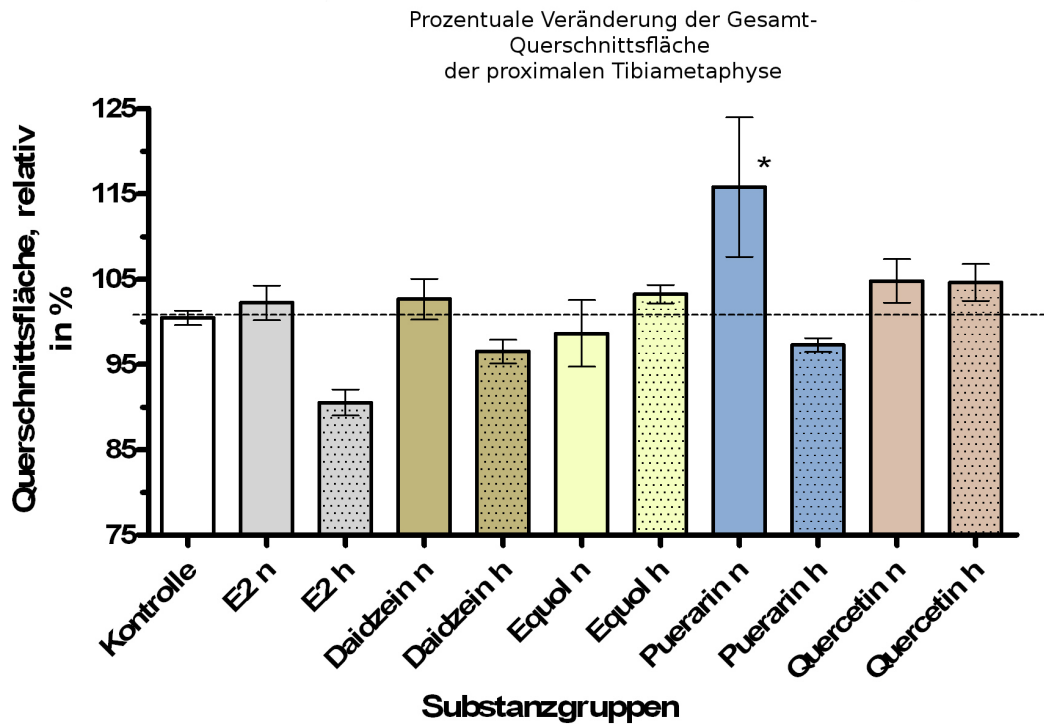


Abbildung 3.12: Die Abbildung zeigt die Reduktion der Gesamtquerschnittsfläche der Tibiametaphyse, wie sie mittels der CT-Schnitte 1 und 2 ermittelt wurde. Dazu wurde das Knochengewebe vormals rechnerisch vom umliegenden Weichteilgewebe getrennt. Die Grundlage hierfür bilden Schwellenwertlogarithmen. * entspricht $p < 0.05$

unter hoch-dosiertem Puerarin eine geringfügige Reduktion der Gesamtquerschnittsfläche um 1.83 %. Daneben zeigte Daidzein h ebenfalls einen leichten Flächenverlust von durchschnittlich 2.25 % an. Als Hintergrund ist auch hier ein Dosis-Wirkungs-Zusammenhang zu erwägen. Signifikante Entwicklungen konnten für keine der Testsubstanzen verifiziert werden.

3.3.7 Die Veränderung des endostalen Umfangs der Tibia

Der endostale Umfang entspricht auf einem Querschnittsringmodell der Tibia der inneren Grenzlinie zwischen kortikalem Knochengewebe und Markhöhle bzw. zwischen Substantia spongiosa und Substantia corticalis. Dieser Wert wird mathematisch durch logarithmische Aufschlüsselung der Schwächungskoeffizienten berechnet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit unterstützt er die Bewertung der gewebespezifischen Umbauprozesse in den Knochenkompartimenten.

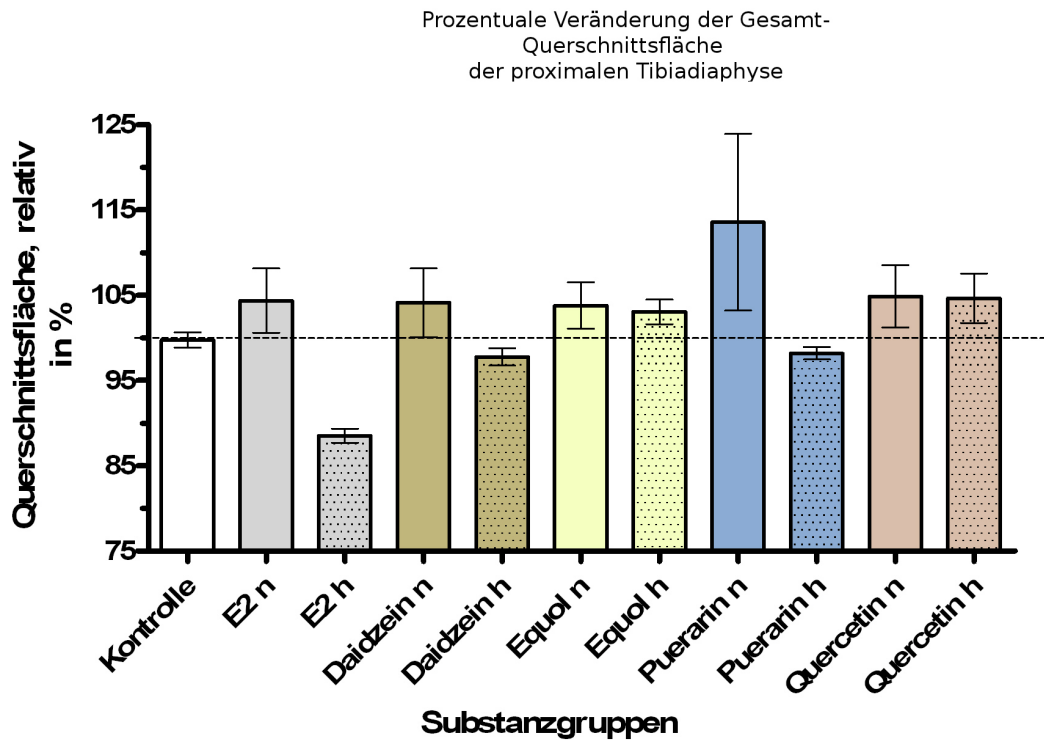


Abbildung 3.13: Abgebildet ist die Reduktion der Gesamtquerschnittsfläche auf Höhe des diaphysenwärts gerichteten CT-Schnitt 3. Dargestellt ist die Reduktion der Gesamtquerschnittsfläche der Tibia auf Höhe des diaphysären 3. CT-Schnitts. Die ausgewerteten Parameter wurden durch Schwellenwertlogarithmen rechnerisch vom umliegenden Weichteilgewebe getrennt.

Metaphyse (CT-Schnitt 1 und 2)

Die Abbildung 3.14 zeigt unterschiedlich stark ausgeprägte Entwicklungen für den endostalen Umfang in den einzelnen Substanzgruppen. Der physiologische Ausgangswert der intakten Ratte betrug durchschnittlich 10.62 mm. Bei den Kontrolltieren verminderte sich dieser Wert um durchschnittlich 7.83 %. Interessant ist die unterschiedliche Entwicklung bei den E₂-supplementierten Tieren. So entwickelte sich unter E₂ n nur eine geringfügige Abnahme um 1.01 %. Für die E₂ h konnten wir eine den Kontrolltieren ähnlich starke Abnahme des endostalen Umfangswertes um durchschnittlich 8.29 % ermitteln. Signifikanzen wurden hierbei jedoch nicht erzielt. Zu erwarten war eine Östradiol-bedingte Stabilisierung bzw. Verminderung des endostalen Umfangs. Die nahezu Wert-gleiche Entwicklung der Kontrolltiere und der E₂-h-supplementierten Tiere ist ggf. unter dem Aspekt einer nicht ausreichend hohen Östradiolanflutung im Gewebe zu sehen. Im Gesamtüberblick erreichte nur Puerarin n eine signifikante Entwicklung gegenüber der Kontrollgruppe. Der

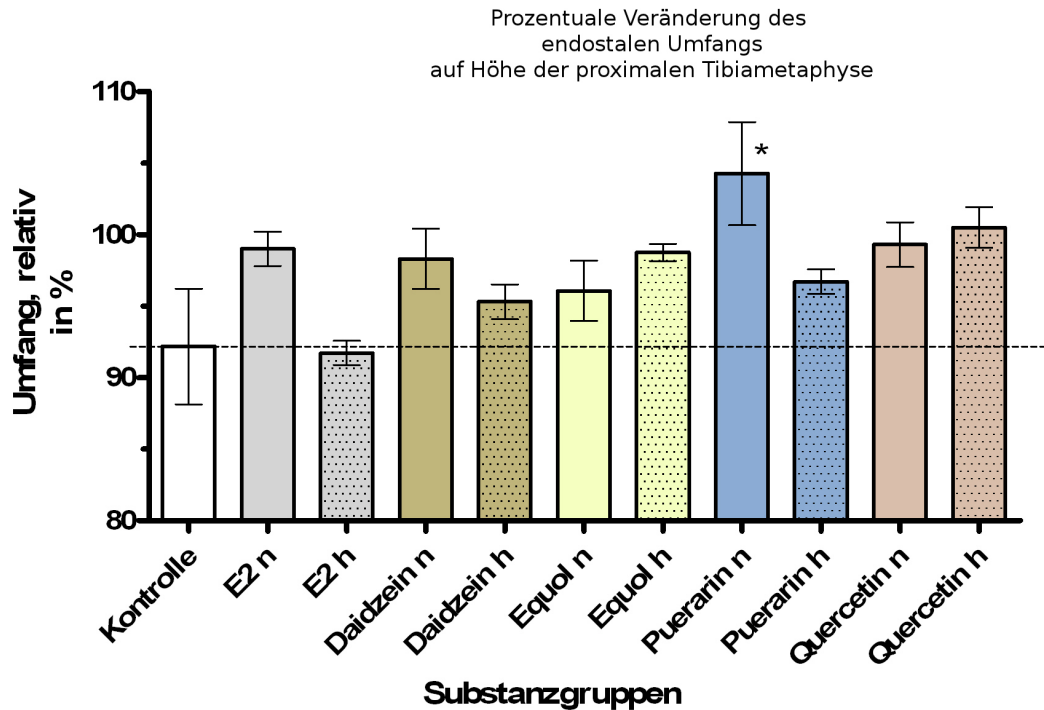


Abbildung 3.14: Diese Abbildung zeigt die Veränderungen des endostalen Umfangs der Tibiametaphyse, computertomographisch bestimmt auf Höhe der CT-Schnitte 1 und 2. * entspricht $p < 0.05$

endostale Umfang stieg in dieser Futterversuchsgruppe um durchschnittlich 4.3 % (siehe Abbildung 3.14). Gleichzeitig sank dieser Parameter unter Puerarin h nicht-signifikant um durchschnittlich 3.3 %.

Diaphyse (CT-Schnitt 3)

Die Abbildung 3.15 stellt die Entwicklungen des endostalen Umfangs der Tibiadiaphyse dar. Signifikante Entwicklungen wurden hier im Gesamtüberblick nicht erzielt. Vor Beginn des Futterversuchs betrug der physiologische Ausgangswert des endostalen Umfangs diaphysär durchschnittlich 6.35 mm. Die unbehandelten Tiere der Kontrollgruppe entwickelten unter dem Futterversuch einen Umfangsabnahme von durchschnittlich 3.9 %. E₂ h bewirkte jedoch die deutlichste Abnahme des endostalen Umfangs mit durchschnittlich 8.42 %. Dies könnte für einer Hemmung der endostalen Remodelingprozesse sprechen. Von den phytoöstrogenen Testsubstanzen konnte für Puerarin h und für Daidzein h eine leichte Umfangsabnahme verifiziert werden. Diese betrug im Durchschnitt bei Puerarin h 2.76 % und bei Daidzein h 3.23 % (siehe Abbildung 3.15). Interessant wäre, ob dieser

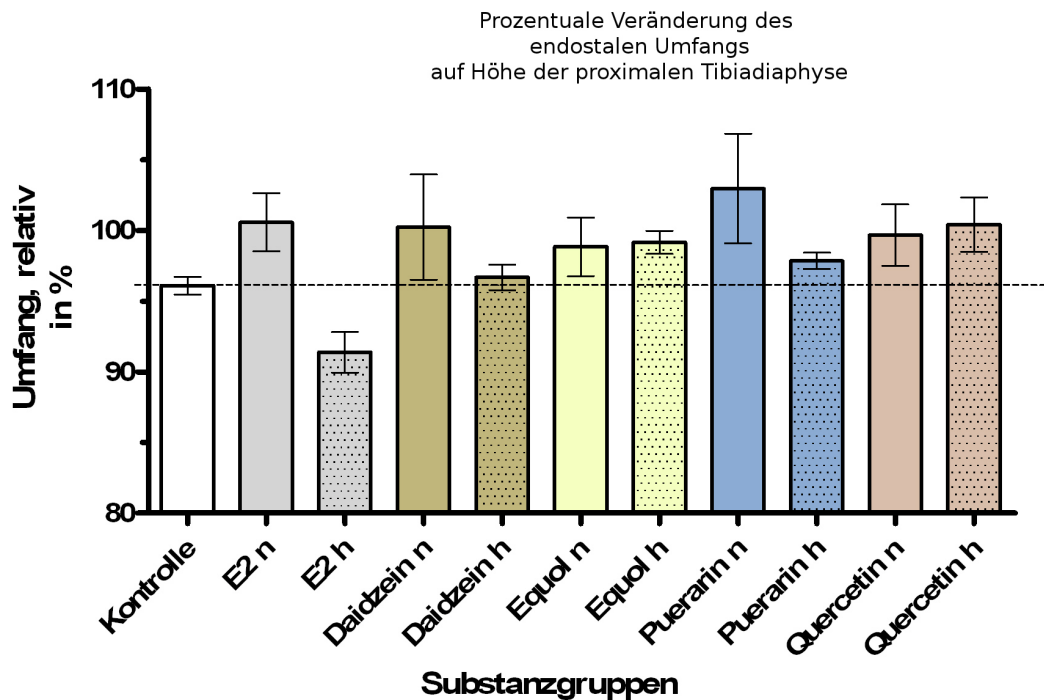


Abbildung 3.15: Diese Abbildung zeigt die Veränderungen des endostalen Umfangs des diaphysär orientierten CT-Schnitts 3 computertomographisch aufgenommen von der Ratten-Tibia.

Effekt durch eine Dosis-Steigerung deutlicher herausgearbeitet werden könnte.

3.3.8 Die Veränderung des periostalen Umfangs der Tibia

Der periostale Umfang ist definiert als die äußere Zirkumferenz, welche annähernd der Linie des Periosts entspricht. Auch an dieser Stelle dienen wiederum Schwächungskoeffizienten als Grundlage zur generellen Differenzierung von Weichteil- und Knochengewebe.

Metaphyse (CT-Schnitt 1 und 2)

Zu Beginn des Futtersversuch wurde bei den intakten Versuchstieren ein metaphysärer Umfang von durchschnittlich 13.57 mm gemessen. Wie die Abbildung 3.16 belegt, ist dieser Wert für die unbehandelten Kontrolltiere über den Versuchszeitraum stabil geblieben. Unter der Supplementation von hochdosiertem E₂ nahm der periostale Umfang nicht-signifikant um durchschnittlich 4.93 % ab. Von den Phytoöstrogenen vermittelte Puerarin n durchschnittlich eine signifikante Zunahme des periostalen Umfangs. So stieg dieser Parameter durchschnittlich um 6.3 %. Eine Östradiol-ähnliche Tendenz lässt sich am ehesten

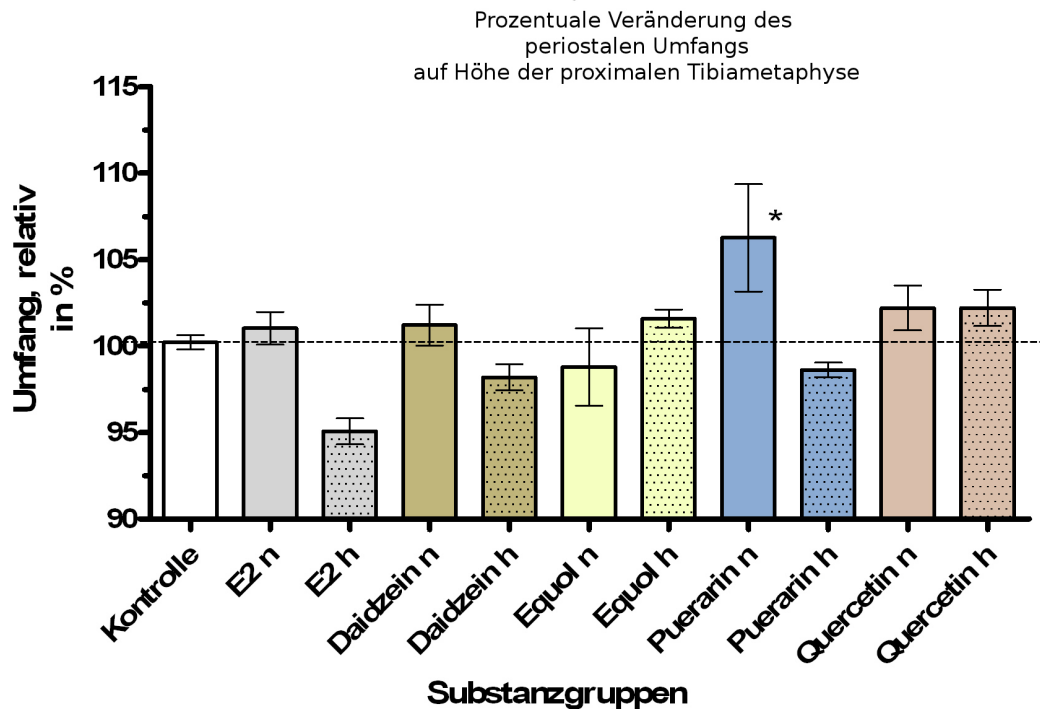


Abbildung 3.16: Diese Abbildung zeigt die Reduktion bzw. den Zuwachs des periostalen Umfangs der Tibiametaphyse; computertomographisch bestimmt auf Höhe der CT-Schnitte 1 und 2. * entspricht $p < 0.05$

für Daidzein h und Puerarin h vermuten, da hier die Umfangswerte geringfügig abnahmen (siehe Abbildung 3.16).

Diaphyse (CT-Schnitt 3)

Die Auswertung der 3. CT-Schnittebene erbrachte erneut deutlich voneinander abweichende Entwicklungen für den periostalen Umfang, welche sich vor allem in den beiden Dosierungsstärken der jeweiligen Substanz zeigten. Für die unbehandelte Kontrollgruppe zeigte sich der Außenumfang am Ende des 3-monatigen Futtersversuch stabil bei 99.85 % gegenüber dem Ursprungswert. Unter der Supplementation mit E₂ h nahm der periostale Umfang auch diaphysär am deutlichsten ab und sank nicht-signifikant um 5.93 %. Wie Abbildung 3.17 zeigt, wurde innerhalb der eingesetzten Phytoöstrogene durch Daidzein h und Puerarin h eine geringfügige Stabilisierung der Knochenzirkumferenz erzielt. Die deutlichste Zunahme dieses Parameters erzielte - ähnlich wie bereits in den metaphysären Messungen - erneut Puerarin n mit einer Zunahme von durchschnittlich 5.7 %. Insgesamt kam es jedoch zu keinem signifikanten Ergebnis.

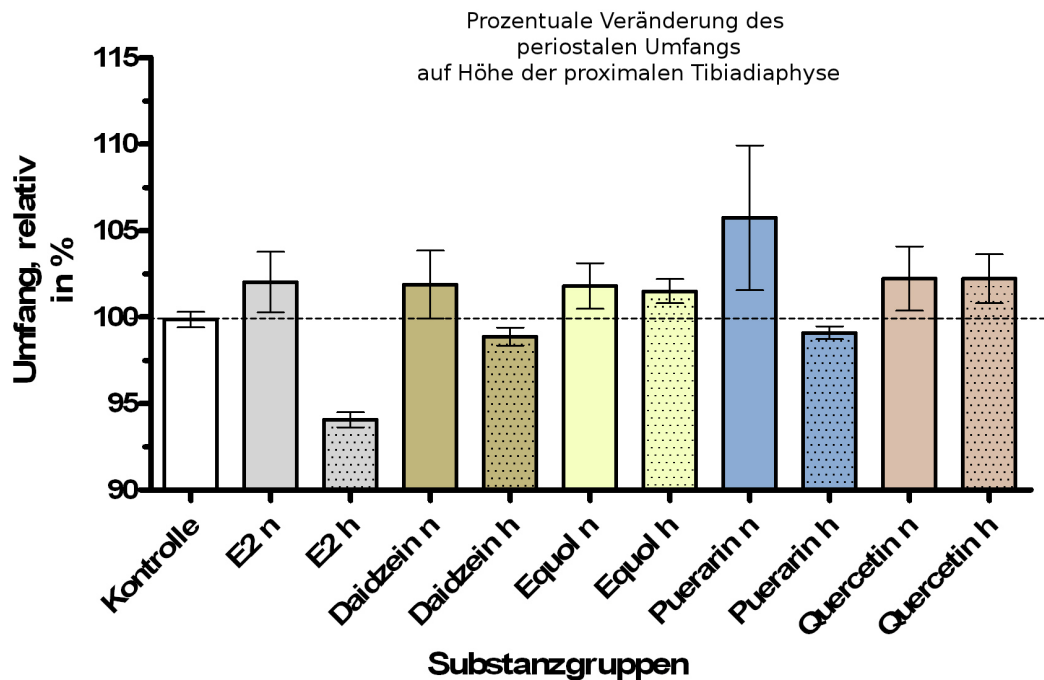


Abbildung 3.17: Diese Abbildung zeigt die Veränderungen des periostalen Umfangs des diaphysär orientierten CT-Schnitts 3; computertomographisch aufgenommen von der Ratten-Tibia.

3.4 Die Veränderungen des Knochengewebes im Bereich der Vertebra

Die Auswertung der Vertebra-Daten erfolgte grundsätzlich auf dem selben Wege wie für die Tibia. Ausgangspunkt für die Berechnung ist die erste computertomographische Messung, welche zu Beginn des Futtersversuches durchgeführt worden ist. Um die Entwicklung unter den verschiedenen Substanzen aufzuzeigen, wurde das Ergebnis der zweiten CT-Messung in eine prozentuale Relation zu dem entsprechenden Ursprungswert gesetzt. Dazu erfolgte erneut eine exakte Zuordnung von "Prä- und Post-Versuchswerten". Das Signifikanzniveau lag auch hier bei $p < 0.05$ im Vergleich zu den Ergebnissen der Kontrollgruppe. Für die Aufarbeitung der tibialen Resultate erfolgte eine schnittselektive Aufschlüsselung in die Aktivitätsebenen Metaphyse und Diaphyse. Für die Vertebra konnten keine vergleichbaren Unterschiede zwischen den CT-Schnitten 1, 2 und 3 herausgearbeitet werden, so dass alle drei Schnittebenen gemeinsam in die Auswertung eines bestimmten Parameters einfließen. Auffallend sind weniger klare Entwicklungstendenzen und höhere

Wertestreuungen, woraus wiederum weniger deutliche Effekte abgeleitet werden konnten als bei der Tibia.

3.4.1 Die Veränderung der trabekulären Knochenmineraldichte der Vertebra

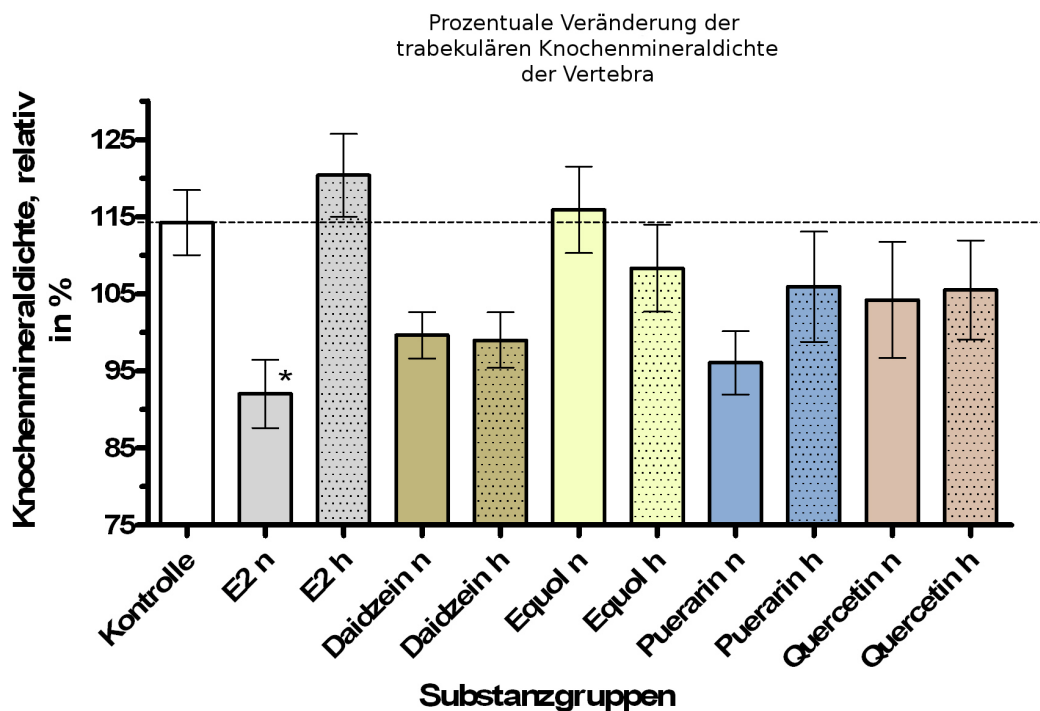


Abbildung 3.18: Diese Abbildung zeigt sowohl die Zunahme als auch die Reduktion der trabekulären Knochenmineraldichte der Vertebra. * entspricht $p < 0.05$

Bei der Betrachtung der Abbildung 3.18 zeigen sich für die Vertebra weitaus weniger klare Entwicklungstendenzen als für die Tibia. Die erste Computertomographie erbrachte für die intakte Ratte eine physiologische Knochenmineraldichte von durchschnittlich 184.81 mg/cm^3 in der Substantia spongiosa. Zum Ende des Futtersversuches zeigten die unbehandelten und ovariectomierten Kontrolltiere einen Zuwachs der trabekulären Knochenmineraldichte von durchschnittlich 14.2% auf 206.89 mg/cm^3 an. Unter E_2 h entwickelte sich ebenfalls ein ausgeprägter durchschnittlicher Dichtezuwachs von 20.4% . Von allen verglichenen Substanzen, führte lediglich E_2 n zu einer signifikanten Entwicklung. In dieser Testsubstanzgruppe kam es zu einem Verlust von durchschnittlich 7.96% der trabekulären Knochenmineraldichte. Eine ähnliche Entwicklungstendenz zeigte Puerarin n.

Hier sank die Knochenmineraldichte der Substantia spongiosa nicht-signifikant um durchschnittlich 3.95 %.

3.4.2 Die Veränderung der kortikalen Knochenmineraldichte der Vertebra

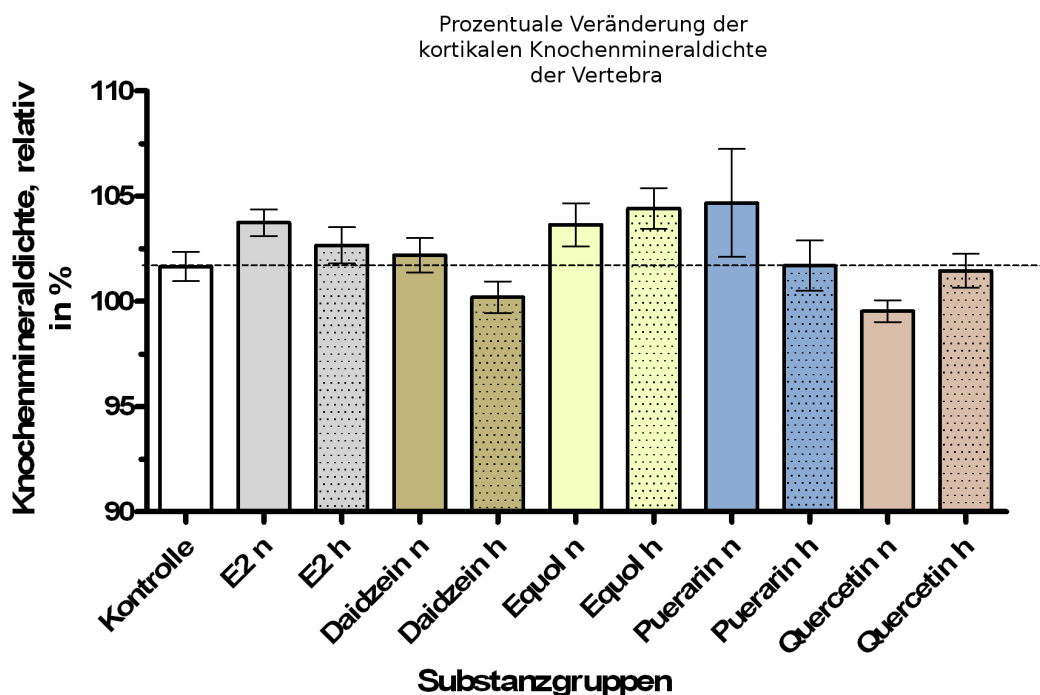


Abbildung 3.19: Diese Abbildung zeigt die mehrheitliche Zunahme der kortikalen Knochenmineraldichte der Rattenvertebra.

Die Abbildung 3.19 zeigt die Entwicklung der kortikalen Knochenmineraldichte unter dem 3-monatigem Futtersuch. Die Ergebnisse zeigen zum Teil eine größere Streubreite und konnten keine signifikante Ausprägung erreichen. In der Kontrolltiergruppe zeigte sich ein minimaler Anstieg der kortikalen Knochenmineraldichte um 1.7 % auf durchschnittlich 861.91 mg/cm³. Unter der Supplementation von E₂ entwickelte sich in beiden Dosisstärken eine leichte Zunahme der kortikalen Knochenmineraldichte gegenüber den Kontrolltieren. Von den eingesetzten Phytoöstrogenen erzielten Daidzein h und Quercetin n eine Stabilisierung der ursprünglichen Knochenmineraldichte. So lag der Durchschnittswert für die kortikale Knochenmineraldichte der kortikalen Knochenmineraldichte für Daidzein h bei 100.2 % und für Quercetin n bei 99.54 %. Dieser Werte näherte sich unter der entsprechenden anderen Dosisstärke der Entwicklung der Kontrolltiere an.

3.4.3 Die Veränderung der Gesamtknochenmineraldichte der Vertebra

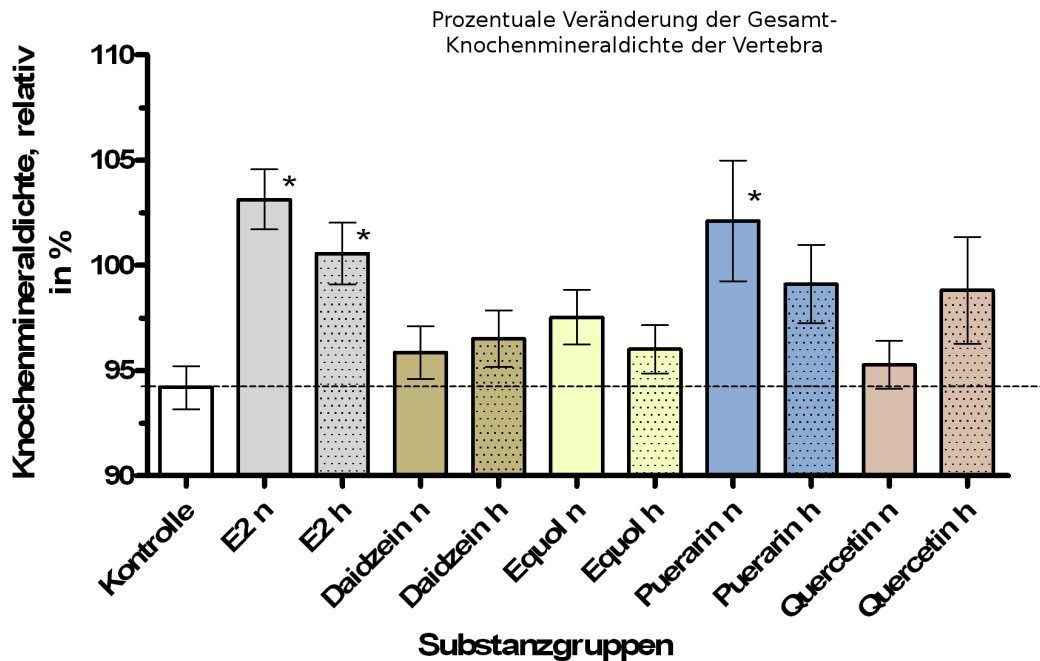


Abbildung 3.20: Diese Abbildung zeigt mehrheitlich einen Anstieg der Gesamtknochenmineraldichte für die Vertebra. *entspricht $p < 0.05$

Die Abbildung 3.20 verdeutlicht die Entwicklung der Gesamtknochenmineraldichte. Dieser Parameter wurde - äquivalent zur Tibia - wieder für den gesamten Knochenquerschnitt bestimmt. Dabei wurde der Schwächungskoeffizient zur Berechnung der totalen Knochenmineraldichte herangezogen, die der Knochen in seiner Gesamtheit erzielte.

Zu Beginn des Futtermittelsversuches ergab sich für die Gesamtknochenmineraldichte ein physiologischer Ausgangswert von durchschnittlich 568.67 mg/cm^3 . Dabei sank der Wert für diesen Parameter in der unbehandelten Kontrollgruppe um durchschnittlich 5.81 % (siehe Abbildung 3.20). Im Gesamtüberblick brachte E₂ in beiden Dosierungsstärken und Puerarin n signifikante Entwicklungen hervor. Unter der Supplementation von E₂ n nahm die Gesamtknochenmineraldichte um durchschnittlich 3.1 % zu. E₂ h stabilisierte die Gesamtknochenmineraldichte der Ratte nahe dem Ursprungsniveau. Puerarin n bewirkte eine geringfügige Dichtezunahme um durchschnittlich 2.1 %. Für die Puerarin-h-supplementierte Tierversuchsgruppe wurde nicht-signifikant eine Dichte von 99.11 % ermittelt. In den weiteren phytoöstrogenen Testsubstanzgruppen zeigte sich mehrheitlich eine Abnahme der to-

talen Knochenmineraldichte. Demnach ist eine Östradiol-äquivalente Wirkungsweise am ehesten für Puerarin zu vermuten.

3.4.4 Die Veränderung der trabekulären Querschnittsfläche der Vertebra

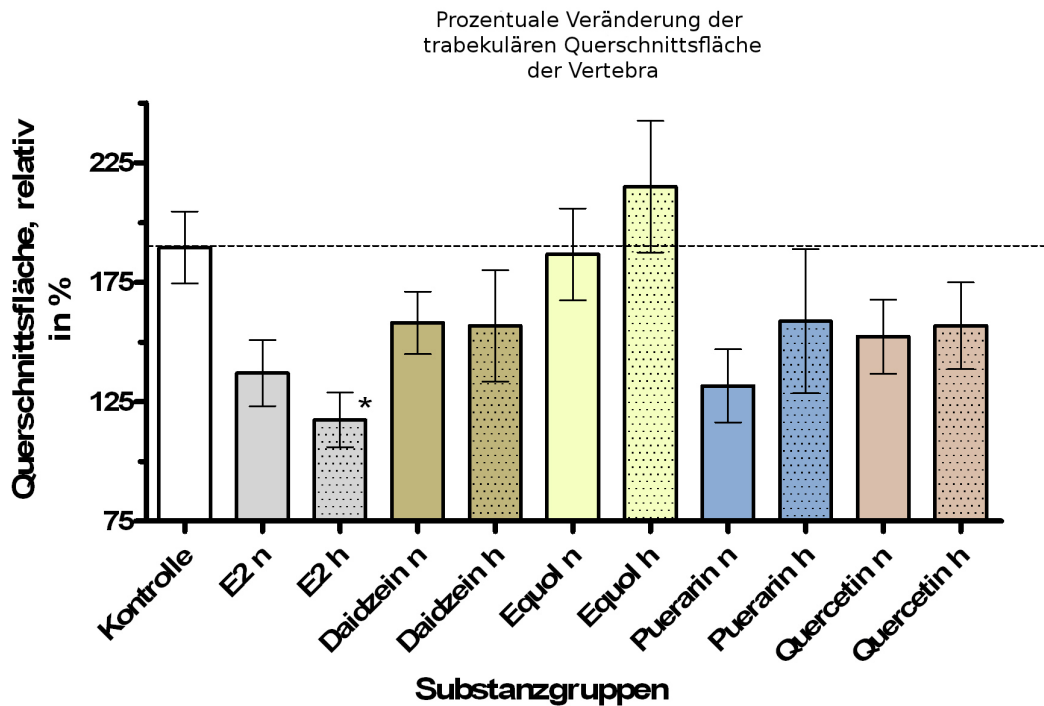


Abbildung 3.21: Die trabekuläre Querschnittsfläche der Vertebra nimmt in allen Versuchstiergruppen zu. * entspricht $p < 0.05$

Die trabekuläre Querschnittsfläche wurde aufgrund der ortsständigen Schwächungskoeffizienten mathematisch von der kortikalen Fläche getrennt. Die Abbildung 3.21 verdeutlicht nun die Entwicklung dieses Parameters im Rahmen des 3-monatigen Futterversuchs. Zu Beginn des Versuchs betrug die trabekuläre Querschnittsfläche der Kontrollgruppe durchschnittlich 4.34 mm^2 . Die unbehandelten Kontrolltiere entwickelten einen deutlichen Zuwachs der trabekulären Querschnittsfläche um 89.6 %. Für die Substanzgruppe E₂ h wurde der geringste Flächenzuwachs mit durchschnittlich 17.4 % erzielt. Damit konnte hoch-dosiertes E₂ die einzige signifikante Entwicklung im Gesamtüberblick erzielen. Einen ähnlichen Effekt erbrachte E2 n mit einem reduzierten Durchschnittszuwachs von 37 %. Von den eingesetzten Phytoöstrogenen zeigte Puerarin und Quercetin in beiden Dosierungsstärken eine Östradiol-ähnliche Tendenz. So lag der durchschnittliche

OVX-bedingte Flächenzuwachs in der Puerarin-n-Gruppe bei 131.6 % und für Quercetin h bei 135.9 %. Gegenüber der Kontrollgruppe besteht hier also ein nicht-signifikant gehemmter Flächenzuwachs (siehe Abbildung 3.21).

3.4.5 Die Veränderung der kortikalen Querschnittsfläche der Vertebra

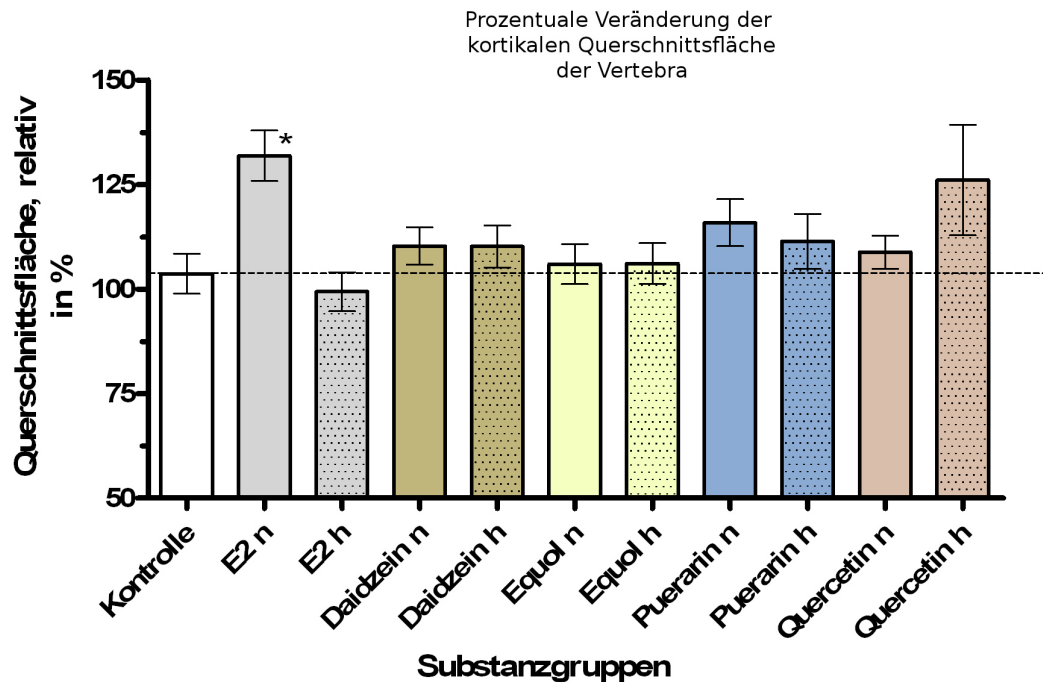


Abbildung 3.22: Diese Abbildung verdeutlicht die Zunahme der kortikalen Querschnittsfläche der Vertebra. * entspricht $p < 0.05$

Als Grundlage für die Berechnung der kortikalen Querschnittsfläche dient das Ringmodell des quergeschnittenen Knochens. Wie die Abbildung 3.22 zeigt, bleibt die kortikale Querschnittsfläche in der unbehandelten Kontrollgruppe nahezu unverändert auf ihrem physiologischen Ursprungswert von durchschnittlich 9.3 mm². Eine signifikante Beeinflussung der kortikalen Querschnittsfläche wurde nur für E₂ n nachgewiesen. Innerhalb dieser Versuchstiergruppe nahm die Querschnittsfläche der Substantia corticalis um durchschnittlich 31.9 % zu. E₂ h stabilisierte diesen Parameter jedoch mit einem Resultat von 99.4 % nahe des Ursprungsniveaus. Die eingesetzten Phytoöstrogene zeigten keine signifikanten Entwicklungen gegenüber der Kontrollgruppe. Allerdings nahm die kortikale Querschnittsfläche unter ihrem Einfluss in unterschiedlichem Ausmaß zu. So wurde

für Quercetin h der herausragendste Flächenzuwachs von 26.1 % bestimmt. Unter der Supplementation von Puerarin n wurde eine Größenzunahme von 15.9 % ermittelt (siehe Abbildung 3.22).

3.4.6 Die Veränderung der Gesamtquerschnittsfläche der Vertebra

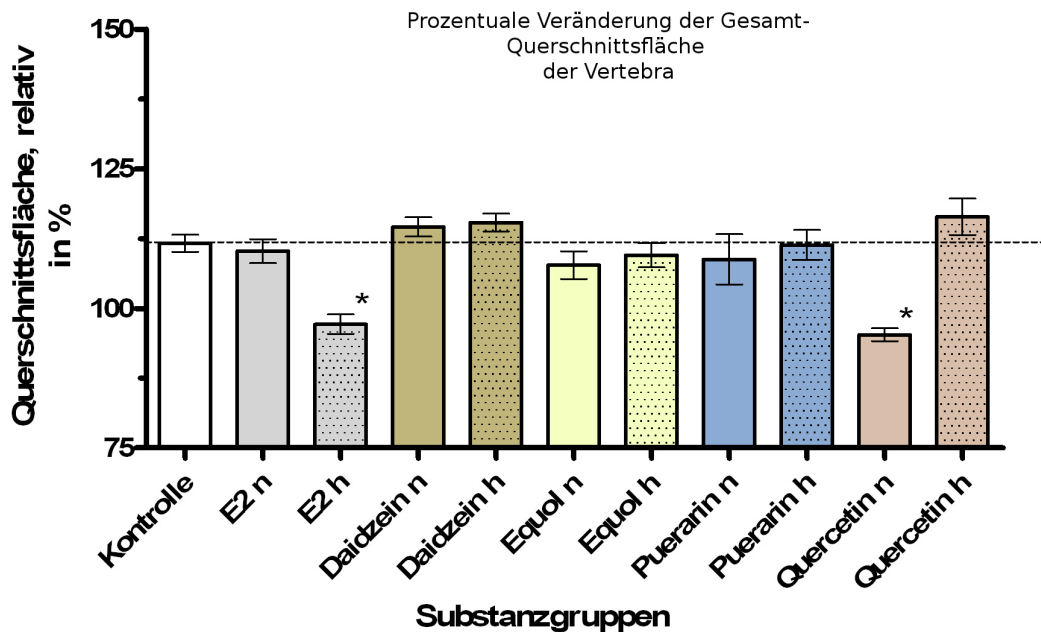


Abbildung 3.23: Diese Abbildung zeigt für die Gesamtquerschnittsfläche der Vertebra unterschiedliche Entwicklungstendenzen. * entspricht $p < 0.05$

Wie bereits bei der Aufarbeitung der Tibia-Querschnittsfläche in Abschnitt 3.3.6 beschrieben wurde, handelt es sich bei der Gesamtquerschnittsfläche um einen additiven Wert aus den Bereichswerten für Substantia spongiosa und Substantia corticalis. Die Abbildung 3.23 verdeutlicht eine Zunahme der Gesamtquerschnittsfläche für die Mehrzahl der einzelnen Testsubstanzgruppen - mit Ausnahme der Gruppe E₂ h und Quercetin n. Die Tiere der Kontrollgruppe zeigten für die Gesamtquerschnittsfläche einen physiologischen Ausgangswert von durchschnittlich 30.35 mm². Sie entwickelten unter dem Futtermittelversuch einen Flächenzuwachs von durchschnittlich 11.7 %. Die Supplementation von E₂ h führte zu einer signifikanten Entwicklung und bewirkte eine geringfügige Reduktion der vertebralen Gesamtquerschnittsfläche um durchschnittlich 2.85 %. Dieses Ergebnis korreliert ebenfalls mit der Reduktion der trabekulären Querschnittsfläche durch E₂ h (siehe Abbil-

derung 3.21). Von den eingesetzten Phytoöstrogenen erzielte Quercetin n ein signifikantes Ergebnis. So sank dieser Parameter unter Quercetin-n-Supplementation um 4.72 %. Ein Östradiol-ähnlicher Effekt ist hier zu diskutieren.

3.4.7 Die Veränderung des endostalen Umfangs der Vertebra

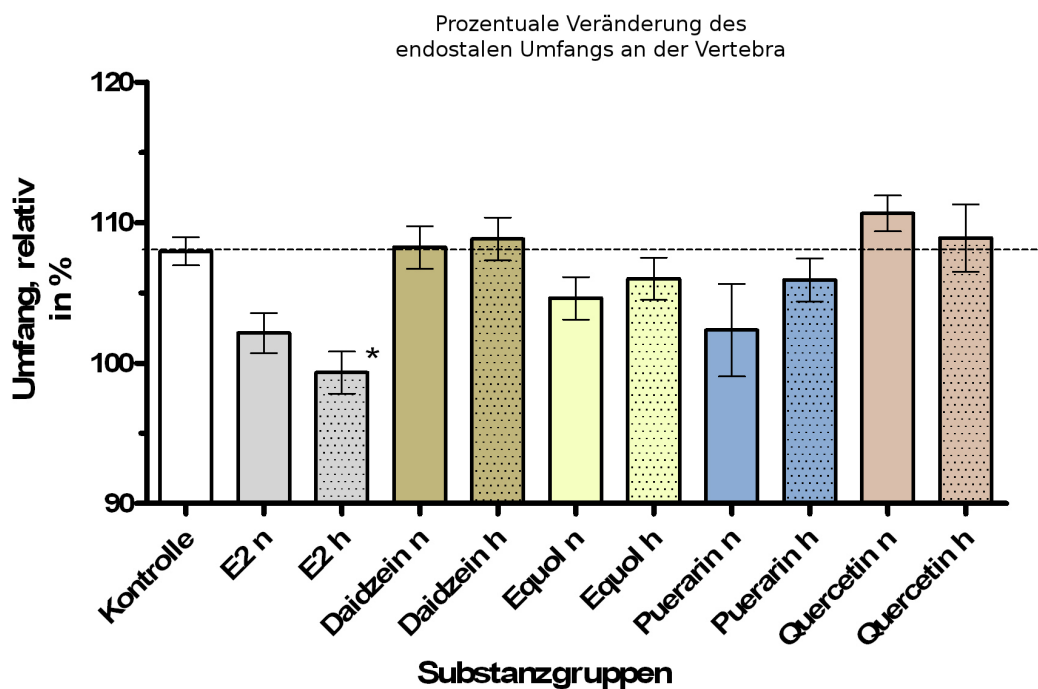


Abbildung 3.24: Gemäß dieser Abbildung nimmt der endostale Knochenumfang der Vertebra mehrheitlich zu. * entspricht $p < 0.05$

Die Abbildung 3.24 verdeutlicht die Entwicklung des endostalen Umfangs der Vertebra. Der Wert entspricht der inneren Grenzlinie zwischen der Substantia spongiosa und Substantia corticalis. Für den endostalen Umfang der Vertebra wiesen wir in beinahe allen Versuchstiergruppen eine Zunahme nach. Dies lässt die Vermutung eines endostal vermehrten Knochenabbaus zu. In der unbehandelten Kontrollgruppe lag der Ausgangswert für den endostalen Umfang bei durchschnittlich 16.28 mm. Nach Abschluss des 3-monatigen Futtersversuches wurde hier eine Zunahme dieses Parameters um 8 % ermittelt. E₂ h bewirkte als die einzige der eingesetzten Substanzen eine signifikante Entwicklung. In dieser Tierversuchgruppe wurde der Umfang mit durchschnittlich 99.32 % nahezu stabil gehalten. Bei den E₂-n-supplementierten Tieren zeigte sich eine ähnliche, nicht-signifikante Entwicklung mit einem abschließenden Umfangswert von durchschnittlich 102.1 %. Es ist

davon auszugehen, dass die Remodelingvorgänge hier weitestgehend ausgeglichen werden konnten. Von den eingesetzten Phytoöstrogenen verursachte am ehesten Puerarin Östradiol-ähnliche Tendenzen. So betrug der endostale Durchschnittsumfang zum Versuchsende unter Puerarin n 102.3 % und unter Puerarin h 105.9 % (siehe Abbildung 3.24). Ähnliche Resultate erbrachte Equol mit einer durchschnittlichen Umfangszunahme von 4.6 % in der niedrig-dosierten Gruppe und von 6 % für Equol h.

3.4.8 Die Veränderung des periostalen Umfangs der Vertebra

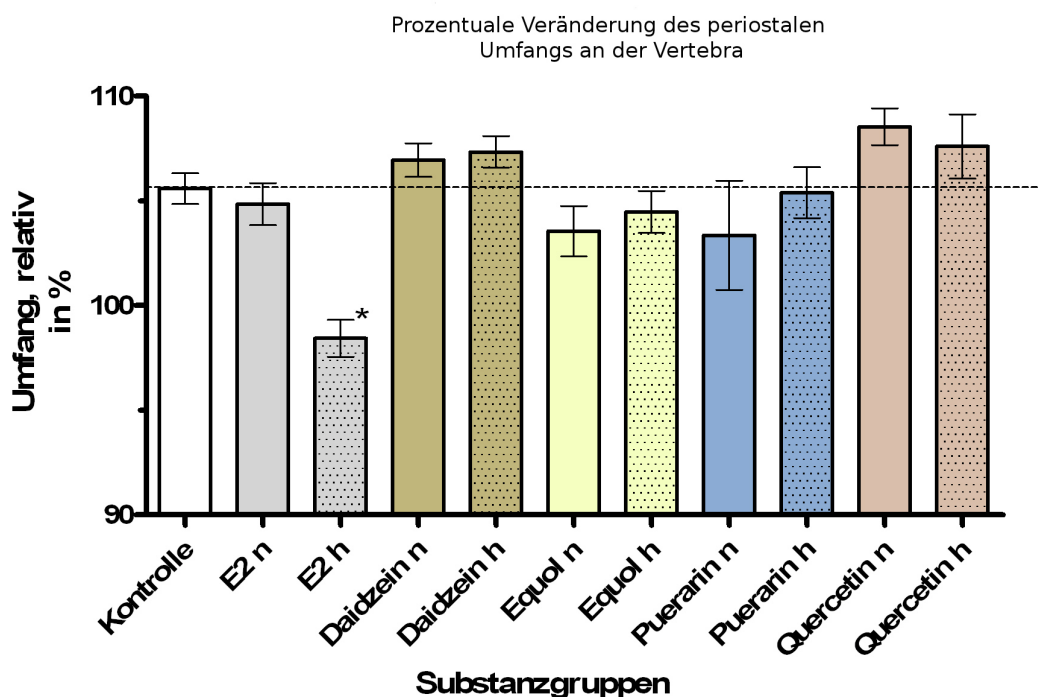


Abbildung 3.25: Der periostale Knochenumfang der Vertebra steigt in nahezu allen Versuchstiergruppen. * entspricht $p < 0.05$

Die Abbildung 3.25 zeigt die verschiedenen Veränderungen des periostalen Umfangs. Hier nahmen die Entwicklungen einen ähnlichen Verlauf wie im Bezug auf den endostalen Vertebra-Umfang. In der Kontrollgruppe wurde ein Ausgangswert von durchschnittlich 19.52 mm bestimmt. Bis zum Ende der Futterstudie entwickelten die unbehandelten Tiere dieser Gruppe eine Zunahme des periostalen Umfangs um 5.6 %. In der Gesamtübersicht wurde die einzige signifikante Entwicklung durch E₂ h hervorgebracht. So nahm der hier bestimmte Parameter durch die 3-monatige Supplementation von E₂ h um 1.57 % ab. Alle untersuchten Phytoöstrogene verursachten eine Zunahme des periostalen Vertebra-

Umfangs in unterschiedlichem Ausmaß. Die deutlichste Hemmung der Umfangszunahme wurde für Equol n und Puerarin n gemessen (siehe Abbildung 3.25). Demnach betrug der durchschnittliche Zuwachs dieses Parameters unter Equol h 3.6 % und unter Puerarin n 3.4 %. In den höher-dosiert-supplementierten Gruppen zeigten sich ähnliche Tendenzen mit einer abgeschwächten Ausprägung.

3.5 Die Auswertung der Serumparameter

Nach Abschluss des 3-monatigen Futtersversuchs wurden die knochenstoffwechsellanzeigenden Serummarker Osteocalcin sowie β -CrossLaps bestimmt. Eine Erhöhung des Serumosteocalcins spricht für eine vermehrte Aktivität der Osteoblasten. Dem gegenüber steht β -CrossLaps als Signalmarker für einen erhöhten Osteoklastenstoffwechsel. Die folgenden beiden Abschnitte verdeutlichen den Serumspiegel dieser Marker zum Ende des 3-monatigen Futtersversuchs. Anhand dieser Resultate kann der Einfluss der Phytoöstrogene auf die Osteoblasten und Osteoklasten mitbeurteilt und diskutiert werden.

3.5.1 Die Entwicklung des Serum-Osteocalcins

Die Abbildung 3.26 zeigt den Serumosteocalcin-Status nach 3-monatiger Phytoöstrogen-supplementation. Bei den unbehandelten Kontrolltieren zeigte sich ein durchschnittlicher Serumentiter von 19.17 ng/ml. Unter E_2 -Supplementation ist eine Suppression dieses Parameters zu vermuten. Dies konnten wir für E_2 h auch bestätigen. Hier verifizierten wir einen verminderten Serumentiter von 7.44 ng/ml mit signifikanter Ausprägung. Ähnliche Tendenzen zeigte E_2 n mit einem Durchschnittswert von 15.65 ng/ml. Von den untersuchten Phytoöstrogenen wurde für Quercetin n die einzige signifikante Entwicklung nachgewiesen. Hier stieg der Osteocalcinspiegel auf 27.18 ng/ml. Demnach ist an dieser Stelle eine Aktivierung der Osteoblasten durch dieses Phytoöstrogen zu diskutieren.

3.5.2 Die Entwicklung der Serum- β -CrossLaps

Die Abbildung 3.27 erlaubt einen Rückschluss über mögliche Einflüsse der Phytoöstrogene auf die β -CrossLaps-Ausschüttung. Für die unbehandelte Kontrollgruppe konnten wir einen Durchschnittswert von 29.75 ng/ml erheben. Unter der Supplementation von E_2 n lag dieser Serumspiegel durchschnittlich bei 33.14 ng/ml und unter E_2 h bei 26.92 ng/ml. Von beiden Substanzgruppen wurde keine Signifikanz erreicht. Dennoch ist von einer Hemmung der Osteoklastenaktivität unter E_2 -h-Substitution auszugehen. Den einzigen signifikanten Wert brachte Puerarin h hervor (siehe Abbildung 3.27). Hier konnten wir eine

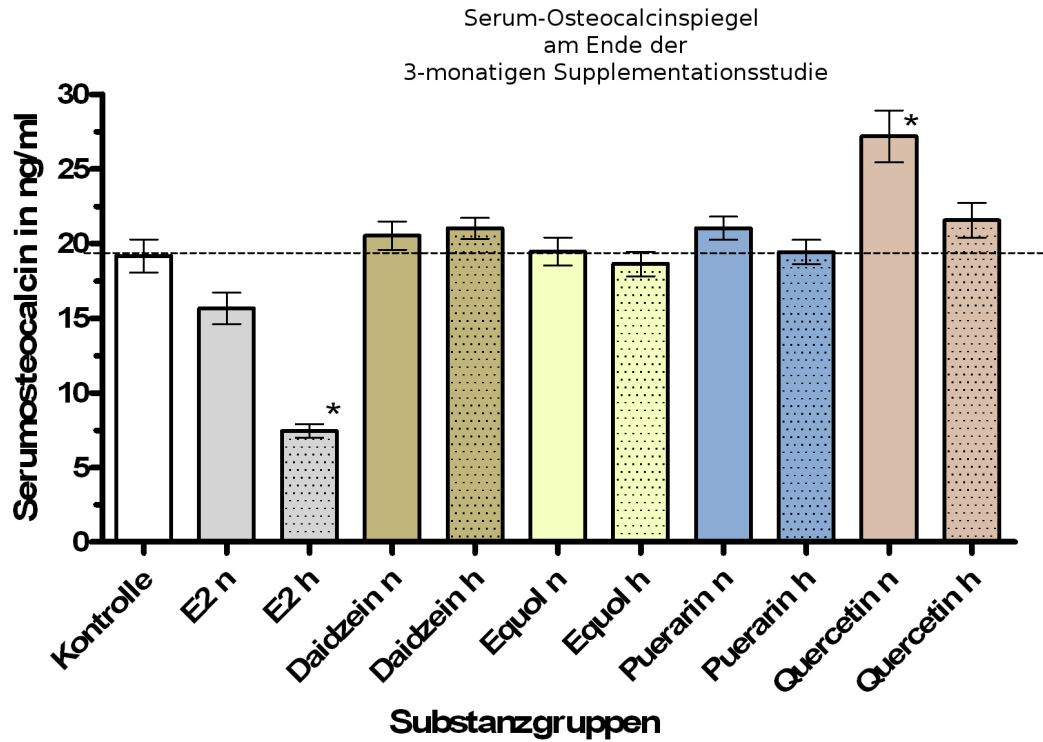


Abbildung 3.26: In dieser Abbildung wurden die laborchemisch ermittelten Seruntiter von Osteocalcin graphisch dargestellt. * entspricht $p < 0.05$

Erhöhung der Serum- β -CrossLaps auf 45.09 ng/ml ermitteln. Unter Puerarin n zeigten sich ähnlich hohe Werte mit 39.69 ng/ml - ohne jedoch eine Signifikanz zu erreichen. Demnach ist hier eine Stimulation der Osteoklasten denkbar.

Die niedrigsten Werte wurden für Daidzein in beiden Dosierungen und für Equol h nachgewiesen (siehe Abbildung 3.27). Hierbei wurden die Serumspiegel der Kontrolltiere sogar unterschritten. Obwohl diese Werte nicht signifikant waren, könnte man an dieser Stelle über einen Östradiol-äquivalenten, hemmenden Effekt auf die Osteoklasten spekulieren.

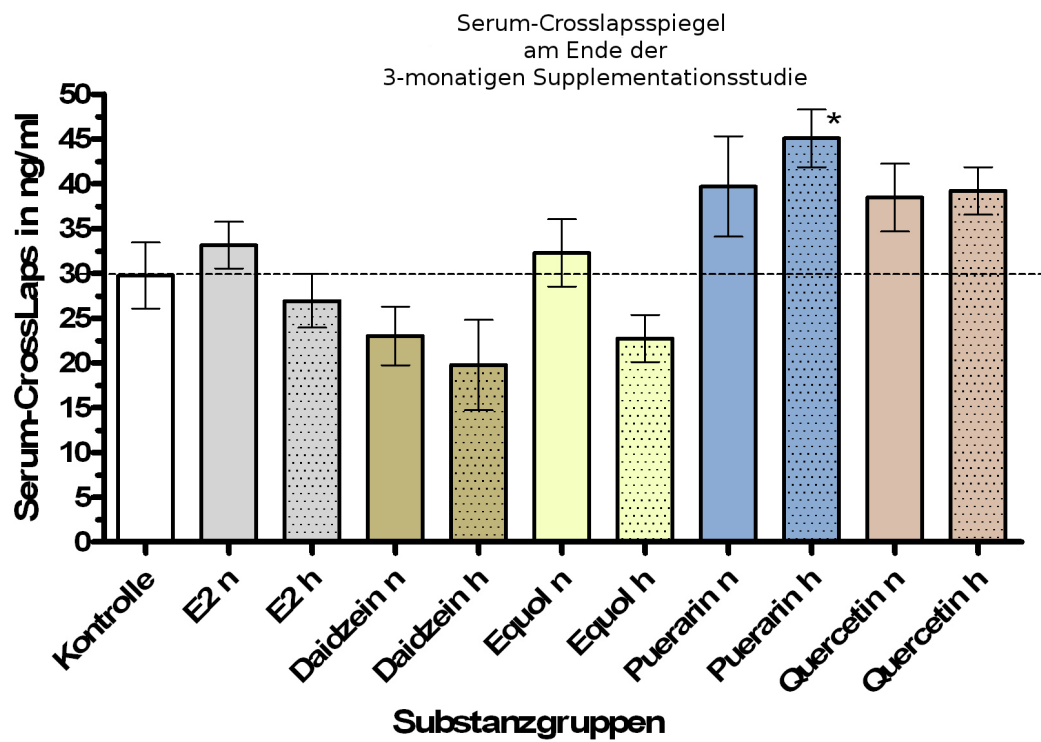


Abbildung 3.27: Diese Abbildung zeigt den Seruntiter für β -CrossLaps am Ende des 3-monatigen Futtersversuchs. * entspricht $p < 0.05$

4 Diskussion

4.1 Phytoöstrogensupplementation am Osteoporose-Tiermodell

Phytoöstrogene verfügen über anti-osteoporotische bzw. osteo-anabole Wirkungen (Leggette et al. 2009; Rishi 2006; Yamaguchi 2006). Die Osteoporoseforschung beschäftigt sich daher u. a. mit der Frage nach einer therapeutischen Effizienz dieser Wirkstoffgruppe bei der Behandlung der postmenopausalen Osteoporose. Substitutionsstudien an der OVX-Ratte gelten in diesem Zusammenhang als wissenschaftlicher Goldstandard (Inada et al. 2011; Francisco et al. 2011; Kharode et al. 2008; Lelovas et al. 2008; Jee und Yao 2001).

In einem überschaubaren Zeitraum von wenigen Monaten bietet sie ein repräsentatives Abbild der post-menopausalen Osteoporose. Die Ovariectomie der Ratte induziert einen Östrogenmangel, welcher die Knochenstoffwechselfvorgänge beschleunigt - insbesondere das Remodeling intensiviert - und damit zu einem dominierenden Knochenabbau führt (Kalu 1991). Messbar wird dieser Umstand an einer deutlichen Reduktion der Knochenmineraldichte (Riggs et al. 2002; Manolagas 2000). So sank dieser Wert nach einem 3-monatigen Versuchszeitraum in unserer Studie um bis zu 55 % (siehe dazu Abschnitt Kontrollgruppe 3.2). Diese Entwicklung ist sowohl bei der post-menopausalen Frau als auch bei der OVX-Ratte unter einer Hormonersatztherapie bis zu einem gewissen Ausmaß reversibel (Kharode et al. 2008).

Phytoöstrogene wirken osteoprotektiv (Rishi 2006; Gültekin und Yildiz 2006; Lamariniere et al. 2002). Die jeweilige Rezeptoraffinität sowie die Bioverfügbarkeit kann dabei im Vergleich zum 17β -Östradiol als auch untereinander variieren.

In dieser Arbeit sollte nun der Einfluss der Phytoöstrogene Daidzein, Equol, Puerarin und Quercetin auf die Osteoporose der Versuchstiere untersucht werden, wenn man direkt nach der Ovariectomie mit der Substitution dieser Pflanzenstoffe beginnt.

Für die vorliegende Arbeit ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Welche Veränderungen zeigen Körpergewicht und Futteraufnahme unter dem Einfluss der eingesetzten Phytoöstrogene?

- Kann die OVX-induzierte Osteopenie bzw. Osteoporose durch die Supplementation reduziert werden?
- Welche Veränderungen zeigen hierbei Tibia und Vertebra der OVX-Ratten auf die Wirkstoffe?
- Welche Veränderungen lassen sich anhand der knochenspezifischen Serumparameter zeigen?

4.2 Die Wahl des Wirkstoff-Substitutionsweges

Bei dieser Arbeit wurden die Phytoöstrogene peroral über das Futter supplementiert. Daher ist die enterale Resorptionsfähigkeit ein entscheidender Faktor für die Bioverfügbarkeit dieser Pflanzenstoffe. Bislang gibt es nur wenige Studien, welche sich mit der Pharmakokinetik oral aufgenommener Phytoöstrogene bei der Laborratte beschäftigen. Darüber hinaus bestehen diese Ergebnisse nur für bestimmte Vertreter der Phytoöstrogene bzw. einige ihrer Stoffgruppen. Eine dieser Untersuchungen am enteralen Ratten-Resorptionsmodell konnte zeigen, dass nur 2.6 % des zur Verfügung stehenden Daidzins resorbiert werden (Rishi 2006). Diese Ergebnisse deuten auf eine gewisse Übereinstimmung bei Mensch und Ratte hin. Schließlich werden auch im menschlichen Organismus *aglyconisch* vorliegende Isoflavone schneller aufgenommen als β -Glykoside (Krishna und Somashekhar 2006). Da die Isoflavone hauptsächlich als *Glykoside* in der Nahrung enthalten sind, ist ihre Resorption erst nach enzymatischer Hydrolyse des Glukoserestes möglich. Vermittelt wird diese Reaktion durch die β -Glykosidasen der Dünndarmflora (Krishna und Somashekhar 2006).

Übereinstimmend für Mensch und Rattenmodell lässt sich feststellen:

Die Enzymausstattung der Darmbakterien entscheiden über das Resorptionsvermögen gegenüber Isoflavonen und damit über ihre Bioverfügbarkeit. Eine Sonderstellung nehmen scheinbar die Flavonoide ein. So wird intaktes Quercetin quantitativ besser resorbiert als in Form seines *Aglycons* (Rishi 2006).

4.3 Die Entwicklung des Körpergewichts post-OVX

Der Östrogenmangelstoffwechsel der Postmenopause bzw. nach der OVX bewirkt einen Zuwachs des Körpergewichts (Hanstein 2007; van Seumeren 2000). Hier fehlt der zentral hemmende Einfluss des Östrogens auf die Signaltransduktion, welche für die Minderung des Hungergefühls verantwortlich ist (Bernstein 2007). Die folglich induzierte Gewichtszunahme wird beim Menschen auch unter knochenprotektiven Aspekten gesehen. Dem-

nach vermindert sich das Frakturrisiko unter Zunahme des Körpergewichts (Wronski et al. 1987).

Unsere Futterstudie belegt für die Mehrzahl der Tiere eine Zunahme des Körpergewichts nach der Ovariectomie. So entwickelten die unbehandelten Tiere eine Gewichtszunahme um 40.3 % ihres ursprünglichen Körpergewichts. Da die Kontrolltiere nicht gleichzeitig die Testsubstanzgruppe, mit der höchsten täglichen Futteraufnahme waren, scheinen für diese Resultate noch andere Faktoren eine Rolle zu spielen.

4.3.1 Die Wirkung von Östrogen auf das Körpergewicht und die Futteraufnahme

Wenn wir von der Hypothese ausgehen dürfen, dass Östrogene ein zentral dämpfender Regulator für das Hungergefühl sind, sollte die Supplementation dieses Hormons eine Normalisierungstendenz des Körpergewichts herbeiführen. Dabei ist neben den zentral wirksamen Effekten auch die anabole Stoffwechselwirkung des E_2 relevant, welche die Strukturebenen Muskel und Knochen sowie damit auch das Körpergewicht mitbeeinflusst.

Anhand unserer Ergebnisse können wir nun eine Hemmung des Gewichtszuwachses für die E_2 -gefütterten Tiere bestätigen. Sie wiesen eine signifikant verminderte Gewichtszunahme bzw. sogar einen Gewichtsverlust in der E_2 -h-Gruppe auf (siehe Abbildung 3.1). Die E_2 -h-Gruppe präsentierte zusätzlich die geringste tägliche Futteraufnahme in Höhe von 11.65 g/Tag (siehe Tabelle 3.1).

4.3.2 Die Wirkung der Phytoöstrogene auf das Körpergewicht und die Futteraufnahme

Aus verschiedenen humanwissenschaftlichen Studien wissen wir, dass Isoflavone einen anabolen Effekt auf die Muskelmasse besitzen und den postmenopausalen Zuwachs an Fettdepots abmildern (Mattei et al. 2006). Vergleichbare oder ähnliche Wirkungen gibt es auch am Tiermodell. An genetisch bedingt fettleibigen Mäusen konnte ein gewichtsreduzierender Effekt von sojahaltigem Futter festgestellt werden (Mattei et al. 2006). Ørgaard et al. wiesen eine direkte Wirkung von Isoflavonen auf das Fettgewebe mit divergierenden Entwicklungen nach. So konnte für Daidzein konzentrationsabhängig ein bi-phasisches Verhalten gezeigt werden: Plasmakonzentrationen unter 20 $\mu\text{mol/L}$ bewirken eine Hemmung der Adipozytogenese, Konzentrationen über 30 $\mu\text{mol/L}$ eine Stimulation der Fettzell-Differenzierung (Ørgaard und Jensen 2008).

Von den untersuchten Phytoöstrogenen konnten wir für Puerarin h eine signifikant ab-

geschwächte Gewichtszunahme nach der Ovariectomie bestätigen (siehe Abbildung 3.1). Eine ähnliche Tendenz zeigten Daidzein h und Equol h ohne dabei eine Signifikanz zu entwickeln. Es existieren Tierfutter-Studien, welche die Wirkung von mehreren Isoflavonen auf das Gewichtsverhalten und das Fettgewebe mittels sojahaltigem Futter untersuchten. Hierbei wurde ein protektiver Effekt von Isoflavonen auf die OVX-induzierte Gewichtszunahme von mehreren Studien bestätigt (Zhang Y-B et al. 2010; Sehmisch et al. 2010a; Lamartiniere et al. 2002): Unter Zuführung eines sojahaltigen Futters zeigten Zhang et al. eine reduzierte Ausschüttung hypothalamischer Neuropeptide an der OVX-Ratte, welche für die Vermittlung des Hungergefühles verantwortlich sind.

Eine eindeutig gleichgerichtete oder inverse Korrelation von täglicher Futterraufnahme und Gewichtsentwicklung können wir bei der Betrachtung unserer Ergebnisse nicht mit einer Signifikanz bestätigen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen für den Isoflavonvertreter Genistein. Bitto et al. konnte hier nachweisen, dass die Genisteinsupplementation bei OVX-Ratten zwar zu einer Gewichtsreduktion, jedoch nicht zu einer Verminderung der täglichen Futtermenge führte (Bitto et al. 2009). Davon unabhängig gibt es weiterhin versuchsgebundene Einflüsse - wie etwa gustatorische Effekte des Futters - zu bedenken, welche die Futterraufnahme positiv wie negativ mitbeeinflussen, hier aber nicht näher betrachtet wurden, da deren Differenzierung schwierig ist.

Anhand unserer Ergebnisse lässt sich auf jeden Fall eine gewichtsreduzierende Wirkung des Isoflavons Puerarin vermuten. Eine genauere Unterscheidung in zentralhemmende Einflüsse auf das Hungergefühl oder Einwirkungen auf die Energiehomöostase ist anhand unserer Untersuchung jedoch nicht möglich.

4.4 Östradiol als Positivkontrolle

Die Ovariectomie verursacht bei der Labormaus das typische Bild einer Typ-I-Osteoporose. Im Gegensatz dazu vermindert die anschließende Supplementation von 17β -Östradiol den zu erwartenden Knochenschwund (Hughes et al. 1996; Wronski et al. 1988). Dieser Mechanismus findet Bestätigung durch zahlreiche Untersuchungen am OVX-Mausmodell (Kharode et al. 2008; Hunziker et al. 2000; Wronski et al. 1988). Die E_2 -gefütterten Tiere dienten in unserer Untersuchung als Positivkontrolle. Bezüglich der Dosiswahl gibt es in der wissenschaftlichen Literatur unterschiedliche Ergebnisse. Eine Untersuchung von Bauss et al. aus dem Jahre 1996 beschreibt eine tägliche E_2 -Aufnahme von $13 \mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht als optimal Dosis, um vor dem post-OVX stattfindenden Knochenmasseverlust zu schützen (Bauss et al. 1996). In einer großen Zahl wissenschaftlicher Untersuchungen, welche hier herangezogen wurden, lagen die verabreichten E_2 -Dosierungen jedoch

oftmals höher (Komrakova et al. 2011; Sehmisch et al. 2010a; Picherit et al. 2000; Wronski et al. 1988).

Bei unserer Untersuchung nahmen die Tiere in der Niedrig-Dosis-Gruppe 70 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ E_2 und in der Hoch-Dosis-Gruppe 200 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ E_2 auf.

Die knochenprotektiven Effekte ließen sich in der Folge hauptsächlich für die Substantia spongiosa zeigen. Im Bereich der Tibiametaphyse wurde die trabekuläre Knochenmineraldichte durch E_2 n und E_2 h auf mehr als 80 % des Ursprungsniveaus gehalten (siehe Abbildung 3.2). Dieser Effekt findet sich auch durch zahlreiche OVX-Ratten-Studien bestätigt (Kolios et al. 2010; Tezval et al. 2010; Hidaka et al. 2006; Kalu 1991; Wronski et al. 1988). Der geringfügig stärkere Effekt des E_2 n ist mit wirkstoff-assoziierten Umständen nicht aussagekräftig zu erklären.

Bei der Betrachtung der kortikalen Knochenmineraldichte ließ sich kein eindeutig osteoprotektiver Effekt von E_2 bestätigen, da sowohl die unbehandelten als auch die E_2 -behandelten Tiere einen kaum therapeutisch beeinflussbaren Dichtezuwachs nach der Ovariectomie entwickelten. Dies entspricht ebenfalls der Definition des hier untersuchten Osteoporosemodells, welches hauptsächlich durch einen trabekulären Knochenmineraldichteverlust gekennzeichnet ist (Riggs et al. 2002; Wronski et al. 1988).

Der signifikant supprimierte Osteocalcinspiegel unter E_2 h spricht hier für eine Hemmung der osteoblastären Knochenstoffwechselfvorgänge. Bestätigung findet dieses Resultat durch verschiedene andere wissenschaftliche Osteoporose-Studien (Seidlová-Wuttke et al. 2008; Lindsay und Cosman 2008). Gleichzeitig ist unter Östradiol eine Suppression der Knochenresorption und damit der Serum-Crosslaps zu erwarten. Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nur in einer Tendenz für E_2 h gezeigt werden. D. h. hier kam es zu keinem signifikanten Ergebnis.

In Zusammenschau der CT-morphologischen Entwicklungen und der ermittelten Serumparameter ist von einem osteoprotektiven Effekt des E_2 auszugehen, so dass wir dieses Agens für unsere Untersuchung als Positivkontrolle bestätigen konnten.

- E_2 reduzierte signifikant den OVX-induzierten Knochenmineraldichteverlust der trabekulären Tibiametaphyse.
- E_2 verminderte die OVX-bedingte Remodeling-Aktivität und senkt den Osteocalcinspiegel im Serum.

4.5 Die pQCT als ausgewählte Messmethode

Das Charakteristikum der typischen post-menopausalen Osteoporose bzw. der post-OVX-einsetzenden Osteoporose besteht in einem trabekulären Knochenmineraldichteverlust. Bei der OVX-Ratte werden daher die proximale Tibiametaphyse sowie die lumbale Vertebra als geeignete und am häufigsten untersuchte Lokalisationen herangezogen und wurden auch für die vorliegende Arbeit betrachtet (Kharode et al. 2008).

Um die Knochenveränderungen CT-morphologisch zu erfassen, verwendeten wir die pQCT. Sie ist in der Osteoporoseforschung an Kleintieren bereits seit vielen Jahren etabliert, da sie leicht reproduzierbar und besonders sensitiv für die Veränderungen der Knochenmorphologie ist (Kharode et al. 2008; Gasser 1995). Ihr Vorteil besteht in einer präzisen, volumetrischen Dichtemessung des Knochens, bei welcher sie zwischen Substantia spongiosa und Substantia corticalis zu unterscheiden vermag (Faulkner und Miller 2008; Ferretti et al. 2002; Gasser 1995).

In dieser Untersuchung erfolgte die technische Datenerhebung der Zielregion in 3 Schnittebenen distal der manuell eingestellten Referenzlinie. Damit ließ sich die spongiosareiche Tibiametaphyse exakt mit den Schnittebenen 1 und 2 erfassen. Die proximale Ratten-Tibia zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung als eine besonders sensitive Lokalisation für den trabekulären Knochensubstanzverlust bestätigt. Zu Untersuchungsbeginn lag die höchste trabekuläre Knochenmineraldichte der proximalen Tibia mit 265.2 mg/cm^3 vor. Nach der Ovariectomie sank dieser Wert bei den Negativ-Kontrolltieren bis auf durchschnittlich 46.52 % des Ausgangswertes ab. Somit war der zu erwartende zügige Dichteverlust in der Substantia spongiosa signifikant eingetreten.

Die Resultate zur Knochenmineraldichte der Vertebra ließen im Falle unserer Untersuchung kaum spezifische Rückschlüsse zu. So zeigte sich für die unbehandelten Kontrolltiere ein durchschnittlicher Zuwachs der trabekulären Knochenmineraldichte um 14.2 % sowie kortikal um 1.7 %. Dennoch sank die Gesamtknochenmineraldichte um 5.81 % (siehe dazu Abbildungen 3.18 und 3.20).

Im Bezug auf unseren Versuch können hier zusätzlich Wirkstoff-bezogene Ursachen angenommen werden, welche Dosis-abhängig nur an einer der gemessenen Lokalisationen zu einem messbaren Effekt führen. Beispielsweise wiesen Rachoń et al. eine osteoprotektive Wirkung an der lumbalen Vertebra nach, welche zeitgleich an der proximalen Tibia fehlte (Rachoń et al. 2007c). Weiterhin können sich Schwierigkeiten auch aus dem Tiermodell selbst ergeben. Lelovas et al. beschrieben in einer ihrer Untersuchungen das Fehlen des OVX-induzierten Knochenmineraldichteverlustes in den kaudalen Vertebra-segmenten der Laborratte (Lelovas et al. 2008; Jee und Yao 2001). Eine weitere Überlegung betrachtet

die Modeling- und Remodelingvorgänge, welche sowohl modell- als auch altersabhängige Unterschiede aufweisen können (Francisco et al. 2011; Lelovas et al. 2008).

Die kortikale Knochenmineraldichte entwickelte sowohl an der Tibia als auch an der Vertebra nur zurückhaltende Veränderungen, welche vorwiegend in einem Knochenmineraldichtezuwachs bestanden. Dies kann ein Indiz für ein fortbestehend dominierendes Modeling sein, welches mit dem jugendlichen Alter der Tiere begründbar ist (Lelovas et al. 2008). Weiterhin ist der post-OVX-Knochenmineraldichteverlust der Substantia corticalis erst ab dem 90. bis 120. Lebensjahr wissenschaftlich bestätigt (Lelovas et al. 2008).

Die Betrachtung der resultierenden Gesamtknochenmineraldichte der Ratten-Tibia bestätigt schließlich die osteoporotische Entwicklungstendenz des Knochengewebes nach einer stattgehabten Ovariectomie (siehe Abbildung 3.6).

4.6 Die Knochenveränderungen unter Phytoöstrogen-Einfluss

Die proximale Tibiametaphyse entwickelt am frühesten und am sensitivsten den post-OVX-stattfindenden Dichteverlust der Substantia spongiosa (Jee und Yao 2001; Wronski et al. 1988). Bestätigung findet dies in zahlreichen Untersuchungen am OVX-Rattenmodell (Kolios et al. 2010; Sehmisch et al. 2010a; Rachoń et al. 2007a; Wronski et al. 1988). Daher stützen sich unsere Betrachtungen vorrangig auf diese Lokalisation.

Bei unserer Tierfutter-Studie konnten wir eine signifikante Verminderung der Osteoporose durch Daidzein, Equol, Puerarin und Puerarinol aufzeigen. Gleichzeitig zählen diese drei benannten Phytoöstrogene zur Stoffgruppe der Isoflavone.

Supplementationsstudien mit Phytoöstrogenen werden in einer Vielzahl von Betrachtungsweisen wissenschaftlich aufgegriffen. Daraus ergeben sich für uns teilweise Einschränkungen in der Vergleichbarkeit jener und unserer Resultate. Von der Methodik abgesehen, untersuchten einige Wissenschaftler andere Skelettlokalisationen als wir. Häufig traten die Tiere auch in anderen Altersgruppen in den Versuch ein (Alter zwischen 4 Wochen und 6 Monaten). Außerdem untersuchten zahlreiche Studien ganze Wirkstoffklassen, wie beispielsweise die Isoflavone.

So beinhaltet sojehaltiges Komplexfutter mehrere Vertreter der Isoflavongruppe wie etwa Daidzein, Genistein und Glycitein (Cagno et al. 2010; Karahalil 2006; Lee et al. 2004). Unter einer 16-wöchigen Applikation sojehaltigen Futters wies Lee et al. ein dem 17β -Östradiol ähnlich effizienten Osteoporoseschutz für das OVX-Rattenmodell nach (Lee et al. 2004). Ebenso signifikant wirkte Sojabohnen-Futter bei 7 Wochen alten Ratten nach

der Ovariectomie (Byun und Lee 2010). Die beispielhaft erwähnten Ergebnisse finden zahlreiche Bestätigungen am OVX-Rattenmodell (Jeon et al. 2009; Taguchi et al. 2006; Zhuo et al. 2006).

Uns helfen diese Ergebnisse als Hinweis auf eine mögliche osteoprotektive Potenz, der von uns untersuchten Isoflavon-Vertreter. Dennoch handelt es sich bei sojahaltigem Mischfutter immer um Summationseffekte, die keinen direkten Rückschluss auf die Wirksamkeit der einzelnen Isoflavone erlauben.

Für die Substantia spongiosa erhielten die drei effektivsten Phytoöstrogene unserer Untersuchung (Daidzein h, Equol h und Puararin n und h) das Niveau der post-OVX-Knochenmineraldichte auf 55.03 % bis 58.77 % des Ursprungswertes. Das entsprach einem signifikanten Benefit von 8.51 bis 12.25 % gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Eine Abstufung der einzelnen Vertreter auf ihre Östrogen-äquivalente Potenz ist auf der Grundlage dieser Ergebnisse nicht möglich. Zumindest Erkenntnissen anderer Studien zufolge, ist die Östrogenität von Equol in vitro etwa 82 mal so wirksam wie die des Daidzeins (Zhuo et al. 2006). Dennoch ist die Effizienz beider Substanzen unter unseren Untersuchungsbedingungen als etwa gleichwertig anzusehen. Hierfür kann es mehrere denkbare Ursachen geben: Eine Überlegung wäre, dass sich die Wirksamkeit Equols durch Modifikation der applizierten Wirkstoffdosis optimieren ließe. Weiterhin stellt sich auch die Frage, inwieweit die intestinale Umwandlung von Daidzein zu Equol für die Ergebnisse der Daidzein-Wirkstoffgruppe eine Rolle spielt. So ist erwiesen, dass Daidzein durch die Bakterienflora des Ileums in größeren Mengen zu Equol transformiert wird (Poulsen et al. 2009; Mathey et al. 2007; Picherit et al. 2000). Auf diesem Wege führen die Equolproduzenten unter den Versuchstieren möglicherweise zu einer Wirkungsverstärkung zugunsten des Daidzeins.

Nachfolgend sollen die einzelnen Phytoöstrogene betrachtet werden.

4.6.1 Daidzein

Unsere Versuchstiere der Gruppe Daidzein n erhielten eine Futterbeimischung von 250 mg Daidzein pro kg Futter, bzw. von 1.000 mg Daidzein pro kg Futter in der Daidzein h-Gruppe. Gemäß der durchschnittlich errechneten Futteraufnahme von Tabelle 3.1 ergibt sich daraus

- ein Wirkstoffaufnahme von 4.47 mg Daidzein pro Tag (entspricht 18.39 $\mu\text{g}/\text{g KG}$ (Körpergewicht)) in der Gruppe Daidzein n und
- von 15.84 mg Daidzein pro Tag (entspricht 65.18 $\mu\text{g}/\text{g KG}$) für Daidzein h.

Damit erzielte Daidzein h einen signifikant osteoprotektiven Effekt auf die tibiale Spongiosadichte (siehe Abbildung 3.2). An der Rattenvertebra erzielte Daidzein keine signifikanten Ergebnisse, ließ aber einen milden anti-osteoporotischen Effekt auf die Substantia spongiosa vermuten (siehe Abbildung 3.18). Bezüglich der Dosierung und der östrogenresponsiven Wirkung des Daidzeins, ergaben sich bei der Literaturrecherche jedoch teils deutlich abweichende Vorgaben.

Dazu wurden die folgenden Untersuchungen vergleichend herangezogen:

Picherit et al. konnte bereits unter einer Testsubstanzaufnahme von täglich 10 μg Daidzein/ g Körpergewicht (KG) nach 3 Monaten ein dem E_2 gleichwertiger Effekt auf die Knochenmineraldichte nachweisen (Picherit et al. 2000). Eine Arbeit von *Om et al.* bewirkte einen signifikanten Erhalt der Knochenmineraldichte bereits unter einer 8-wöchigen Supplementation von täglich 10 μg Daidzein/ g KG. Zusätzlich waren diese Tiere einer Osteoporose-förderlichen Cadmiumexposition ausgesetzt (Om und Shim 2007).

Besonders interessant waren die Ergebnisse von Mathey et al., welche unter sehr ähnlichen Rahmenbedingungen zu unserer Untersuchung, die Knochenmineraldichte signifikant über dem post-OVX-Niveau erhielt (Mathey et al. 2007). Erstaunlich war, dass die zusätzliche Substitution von *Lactobacillus casei* die Wirkung von Daidzein sogar noch verstärkte (Mathey et al. 2007). Dieser Bakterienstamm steht unter der wissenschaftlichen Vermutung den Metabolismus von Daidzein zu Equol zu vermitteln (Legette et al. 2009). D. h. in jener Untersuchung wäre ein Teil des Wirkstoffeffektes auf neu entstandenes Equol zurückzuführen.

Im Kontrast hierzu steht die Untersuchung von Ren et al.: Hier wurde 6 Monate alten OVX-Ratten 15 mg Daidzeinsulfonat je kg Futter supplementiert und nach 90 Tagen eine signifikante Zunahme der trabekulären Knochenmineraldichte des Femurs ermittelt (Ren et al. 2007). Das bedeutet diese Tiere erhielten die 15- bzw. 60-fache Daidzeindosis gegenüber unserer Studie.

Mathey et al. gelang es, eine Suppression der Osteocalcin-Ausschüttung unter Daidzein-Supplementation nachzuweisen (Mathey et al. 2007). Bei der Betrachtung unserer Serumparameter, ließ sich kein signifikanter hemmender Effekt des Daidzeins auf den Knochenumsatz laborchemisch darstellen. Unsere Resultate erlauben jedoch, einen anti-resorptiven Effekt zu vermuten, da die β -CrossLaps-Produktion nicht-signifikant reduziert ist. Möglicherweise spricht die supprimierende Wirkung zunächst die Osteoklasten an.

Vergleiche dieser Publikationen mit unseren Ergebnissen sind nur eingeschränkt möglich. Die Mehrheit der hier erwähnten Studien arbeitete mit einer deutlich geringeren Dosierung von 10 μg Daidzein als in unserem Versuch und erzeugt dennoch einen signifikant knochen-protektiven Effekt, welcher sogar die Wirksamkeit von E_2 übertraf. Gleichzei-

tig lag die Höhe der E₂-Substitution zwischen einem Zehntel und einem Viertel unserer E₂-n-Dosis (Ren et al. 2007; Picherit et al. 2000). Ein genauere Hintergrund für die Etablierung exakt dieser Dosierungen konnte aus der Literatur nicht erschlossen werden. Möglicherweise tragen sie der Plasmakonzentration Rechnung, die im Falle der Untersuchung von Picherit et al. bei Daidzein gegenüber 17 β -Östradiol mindestens dem Faktor 1000 : 1 entspricht (Picherit et al. 2000). Diese Konzentration ist also erforderlich um eine E₂-responsive Wirkung an ER α bzw. ER β zu erzeugen (Lamartiniere et al. 2002; Selvaraj et al. 2004) (siehe dazu auch Abschnitt 1.4.2).

Über die Hintergründe der milderen Wirkung des Daidzeins bei unserer Studie gegenüber den Ergebnissen aus der Literaturrecherche kann nur spekuliert werden. Zu den wesentlichen Unterschieden gehört jedoch, dass die Versuchstiere dort in verschiedenen Lebensaltersstufen von 4 Wochen bis 6 Monaten in den Versuch eintraten. D. h. bei besonders jungen Tieren - wie dem Versuch von Om et al. - wiesen die Tiere bereits aufgrund ihrer Jugendlichkeit noch eine vermehrte Modelingaktivität auf. Dies kann zu einer zusätzlichen Erhöhung der Knochenmineraldichte-Werte führen, so dass die Resultate für Daidzein wirksamer erscheinen als bei unserer Untersuchung (Lelovas et al. 2008). Auch stand bei all diesen Untersuchungen die Spongiosa des distalen oder proximalen Femurs als Vergleichsobjekt im Mittelpunkt. Das Verhältnis von Knochenmineraldichte und Fläche der Substantia corticalis gegenüber Substantia spongiosa der Tibia ist hier bereits physiologisch nicht als direkt vergleichbar anzunehmen.

Da Daidzein eine 5-fach höhere Affinität zum ER β als zum ER α aufweist, wäre ein osteoprotektiver Effekt des Daidzein vor allem in der Substantia spongiosa zu erwarten (Lamartiniere et al. 2002; Selvaraj et al. 2004). Dies hängt mit der wissenschaftlich belegten Rezeptorverteilung zusammen, welche von einer Dominanz des ER β in der Spongiosa ausgeht (Syed et al. 2005; Riggs et al. 2002). Ob diese Erklärung für unsere Ergebnisse ausschlaggebend ist, können wir nicht mit Sicherheit darlegen. Es wäre jedoch eine Erklärung für die Wirksamkeit des Daidzeins im Bereich der Substantia spongiosa und deren Fehlen im Bereich der Substantia corticalis (siehe hierzu Abbildung 3.4).

Auf jeden Fall können wir einen signifikant osteoprotektiven Effekt des Daidzein h auf die spongiöse Knochenmineraldichte bestätigen. Ebenso wie in unserer Untersuchung, kam auch in der Vergleichstudie von Mathey et al. sogar eine beinahe gleichwertige Wirksamkeit von Daidzein und Equol zustande (Mathey et al. 2007). Der zusätzliche Benefit durch eine mögliche Metabolisierung des Daidzeins zu Equol konnte in unserem Versuch nicht berücksichtigt werden. Die Relevanz dieses Aspektes wäre nur durch eine Bestimmung der Serumsurrogatparameter von Daidzein und Equol einschätzbar (siehe dazu auch Abschnitt 4.6.2).

4.6.2 Equol

Die Supplementation von Equol erfolgt mit 50 mg/ kg Futter (Equol h) oder 200 mg/ kg Futter (Equol h). Darunter betrug die durchschnittliche Testsubstanzaufnahme

- 0.92 mg Equol pro Tag (entspricht 3.78 $\mu\text{g}/\text{g KG}$) in der Gruppe Equol h und
- 6.54 mg Equol pro Tag (entspricht 26.9 $\mu\text{g}/\text{g KG}$) in der Gruppe Equol h.

Anhand der vorliegenden Untersuchung konnten wir für Equol h einen substanzerhaltenden Effekt auf die metaphysäre Knochenmineraldichte der Tibia zeigen. Für die Substantia spongiosa war das Resultat signifikant und lag bei 59.19 % gegenüber dem Ursprungsniveau (siehe Abbildung 3.2). Die Entwicklungen der Rattenvertebra blieb unter Equolsupplementation in allen Knochenkompartimenten nahezu unbeeinflusst.

Die Einordnung unserer Ergebnisse in den allgemeinen wissenschaftlichen Erkenntnisstand erlaubt teils einige Bestätigungen teils auch Rückschlüsse. Bestätigung findet unsere Resultate in Equol-Supplementationsstudien an der OVX-Ratte und am Osteoporose-Maus-Modell von Sehmisch et al. (Sehmisch et al. 2010b, a). So führte deren 3-monatige Equol-Supplementation zu einem signifikanten Anstieg der trabekulären sowie zusätzlich der kortikalen Knochenmineraldichte der Tibiametaphyse. Eine 6-wöchige Equol-Supplementationsstudie von Rachoń et al. erzielte ebenfalls vergleichbare Resultate zu unserer Studie (Rachoń et al. 2007a). Hier war die Substantia spongiosa der Tibia die sensitivste Lokalisation für einen osteoprotektiven Effekt. Von Mathey et al. existiert eine reine Isoflavon-Vergleichsstudie an der OVX-Ratte: Dort bewirkte die 3-monatige Equol-Substitution einen signifikanten Benefit für die trabekuläre Knochenmineraldichte des Femurs (Mathey et al. 2007). Diese Wirksamkeit setzte hier unter einer Tagesdosis von 10 μg pro g KG ein und überstieg sogar die Resultate des Daidzeins.

Eine weitere Studie beschäftigte sich mit der Untersuchung der wirkungsvollsten Equol-Dosis am Knochen der OVX-Ratte. Legette et al. legten in ihrer Studie 200 mg Equol/ kg Futter als anti-osteoporotisch effizienteste Dosis fest. Unter dieser Dosierung kam es zu einem deutlichen Anstieg des Calcium-Gehalt im Femurknochen (Legette et al. 2009). Dennoch konnte bei jenem Versuch keine aussagekräftige Wirksamkeit des Equols für die trabekuläre oder kortikale Knochenmineraldichte dargestellt werden.

Weitere Studien betrachteten eher die histo-morphologischen Veränderungen innerhalb der Knochenkompartimente. Beispielsweise konnten Sehmisch et al. 2009 eine konstant erhaltene Knochenstabilität unter einer 35-tägigen Equol-Supplementation nachweisen, obwohl die OVX-bedingte Rarifizierung des Knochens nicht verhindert werden konnte (Sehmisch et al. 2010a). Ähnliche Effekte lassen sich auch aus unseren CT-morphologischen

Resultaten vermuten: So blieb die Größe der Spongiosa-Querschnittsfläche unbeeinflusst gegenüber der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 3.8). Wissenschaftler wie Sehmisch et al. vermuten den eigentlichen Knochen-protectiven Effekt der Isoflavone daher eher bei ihrer Wirkung auf die Knochenmineralisierung, auf die Dichte der Osteozytenverteilung oder auf den Knochenumsatz (Sehmisch et al. 2010a). Dabei konnte sowohl beim Mensch als auch bei der Ratte der protective Einfluss des Equols auf die Höhe des Knochen-Calcium-Gehalts bereits nachgewiesen werden. Bei der OVX-Ratte führt demnach bereits die Aufnahme von 200 mg Equol/ kg Futter zu einer Zunahme des femuralen Knochen-Calcium-Gehalts (Weaver und Legette 2010; Legette et al. 2009).

Ein Wirkung des Equols auf die kortikale Knochenmineraldichte ließ sich in unserer Futterstudie nicht nachweisen (siehe auch Abbildung 3.4). Dies kommt dem Wissen um die ossäre Rezeptorverteilung entgegen, nachdem $ER\beta$ zwar in der Spongiosa und der Kortikalis vorkommen, aber in der Spongiosa quantitativ überwiegt (Syed et al. 2005; Riggs et al. 2002). Da Isoflavone hauptsächlich mit dem $ER\beta$ interagieren, sind die fehlenden Effekte auf die Kortikalis möglicherweise eine Frage der hauptsächlich trabekulär stimulierten Rezeptoren (Sehmisch et al. 2010a).

Die Betrachtung der Serumparameter Osteocalcin und β -CrossLaps lässt keine Aussagen über einen E_2 -responsiven Effekt des Equols zu (siehe Abbildungen 3.26 und 3.27). In einer Tendenz lässt sich hier ein antiresorptiver Einfluss des Equol h vermuten, da die β -CrossLaps unter das Maß der Kontrollgruppe supprimiert werden konnten. Im Bezug auf die anti-osteoporotische Wirkung dieses Isoflavons ist die Aussagekraft der untersuchten Serumparameter möglicherweise eingeschränkt. Beispielsweise konnten Rachoń et al. unter vergleichbaren Versuchsbedingungen ebenfalls keine Auswirkungen auf die Serumspiegel von Osteocalcin bzw. β -CrossLaps nachweisen (Rachoń et al. 2007a; Picherit et al. 2000).

In der Zusammenschau unserer Ergebnisse und bereits vorliegender Erkenntnisse bestätigen wir einen milden osteoprotectiven Effekt für Equol. Gegebenenfalls ist auch hier erneut das jugendliche Alter der Tiere in anderen Studien als Ursache heranzuziehen. D. h. wir können nicht abschätzen inwieweit die Modelingaktivität der jungen Ratten die Knochenmineraldichte - unabhängig vom Effekt des Equols - erhöht (Lelovas et al. 2008). Darüber hinaus stellten einige der hier herangezogenen Studien den Femurknochen in den Mittelpunkt der Untersuchung, so dass kein direkter Vergleich zu unseren Ergebnissen möglich ist. Eine mögliche Ursache für den zurückhaltenden Benefit des Equols, kann auch in einer unzureichenden intestinalen Bereitstellung des Wirkstoffs gelegen haben.

Daidzein und Equol - ein Wirkungskomplex

Für die Wirksamkeit sowie die therapeutische Relevanz von Equol ist seine Bioverfügbarkeit von essentieller Bedeutung. Auf der Forschungsebene wird Equol häufig in seiner Reinform peroral, intravenös oder subkutan appliziert. Der Hauptlieferant stellt jedoch das Daidzein dar, welches Mensch bzw. Tier über Sojaextrakte aufnehmen. Equol ist dabei der ausgesprochen E_2 -responsive Metabolit des Daidzins und weist eine um das 80- bis 100-fache stärkere Affinität zu $ER\beta$ als Daidzein auf (Weaver und Legette 2010; Legette et al. 2009; Sehmisch et al. 2010a). Daher ist die Fähigkeit *Equol zu produzieren* beim Menschen und bei Tieren für die Wirksamkeit maßgeblich (Poulsen et al. 2009; Mathey et al. 2007; Fujioka et al. 2004; Lampe et al. 2001). Im Abschnitt 4.6.1 wurde bereits auf einen möglichen Kumulationseffekt von Equol und Daidzein hingedeutet, obwohl jenen Tieren nur Daidzein substituiert worden ist. Die intestinale Metabolisierungskompetenz zum Equol kann scheinbar erworben werden. Diese Fähigkeit wird z. B. durch die Kontamination des Rattenintestinums mit humanen Darmbakterien erzeugt (Bowey et al. 2003). Es stellt sich die Frage, inwiefern der therapeutische Effekt eines Isoflavonpräparats nicht durch die zusätzlichen Verzehr bestimmter Mikroorganismen positiv beeinflusst werden kann. Einen Hinweis hierauf gibt uns die Studie von Mathey et al., bei welcher die Substitution von Daidzein in Kombination mit *Lactobacillus casei* durchgeführt wurde. Am Ratten-Femurknochens konnte die metaphysäre Knochenmineraldichte damit sogar über dem Wirkungsniveau der solitären Daidzein- bzw. Equolsubstitution gehalten werden (Mathey et al. 2007). Interessant wäre daher zusätzlich, ob eine dauerhafte Darm-Kolonisation mit S-Equol-produzierenden Bakterien bei Tiermodell und Mensch möglich ist. Schließlich weist dieses Enantiomer des Equols eine größere Affinität zu den ossären $ER\beta$ auf, als das R-Equol und verfügt über den nachweislich größeren osteoprotektiven Effekt (Legette et al. 2009).

4.6.3 Puerarin

In der vorliegenden Untersuchung erhielten die Versuchstiere in der Puerarin-n-Gruppe 600 mg Testsubstanz/ kg Futter bzw. in der Gruppe Puerarin h 3000 mg Testsubstanz/ kg Futter. Zurückgeführt auf die tägliche Futtermenge der Tiere entsprach dies einer Wirkstoffaufnahme von

- 10.49 mg Puerarin/ Tag (bzw. 43.17 $\mu\text{g}/\text{g KG}$) bei Puerarin n und
- 48.24 mg Puerarin/ Tag (bzw. 198.52 $\mu\text{g}/\text{g KG}$) bei Puerarin h.

Bei unserer Untersuchung schützte Puerarin aussagekräftig vor der post-OVX-Osteoporose. In der Tibiametaphyse konnte die trabekuläre Knochenmineraldichte auf einem signifikant höheren Niveau gegenüber der Kontrollgruppe gehalten werden. Für beide Dosierungsstärken lag die Dichte am Versuchsende bei 59.75 % des Ursprungswertes (siehe Abbildung 3.2). An der tibialen Spongiosa ist Puerarin damit ebenso therapeutisch effizient wie Daidzein h und Equol h.

Als Isoflavonvertreter kann Puerarin an beide Östrogenrezeptoren binden, besitzt aber vermutlich eine größere Affinität zu ER β (Sehmisch et al. 2010a; Rishi 2006). Berücksichtigen wir die Kenntnisse über das Verteilungsmuster der Östrogenrezeptoren - mit ER β in der Substantia spongiosa - können wir unsere o. g. Resultate als dominierende Interaktion mit ER β interpretieren (Syed et al. 2005; Riggs et al. 2002).

Bei der Literaturrecherche fanden sich nur wenige Untersuchungen über die Wirkung von Puerarin auf den Rattenknochen. Teilweise wird in diesen Studien auch keine Reinsubstanz, sondern vielmehr ein Puerarin-haltiger Wurzelextrakt der Kudzupflanze verabreicht, welcher neben Puerarin u. a. auch Daidzein, Genistein oder Rutin enthält. In diesen Untersuchungen ist folglich von einer komplexen Wirkung der verschiedenen phytoöstrogenen Inhaltsstoffe auszugehen. Die einzige Supplementationsstudie am Osteoporose-Tiermodell, welche wir hier vergleichend heranziehen können, stammt von Wang et al. und wurde am Femur der osteoporotischen Maus erhoben. Hier konnte der OVX-assoziierte Knochenmineraldichteverlust der Spongiosa und der Gesamtknochenmineraldichte komplett durch einen *Puerariae-radix*-Extrakt aufgehoben werden (Wang et al. 2003). Dazu lag die tägliche Testsubstanzaufnahme bei 10 % der Tagesgesamtfuttermenge. Zu beachten ist jedoch, dass dieser Extrakt neben Puerarin auch Daidzein, Genistein oder Rutin enthielt.

Puerarin n hemmt den Dichtezuwachs der Substantia corticalis, welcher bei den Kontrolltieren zu sehen ist, signifikant (siehe Abbildung 3.4). Interessanterweise fällt diese Tendenz für Puerarin h deutlich milder aus. Das bedeutet hier ist Dosis-adaptiert von zwei verschiedenen Wirkungsmechanismen auszugehen, wodurch möglicherweise auch die divergierenden Erkenntnisse in der wissenschaftlichen Literatur bestätigt werden können. Li et al. zufolge gibt es keinen nachgewiesenen Stimulationseffekt des Puerarins auf die Osteoblasten. Allerdings bestätigte er einen stimulierenden Einfluss auf die Sekretionsrate der Alkalische Phosphatase und eine Hemmung der Osteoklastenaktivität am fetalen Rattenknochen (Li und Yu 2003). Andererseits gehen Zhang et al. von einem direkten Stimulationseffekt des Puerarins auf die Zellgenese und die Lebenszeitspanne der Osteoblasten aus, welchen sie in vitro zeigen konnten (Zhang Yu et al. 2007). Ein direkter Vergleich ist hier nicht möglich, da es sich in beiden Fällen um in-vitro-Untersuchungen

handelte. Dennoch stützt es unsere Vermutung über einen bi-phasische Wirkung des Puerarins: An der Tibia balanciert die niedrigere Dosierung An- und Abbauprozesse am Knochen aus, während die höhere Dosierung eher das Modeling stimuliert. Ersichtlich wird dies beispielsweise durch den verminderten endostalen Umfang unter Puerarin-Einwirkung (siehe Abbildungen 3.14 und 3.16). Dieser Umstand spricht hier für einen Anbau neuer Knochensubstanz. Dies bestätigen auch die Ergebnisse von Wang et al., deren post-OVX-Supplementationsstudie in niedriger Dosierung, die Femur-Knochenmineraldichte stabilisierte und unter höherer Dosierung sogar zu einem Dichtezuwachs führte (Wang et al. 2003).

An der Vertebra bewirkte Puerarin n einen signifikanten Anstieg der Gesamtknochenmineraldichte (siehe Abbildung 3.20). Jedoch ist hier die Effizienz von Puerarin n gegenüber Puerarin h auch im Zusammenhang mit dem Tiermodell und der Mess-Lokalisation zu sehen. Fehlt die typische Osteoporose bestimmter Vertebra-Abschnitte - so wie es laut Lelovas et al. auftreten kann - kann dieser Aspekt zu falsch-positiven Ergebnisse führen, welche nicht durch das Isoflavon verursacht wurde (Lelovas et al. 2008; Jee und Yao 2001).

Unsere Ergebnisse können zusätzlich durch E₂-responsive Effekte der Puerarin-Derivate mitbeeinflusst worden sein. Schließlich geht aus der intestinalen Metabolisierung des Puerarins die ebenso wirksamen Abkömmlingen Daidzein und Equol hervor (Penetar et al. 2006). Über das quantitative Ausmaß dieser Prozesse gibt es jedoch noch keine hinreichenden Erkenntnisse.

Bei der Betrachtung des Serumwertes β -CrossLaps brachte Puerarin h den einzigen signifikanten Wert hervor. Hier konnten wir eine Erhöhung der Serum- β -CrossLaps auf 45.09 ng/ml ermitteln (siehe Abbildung 3.27). Demnach zeigt Puerarin hier einen gegensätzlichen Effekt zum Östradiol, indem es die Osteoklastenaktivität scheinbar stimuliert. Auf den Ostercalcinspiegel hatte dieses Phytoöstrogen jedoch in beiden Dosierungsstärken keinen Einfluss. Vergleichbare Untersuchungen existieren nicht mit isolierten Puerarin. Da Puerarin in unserer Untersuchung die CT-morphologischen Anzeichen der Osteoporose signifikant limitierte, ist möglicherweise von einer Dosis-Wirkungs-Beziehung oder sogar von einer fehlenden Beeinflussbarkeit auf den Osteocalcinspiegel auszugehen.

4.6.4 Quercetin

Von allen hier eingesetzten Phytoöstrogenen ist Quercetin der einzige Flavonoid-Vertreter. Hiervon erhielten unsere Versuchstiere 200 mg/ kg Futter (Quercetin n) oder 1000 mg/ kg Futter (Quercetin h). Daraus ergab sich die folgende Testsubstanzaufnahme von

- 3.55 mg Quercetin/ Tag (bzw. 14.61 $\mu\text{g}/\text{g KG}$) bei Quercetin n und
- 18.42 mg Quercetin/ Tag (bzw. 75.8 $\mu\text{g}/\text{g KG}$) bei Quercetin h.

Quercetin h schützte in unserer Untersuchung diskret vor dem post-OVX einsetzenden Knochenmineraldichte-Verlust und erhielt die tibiale Knochenmineraldichte der Substantia spongiosa auf 54.9 % vom Ursprungswert (siehe hierzu Abbildung 3.3). Die Einordnung unserer Resultate in den wissenschaftlichen Kenntnisstand erlauben allerdings nur vereinzelt Rückschlüsse. Bekannt ist, dass sich die Rezeptor-Affinität dieses Phytoöstrogens vorrangig auf $\text{ER}\beta$ bezieht, aber auch mit $\text{ER}\alpha$ interagiert (van der Woude et al. 2005). Betrachten wir nun unsere Ergebnisse, dient uns dieses Wissen teilweise als Anhaltspunkt, warum der knochenprotektive Effekt des Quercetins nur in der Spongiosa signifikant nachweisbar war. Gleichzeitig zeigte Quercetin gleichgerichtete Ergebnisse zu den anderen hier untersuchten Phytoöstrogenen.

Siddiqui et al. benannten in ihrer Veröffentlichung aus dem Jahre 2011 gegensätzliche Auswirkungen des Quercetins auf die Osteoblasten: Sie erwähnen eine ER-vermittelte Stimulation von MG63-Osteoblasten sowie ebenfalls eine apoptotische Wirkung auf Osteoblasten des Schädelknochens (Siddiqui et al. 2011). Zusätzlich ist eine Inhibition der Differenzierung von Mäusen-Osteoklasten nachgewiesen (Woo et al. 2004). An diesen Aspekt erinnern wir uns bei der Betrachtung der kortikalen Knochenmineraldichte der Tibia in unserer Studie:

Bei den Quercetin-gefütterten Tieren nahm dieser Parameter weniger stark zu als bei den unbehandelten Kontrolltiere. Auch wenn es sich hier nur um eine Tendenz handelt, stellt sich die Frage, inwiefern hier

- ein apoptotische Effekt auf die Osteoblasten vorliegt (Siddiqui et al. 2011) oder
- es sich um eine Hemmung der Osteoklastendifferenzierung handelt, wie sie von Woo et al. beschrieben worden ist (Woo et al. 2004).

Bei der Betrachtung der Vertebra bewirkte Quercetin kaum signifikante Resultate. In seiner Tendenz schien es jedoch die pathophysiologischen Knochenstoffwechselforgänge der post-OVX-Phase auszugleichen. Daher stabilisierten sich die Dichtewerte nahe dem Ursprungswert. Die markanteste Veränderung wiesen wir für die Vertebra-Gesamtknochen-dichte und die Vertebra-Gesamtquerschnittsfläche nach. Hier bewirkte von allen untersuchten Phytoöstrogenen nur Quercetin n eine Verminderung dieser Parameter (siehe Abbildungen 3.20 und 3.23). Dies spricht für einen bi-phasischen Effekt, nachdem die geringer Quercetin-Dosis zu einer Hemmung der Modelingaktivität zu führen scheint, die für die Hoch-Dosis-Gruppe nicht gezeigt werden konnte.

Schenkt man den Surrogatparametern im Serum Aufmerksamkeit, werden sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten durch Quercetin stimuliert, da die Produktion von Ostercalcin und von β -CrossLaps über das Maß der Kontrolltiere hinaus anstieg (siehe hierzu Abbildungen 3.26 und 3.27). Aus der Literaturrecherche fand sich hierfür kein Korrelat. Es erklärt jedoch die Abnahme der Gesamtknochenmineraldichte sowie der Gesamtquerschnittsfläche im Bereich der Vertebra. In gegensätzlicher Weise beschrieben bereits andere Wissenschaftler ähnliche Effekte bei der Phytoöstrogen-Supplementation am Tiermodell (Rachoń et al. 2007c).

Über die enterale Verfügbarkeit des Quercetins fand sich nur wenige Hinweise in der Literatur. Allerdings postulierten Siddiqui et al. für C-glykosidisch gebundenes Quercetin einen deutlich potenteren osteoprotektiven Effekt, welcher außerdem nicht über die Östrogenrezeptoren vermittelt wird (Siddiqui et al. 2011). Er entsteht vor allem über eine direkte Stimulation der Osteoblastenvorläuferzellen. Möglicherweise ergibt sich hieraus ein neuer Ansatz, Quercetin auf seinen Osteoporoseschutz hin weiter zu untersuchen.

5 Zusammenfassung (deutsch und englisch)

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung möglicher anti-osteoporotischer Effekte von vier ausgewählten Phytoöstrogenen auf die postmenopausale Osteoporose. Als Untersuchungsmodell stand die OVX-Ratte zur Verfügung. Die Phytoöstrogene verdanken ihren Namen ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit dem endogenen Hormon Östrogen - obgleich es sich hierbei um rein pflanzliche Wirkstoffe handelt. Gegenüber der Hormonersatztherapie sind Phytoöstrogene als nebenwirkungsärmeres Alternativ-Therapeutikum von großem wissenschaftlichen Interesse für die Behandlung der Osteoporose. Unsere Untersuchung wurde an 127 Sprague-Dawley-Rattenweibchen durchgeführt. Die Tiere wurden nach ihrer Ovariectomie - im Alter von 12 Wochen - in 10 Versuchstiergruppen aufgeteilt. Jede Gruppe maß 11 bzw. 12 Tiere. Neben einer unbehandelten Kontrollgruppe, existierten zwei östrogen-supplementierte Positivkontroll-Gruppen sowie acht Phytoöstrogen-supplementierte Tiergruppen. Alle Zusatzstoffe (Östrogen und Phytoöstrogen) wurde jeweils in zwei unterschiedlichen Dosierungsstärken verabreicht. Letztlich wurde ein CT-morphologischer Vergleich von Tibia- und Vertebramessungen durchgeführt, welche am Anfang der Studie sowie nach Ablauf des 3-monatigen Versuchszeitraumes durchgeführt worden sind. Hierbei interessierte uns vor allem die Entwicklung der Dichtewerte von *Substantia spongiosa*, *Substantia corticalis* sowie der *Gesamtknochenmineraldichte*. Ergänzend führten wir eine Serumbestimmung von den Knochen-Markerproteinen *Osteocalcin* und β -*CrossLaps* durch, welche einen Rückschluss auf die Stimulation von Knochenauf- oder Abbau zuließen. Zusätzlich wurde das Körpergewicht der einzelnen Tiere bis zum Ende dokumentiert.

Bezüglich unserer Fragestellung kamen wir zu folgenden Ergebnissen:

Unsere Untersuchung zeigte einen knochenprotektiven Effekt von Daidzein, Equol und Puerarin am Postmenopause-Modell der OVX-Ratte.

- Von den untersuchten Phytoöstrogenen, erwiesen sich die Isoflavon-Vertreter Daidzein, Equol und Puerarin als wirkungsvollste Knochenprotektiva. Sie dämpften das Ausmaß des spongösen Knochenmineraldichteverlustes signifikant ab. Puerarin h

bewirkte hierbei sogar das günstigste Resultat. Die spongiös osteoprotektive Wirkung dieser drei untersuchten Isoflavone, ist vermutlich durch ihr Östrogen-äquivalente Wirkung an den ER zu erklären. Sie interagieren hauptsächlich mit dem ER β -Rezeptor. Von diesem Rezeptor ist bekannt, dass er vorwiegend in der Substantia spongiosa exprimiert wird.

- Von den eingesetzten Isoflavonen erzielten Daidzein und Equol in der hochdosierten Form einen tendenziell höheren Knochenmineraldichtewert.
- Quercetin bot in unserer Untersuchung den niedrigstens Osteoporose-Schutz von allen untersuchten Phytoöstrogenen. Die möglicherweise ausbleibende Beeinflussung des Knochenstoffwechsels ist ggf. durch eine Neuevaluierung der Dosierung realisierbar.
- Die Betrachtung der Knochenmarkerproteine Osteocalcin und β -CrossLaps führt zu teils divergierenden Effekten der einzelnen Testsubstanzen. Der Osteocalcin-Serumspiegel konnte durch die Isoflavon-Vetreter (Daidzein, Equol, Puerarin) nicht nennenswert beeinflusst werden. Quercetin stimuliert die Osteocalcinausschüttung hingegen und erzeugte damit einen Effekt, welchen wir hier nicht sicher erklären können. Die Produktion der β -CrossLaps wurde neben E₂ nur durch Daidzein und Equol abgemildert, so dass eine Östrogen-äquivalente Wirkung vermutet werden kann. Sowohl Puerarin als Quercetin förderten die Ausschüttung der β -CrossLaps und deuten damit auf eine vermehrte Osteoklastenaktivierung hin.
- Die Resultate der Serumparameter decken sich nur teilweise mit den CT-morphologisch erfassten Knochenveränderungen. Dies spricht für Wirkungsmechanismen, welche in diesem Rahmen nicht erklärt werden können.

Weiterhin machten wir folgende Beobachtung:

- Am Knochen bestätigte sich die Substantia spongiosa der proximalen Tibiametaphyse als sensitivstes Knochenkompartiment, um ein Modell für die Typ-I-Osteoporose der Postmenopause darzustellen. Alle Versuchstiergruppen entwickelten in diesem Knochenabschnitt die prägnantesten CT-morphologischen Anzeichen des postmenopausalen Knochenschwundes.
- Die Rattenvertebra erwies sich in unserer Untersuchung als weniger sensitiv, um Knochen-protective Effekte der hier untersuchten Phytoöstrogene aufzuzeigen.

- Der Östrogenmangelstoffwechsel nach der Ovariectomie erzeugt eine Zunahme des Körpergewichtes, welche an die Gewichtsentwicklung bei der postmenopausalen Frau erinnert. Die Behandlung mit E₂ führte zu einer Normalisierungstendenz des Gewichts. Von den eingesetzten Phytoöstrogenen konnten wir einen ähnlichen Effekt nur für Puerarin h zeigen. Hier ist eine dem Östrogen vergleichbare Wirkung anzunehmen.

Mit hoher Wahrscheinlichkeit werden diese Pflanzeninhaltsstoffe auch weiterhin als Alternative zur konventionellen Hormonersatztherapie von wissenschaftlicher Bedeutung sein. Von besonders großem Interesse wäre die Frage, inwieweit der Phytoöstrogenmetabolismus durch eine gezielte Begünstigung der Darmbakterienflora beim Osteoporosetiermodell und schließlich beim Menschen optimiert werden kann.

Langzeituntersuchungen ermöglichen zusätzlich auch die Abschätzung von unerwünschten Nebeneffekten der Phytoöstrogene sowie in diesem Zusammenhang eine Dosisoptimierung.

Phytoestrogen-rich food is known to reduce the postmenopausal bone loss. The ovariectomized rat is an established model to study the postmenopausal osteoporosis. We investigated the estrogenic effects of daidzein, equol, puerarin and quercetin in comparison to 17β -estradiol (E_2) on trabecular and cortical bone in ovariectomized (OVX) rats. 127 female ovx Sprague Dawley rats were separated in twelve groups and fed soy-free or supplemental food with E_2 , daidzein, equol, puerarin or quercetin, respectively in two different doses for three months. In the beginning and in the end of the study proximal tibia, lumbar spine bone mineral density (BMD) and body weight were measured. The BMD was determined by using peripheral quantitative computed tomography. In addition in the end of the study we investigated the influence of the phytoestrogens on osteocalcin and β -crosslaps in the blood plasma of the animals.

The results of the investigated phytoestrogens are summarized in the following list.

- The isoflavons daidzein, equol and puerarin shows an estrogenic effect on the trabecular bone loss and increased its BMD but showed no significant effect on the cortical bone. This could be because of the known fact that these isoflavons interact with $ER\beta$, that is mostly represented in trabecular bone.
- The highest bone sparing effect was induced by the highest dose of daidzein and equol.
- quercetin has lesser effect on trabecular bone loss of the OVX rats. This eventually can be reevaluated through another study with different doses.
- There are surprising effects from the measures of the plasma values osteocalcin and β -CrossLaps. The concentration of osteocalcin was not influenced by the isoflavons (daidzein, equol, puerarin), but quercetin had a concentration of significance. It seem to stimulate the osteoblastogenesis. The level of β -CrossLaps was mildly inhibited by daidzein and equol. We suppose a estrogenic effect by limiting the high level bone turnover. At the other hand puerarin and quercetin stimulated the level of β -CrossLaps and seemed to activate the osteoclastogenesis. We have no explanation for this result.
- Obviously the results for the BMD contradict the indirect effects of the serum parameter on the BMD. These effects could not be understood in the scope of this work.

In addition we determined the following secondary effects:

- The most sensitive location to investigate the postmenopausal osteoporosis is the trabecular bone of the proximal tibia of the rat. This is consistent with effects shown in the literature.
- The lumbar spine was not significantly influenced by phytoestrogens in food.
- The deficiency of endogenous E_2 induced increasing body weight. The same effect is known from postmenopausal women. A treatment with E_2 or phytoestrogens induced decreasing body weight. Puerarin has the most estrogenic effect to normalize the body weight of the OVX rats.

We conclude that daidzein, equol and puerarin have the best bone sparing effects. Puerarin also has the best estrogenic effect on the body weight of the OVX rat.

As phytoestrogens have lesser side effects as the hormone replacement therapy the interest in their effect will likely be high. It could be interesting to study the effect of the human intestinal microflora on the phytoestrogen metabolism to increase the effectiveness of their bone sparing.

6 Tabellenverzeichnis

1.1	Tabelle: Inzidenz der osteoporotischen Hüftfraktur bei der Frau	2
2.1	Tabelle: Testsubstanzen und ihre Dosierungen	25
2.2	Tabelle: XCT Research SA+, technische Merkmale	27
3.1	Tabelle: Durchschnittlich ermittelte Futter- und Testsubstanzaufnahme . .	35
3.2	Tabelle: Gewichtsentwicklung der Versuchstiere	37

7 Abbildungsverzeichnis

1.1	Abbildung: Klassifikation der Phytoöstrogene	4
1.2	Abbildung: Chemische Struktur der Phytoöstrogene	5
1.3	Abbildung: Struktur-Schema eines Röhrenknochens	11
1.4	Abbildung: Messprinzip der pQCT	22
2.1	Abbildung: Übersichts-Scan der proximalen Ratten-Tibia	28
2.2	Abbildung: Übersichts-Scan der Ratten-Lendenwirbelsäule	28
2.3	Abbildung: Dichte-Farbskala des XCT Research SA+	29
2.4	Abbildung: Schematisch dargestellte CT-Messbereiche an der Tibia	30
2.5	Abbildung: Typisches pCT-Schnittbild der Ratten-Tibia	31
2.6	Abbildung: Graphische Aufarbeitung der Messwerte	33
3.1	Abbildung: Körpergewicht der Versuchstiere	36
3.2	Abbildung: Trabekuläre Knochenmineraldichte, proximale Tibiametaphyse	38
3.3	Abbildung: Trabekuläre Knochenmineraldichte, proximalen Tibiadiaphyse	39
3.4	Abbildung: Kortikale Knochenmineraldichte, proximale Tibiametaphyse	40
3.5	Abbildung: Kortikale Knochenmineraldichte, proximale Tibiadiaphyse	41
3.6	Abbildung: Gesamtknochenmineraldichte, proximale Tibiametaphyse	42
3.7	Abbildung: Gesamtknochenmineraldichte, proximale Tibiadiaphyse	43
3.8	Abbildung: Trabekuläre Querschnittsfläche, proximale Tibiametaphyse	44
3.9	Abbildung: Trabekuläre Querschnittsfläche, proximale Tibiadiaphyse	45
3.10	Abbildung: Kortikale Querschnittsfläche, proximale Tibiametaphyse	46
3.11	Abbildung: Kortikale Querschnittsfläche, proximale Tibiadiaphyse	47
3.12	Abbildung: Gesamtquerschnittsfläche, proximale Tibiametaphyse	48
3.13	Abbildung: Gesamtquerschnittsfläche, proximale Tibiadiaphyse	49
3.14	Abbildung: Endostaler Umfang, proximale Tibiametaphyse	50
3.15	Abbildung: Endostaler Umfang, proximale Tibiadiaphyse	51
3.16	Abbildung: Periostaler Umfang, proximale Tibiametaphyse	52
3.17	Abbildung: Periostaler Umfang, proximale Tibiadiaphyse	53

3.18	Abbildung: Trabekuläre Knochenmineraldichte, Vertebra	54
3.19	Abbildung: Kortikale Knochenmineraldichte, Vertebra	55
3.20	Abbildung: Gesamtknochenmineraldichte, Vertebra	56
3.21	Abbildung: Trabekuläre Querschnittsfläche, Vertebra	57
3.22	Abbildung: Kortikale Querschnittsfläche, Vertebra	58
3.23	Abbildung: Gesamtquerschnittsfläche, Vertebra	59
3.24	Abbildung: Endostaler Umfang, Vertebra	60
3.25	Abbildung: Periostaler Umfang, Vertebra	61
3.26	Abbildung: Serumspiegel, Osteocalcin	63
3.27	Abbildung: Serumspiegel, β -CrossLaps	64

8 Literaturverzeichnis

- (Adlercreutz und Mazur 1997) = ADLERCREUTZ H, MAZUR W (1997): Phytoestrogens and Western diseases. *Ann Med* 29, Nr. 2, 95 – 120
- (Adzersen und Strowitzki 2003) = ADZERSEN K H, STROWITZKI T (2003): Phytoöstrogene. Welche Effekte haben sie auf hormonmodulierte Erkrankungen? *Gynäkologische Endokrinologie* 1, Nr. 1, 15 – 27
- (Aguirre et al. 2007) = AGUIRRE J I, PLOTKIN L I, GORTAZAR A R, MILLAN M M, O'BRIEN C A, MANOLAGAS S C, BELLIDO T (2007): A Novel Ligand-independent Function of the Estrogen Receptor Is Essential for Osteocyte and Osteoblast Mechanotransduction. *J Biol Chem* 282, Nr. 35, 25501 – 25508
- (Bauss et al. 1996) = BAUSS F, ESSWEIN A, REIFF K, MÜLLER-BECKMANN G S B (1996): Effect of 17beta-estradiol-bisphosphonate conjugates, potential bone-seeking estrogen pro-drugs, on 17beta-estradiol serum kinetics and bone mass in rats.. *Calcif Tissue Int* 59, Nr. 3, 168 – 173
- (Benlhabib et al. 2002) = BENLHABIB E, BAKER J I, KEYLER D E, SINGH A K (2002): Composition, Red Blood Cell Uptake, and Serum Protein Binding of Phytoestrogens Extracted from Commercial Kudzu-Root and Soy Preparations. *J Med Food* 5, Nr. 3, 109 – 123
- (Benlhabib et al. 2004) = BENLHABIB E, BAKER J I, KEYLER D E, SINGH A K (2004): Effects of Purified Puerarin on Voluntary Alcohol Intake and Alcohol Withdrawal Symptoms in P Rats Receiving Free Access to Water and Alcohol. *J Med Food* 7, Nr. 2, 180 – 186
- (Bennets et al. 1946) = BENNETS H W, UNDERWOOD E J, SHIER F L (1946): A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in western Australia. *Aust Vet J* 22, Nr. 1, 2 – 12
- (Bernstein 2007) = BERNSTEIN M (2007): Revealing estrogen's secret role in obesity. *Chem Rev* 202, 872 – 4400

- (Bhagbat et al. 1999 – 2000) = BHAGBAT S, HAYTOWITZ D B, HOLDEN J M: *Database on the Isoflavone Content of Foods, Release 1.3 - 2002, Forschungsbericht*. USDA-Iowa State University, Des Moines 1999-2000, 1 – 19
- (Bitto et al. 2009) = BITTO A, ALTAVILLA D, BONAIUTO A, POLITO F, MINUTOLI L, STEFANO V D, GIULIANI D, GUARINI S, ARCORACI V, SQUADRITO F (2009): Effects of aglycone genistein in a rat experimental model of postmenopausal metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol* 200, 367 – 376
- (Blair et al. 2008) = BLAIR H C, SIMONET S, LACEY D L, ZAIDI M: Osteoclast Biology. In: *Osteoporosis Bd. 1*; MARCUS R, FELDMAN D, NELSON D A, ROSEN C J. Elsevier Academic Press, Burlington 2008, Kap. 7, 151 – 167
- (Bowey et al. 2003) = BOWEY E, ADLERCREUTZ H, ROWLAND I (2003): Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats.. *Food Chem Toxicol* 41, Nr. 5, 631 – 636
- (Bradford et al. 2010) = BRADFORD P G, GERACEA K V, ROLANDA R L, CHRZANA B G (2010): Estrogen regulation of apoptosis in osteoblasts. *Physiol Behav* 99, Nr. 2, 181 – 185
- (Byun und Lee 2010) = BYUN J S, LEE S S (2010): Effect of soybeans and sword beans on bone metabolism in a rat model of osteoporosis.. *Ann Nutr Metab* 56, Nr. 2, 106 – 112
- (Cagno et al. 2010) = CAGNO R D, MAZZACANE F, RIZZELLO C G, VINCENTINI O, SILANO M, GIULIANI G, ANGELIS M D, GOBBETTI M (2010): Synthesis of isoflavone aglycones and equol in soy milks fermented by food-related lactic acid bacteria and their effect on human intestinal Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 58, Nr. 19, 10338 – 10346
- (Cassidy und Faughnan 2000) = CASSIDY A, FAUGHNAN M (2000): Phyto-estrogens through the life cycle. *Proc Nutr Soc* 59, Nr. 3, 489 – 496
- (Christgau et al. 1998) = CHRISTGAU S, ROSENQUIST C, ALEXANDERSEN P, BJARNASON N H, RAVN P, FLEDELIUS C, HERLING C, QVIST P, CHRISTIANSEN C (1998): Clinical evaluation of the Serum CrossLaps One Step ELISA, a new assay measuring the serum concentration of bone-derived degradation products of type I collagen C-telopeptides. *Clin Chem* 44, Nr. 11, 2290 – 2300

- (Clarke 2008) = CLARKE B (2008): Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3, Nr. 3, 131 – 139
- (Cruz–Correa et al. 2006) = CRUZ–CORREA M, SHOSKES D A, SANCHEZ P, ZHAO R, HYLIND L M, WEXNER S D, GIARDIELLO F M (2006): Combination Treatment With Curcumin and Quercetin of Adenomas in Familial Adenomatous Polyposis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4, Nr. 8, 1035 – 1038
- (Dempster et al. 1995) = DEMPSTER D, BIRCHMANA R, XUA R, LINDSAYAC R, SHEN-AB V (1995): Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. *Bone* 16, Nr. 1, 157 – 161
- (Dietel 2010) = DIETEL M (2010): Hormone replacement therapy (HRT), breast cancer and tumor pathology. *Maturitas* 65, Nr. 3, 183 – 189
- (Faulkner und Miller 2008) = FAULKNER K G, MILLER P D: Clinical Use of Bone Densitometry. In: *Osteoporosis Bd. 2*; MARCUS R, FELDMAN D, NELSON D A, ROSEN C J. Elsevier Academic Press, Burlington 2008, Kap. 62, 1493 – 1518
- (Ferrari 2009) = FERRARI A (2009): Soy extract phytoestrogens with high dose of isoflavones for menopausal symptoms. *J Obstet Gynaecol Res* 35, Nr. 6, 1083 – 1090
- (Ferretti et al. 2002) = FERRETTI J, COINTRY G, CAPOZZA R: Noninvasive Analysis of Bone Mass, Structure, and Strength. In: *Orthopaedic Issues in Osteoporosis*; AN Y. CRC Press, Boca Raton 2002, 145 – 167
- (Francisco et al. 2011) = FRANCISCO J I, YU Y, OLIVER R A, WALSH W R (2011): Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. *J Orthop Res* 29, Nr. 2, 189 – 196
- (Fritton und Weinbaum 2009) = FRITTON S P, WEINBAUM S (2009): Fluid and Solute Transport in Bone: Flow-Induced Mechanotransduction. *Annu Rev Fluid Mech* 41, 347 – 374
- (Frost 1992) = FROST H M (1992): The role of changes in mechanical usage set points in the pathogenesis of osteoporosis.. *J Bone Miner Res* 7, Nr. 2, 253 – 261
- (Frost et al. 2002) = FROST H M, SCHNEIDER P, SCHNEIDER R (2002): Osteoporosis a disease requiring treatment or osteopenia a physiologic state? - WHO-definition in contrast the Utah Paradigma. *Dtsch Med Wochenschr* 127, Nr. 48, 2570 – 2574

- (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, 2623 – 2627
- (Gasser 1995) = GASSER J A (1995): Assessing bone quantity by pQCT. *Bone* 17, Nr. 4, 145S – 154S
- (Gleason et al. 2009) = GLEASON C E, CARLSSON C M, BARNET J H, MEADE S A, SETCHELL K D R, ATWOOD C S, JOHNSON S C, RIES M L, ASTHANA S (2009): A preliminary study of the safety, feasibility and cognitive efficacy of soy isoflavone supplements in older men and women. *Age Ageing* 38, Nr. 1, 86 – 93
- (Gong et al. 1964) = GONG J K, ARNOLD J S, COHN S H (1964): Composition of trabecular and cortical bone. *Anat Rec* 149, Nr. 3, 325 – 332
- (Gorski et al. 1984) = GORSKI J, WELSHONS W, SAKAI D (1984): Remodeling the estrogen receptor model. *Mol Cell Endocrinol* 36, Nr. 1 - 2, 11 – 15
- (Gräfe und Veit 1999) = GRÄFE E U, VEIT M: Untersuchungen zur systemischen Verfügbarkeit von pflanzlichen Wirkstoffen. In: *Phytopharmaka Band V - Forschung und klinische Anwendung*; LOEW D, BLUME H, DINGERMANN T. Steinkopff Verlag, Darmstadt 1999, Kap. 1, 63 – 73
- (Gu et al. 2009) = GU Y, ZHU C-F, DAI Y-L, ZHONG Q, SUN B (2009): Inhibitory effects of genistein on metastasis of human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 15, Nr. 39, 4952 – 4957
- (Guglielmi et al. 2000) = GUGLIELMI G, SERIO A D, FUSILLI S, SCILLITANI A, CHIODINI I, TORLONTANO M, CAMMISA M (2000): Age-related changes assessed by peripheral QCT in healthy Italian Women. *Eur Radiol* 10, Nr. 4, 609 – 614
- (Gültekin und Yildiz 2006) = GÜLTEKIN E, YILDIZ F: Introduction to Phytoestrogens. In: *Phytoestrogens in Functional Foods*; YILDIZ F. Taylor & Francis Group, Boca Raton 2006, Kap. 1, 3 – 18
- (Hanstein 2007) = HANSTEIN B (2007): Östrogenvermittelte Regulation der Energiehomöostase: Implikationen für die perimenopausale Gewichtsentwicklung. *Der Gynäkologe* 40, Nr. 8, 599 – 603
- (Harvey et al. 2010) = HARVEY N, DENNISON E, COOPER C (2010): Osteoporosis: impact on health and economics. *Nat Rev Rheumatol* 6, 99 – 105

- (Häussler et al. 2006) = HÄUSSLER B, GOTHE H, MANGIAPANE S, GLAESKE G, PIEN-
KA L, FELSEBERG D (2006): Versorgung von Osteoporose-Patienten in Deutschland:
Ergebnisse der BoneEVA-Studie. *Dtsch Arztebl Int* 103, Nr. 39, A-2542 – A-2548
- (Hidaka et al. 2006) = HIDAKA S, OKAMOTO Y, UCHIYAMA S, NAKATSUMA A, HA-
SHIMOTO K, OHNISHI S T, YAMAGUCHI M (2006): Royal Jelly Prevents Osteoporosis
in Rats: Beneficial Effects in Ovariectomy Model and in Bone Tissue Culture Model.
Evid Based Complement Alternat Med 3, Nr. 3, 339 – 348
- (Hughes et al. 1996) = HUGHES D E, DAI1 A, TIFFEE J C, LI1 H H, MUNDY G R,
BOYCE1 B F (1996): Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by
TGF-beta. *Nat Med* 2, Nr. 10, 1132 – 1136
- (Hunziker et al. 2000) = HUNZIKER J, WRONSKI T, MILLERL S (2000): Mandibu-
lar Bone Formation Rates in Aged Ovariectomized Rats Treated with Anti-resorptive
Agents Alone and in Combination with Intermittent Parathyroid Hormone. *J Dent Res*
79, Nr. 6, 1431 – 1438
- (Ikeda et al. 1993) = IKEDAA T, SCHIPANI E, SHIGENOA M B C, KASAIA R, KOHNOA
H, OHTAA S, OKUMURAA H, KONISHIA J, YAMAMUROA T (1993): Ovariectomy decre-
ases the mRNA levels of transforming growth factor-beta 1 and increases the mRNA
levels of osteocalcin in rat bone in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 194, Nr. 3,
1228 – 1233
- (Imai et al. 2009) = IMAI Y, YOUN M-Y, KONDOH S, NAKAMURA T, KOUZMENKO A,
MATSUMOTO T, TAKADA I, TAKAOKA K, KATO S (2009): Estrogens maintain bone
mass by regulating expression of genes controlling function and life span in mature
osteoclasts. *Ann N Y Acad Sci* 1173, Nr. S1, E31 – E39
- (Inada et al. 2011) = INADA M, MATSUMOTO C, MIYAURA C (2011): Animal models
for bone and joint disease. Ovariectomized and orchidectomized animals. *Clin Calcium*
21, Nr. 2, 164 – 170
- (Ishimi 2009) = ISHIMI Y (2009): Soybean Isoflavones in Bone Health. *Forum Nutr*
61, 104 – 116
- (Jee und Yao 2001) = JEE W, YAO W (2001): Overview: animal models of osteopenia
and osteoporosis. *J Musculoskel Neuron Interact* 1, Nr. 3, 193 – 207
- (Jeon et al. 2009) = JEON B-J, AHN J, KWAK H-S (2009): Effect of isoflavone-enriched
milk on bone mass in ovariectomized rats. *J Med Food* 12, Nr. 6, 1260 – 1267

- (Kalu 1991) = KALU D N (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15, Nr. 3, 175 – 191
- (Kanis et al. 1994) = KANIS J A, MELTON J, CHRISTIANSEN C, JOHNSTON C C, KHALTAEV N (1994): The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 9, Nr. 8, 1137 – 1141
- (Karahalil 2006) = KARAHALIL B: Benefits and Risks of Phytoestrogens. In: *Phytoestrogens in Functional Foods*; YILDIZ F. Taylor & Francis Group, Boca Raton 2006, Kap. 8, 209 – 239
- (Kawakita et al. 2009) = KAWAKITA S, MAROTTA F, NAITO Y, GUMASTE U, JAIN S, TSUCHIYA J, MINELLI E (2009): Effect of an isoflavones-containing red clover preparation and alkaline supplementation on bone metabolism in ovariectomized rats. *Clin Interv Aging* 4, 91 – 100
- (Keiko et al. 2001) = KEIKO M, TOSHIHARU H, JUNEI K, TOMOKI H, MASAFUMI O, TOSHIHIRO N, SUMITO O, SATOSHI I, MASAMI M, YUKITO M (2001): Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors α and β . *Biol Pharm Bull* 24, Nr. 4, 351 – 356
- (Keung 2002) = KEUNG W M: Preclinical studies of kudzu (*Pueraria lobata*) as a treatment of alcohol abuse. In: *The Genus Pueraria (Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles)*; KEUNG W M. Taylor & Francis, New York 2002, Kap. 9, 169 – 186
- (Keung und Vallee 1998) = KEUNG W M, VALLEE B L (1998): Daidzin and its antidiprotropic analogs inhibit serotonin and dopamine metabolism in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, Nr. 5, 2198 – 2203
- (Keung et al. 1997) = KEUNG W M, KLYOSOV A A, VALLEE B L (1997): Daidzin inhibits mitochondrial aldehyde dehydrogenase and suppresses ethanol intake of Syrian golden hamsters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, Nr. 5, 1675 – 1679
- (Kharode et al. 2008) = KHARODE Y P, SHARP M C, BODINE P V N: Utility of the Ovariectomized Rat as a Model for Human Osteoporosis in Drug Discovery. In: *Osteoporosis - Methods and Protocols*; WESTENDORF J J. Humana Press, Totowa 2008, Kap. 8, 111 – 124
- (Koh et al. 2009) = KOH W-P, WU A H, WANG R, ANG L-W, HENG D, YUAN J-M, YU M C (2009): Gender-specific Associations Between Soy and Risk of Hip Fracture in the Singapore Chinese Health Study. *Am J Epidemiol* 170, Nr. 7, 901 – 909

- (Kolios et al. 2010) = KOLIOS L, HOERSTER A K, SEHMISCH S, MALCHEREK M C, RACK T, TEZVAL M, SEIDLOVÁ-WUTTKE D, WUTTKE W, STUERMER K M, STUERMER E K (2010): Do Estrogen and Alendronate Improve Metaphyseal Fracture Healing When Applied as Osteoporosis Prophylaxis. *Calcif Tissue Int* 86, Nr. 1, 23 – 32
- (Komm et al. 2008) = KOMM B S, CHESKIS B, BODINE P V N: Regulation of Bone Cell Function by Estrogens. In: *Osteoporosis Bd. 1*; MARCUS R, FELDMAN D, NELSON D A, ROSEN C J. Elsevier Academic Press, Burlington 2008, Kap. 14, 383 – 423
- (Komrakova et al. 2011) = KOMRAKOVA M, SEHMISCH S, TEZVAL M, SCHMELZ U, FRAUENDORF H, GRUEGER T, WESSLING T, KLEIN C, BIRTH M, STUERMER K M, STUERMER E K (2011): Impact of 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC), daidzein and estrogen on intact and osteotomized bone in osteopenic rats.. *J Endocrinol* 211, Nr. 2, 157 –168.
- (Krishna und Somashekhar 2006) = KRISHNA D R, SOMASHEKHAR M: Pharmacokinetics of Phytoestrogens. In: *Phytoestrogens in functional Foods*; YILDIZ F. Taylor & Francis Group, Boca Raton 2006, Kap. 4, 99 – 121
- (Kuiper et al. 1996) = KUIPER G G J M, PELTO-HUIKKOT E E M, NILSSON S, GUSTAFSSON J-A (1996): Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, Nr. 12, 5925 – 5930
- (Kuiper et al. 1998) = KUIPER G G J M, LEMMEN J G, CARLSSON B, CORTON J C, SAFE S H, SAAG P T van der, BURG B van der, GUSTAFSSON J-A (1998): Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor beta. *Endocrinology* 139, Nr. 10, 4252 – 4263
- (Lamartiniere et al. 2002) = LAMARTINIERE C A, WANG J, SMITH-JOHNSON M, ELTOUM I-E (2002): Daidzein: Bioavailability, Potential for Reproductive Toxicity, and Breast Cancer Chemoprevention in Female Rats. *Toxicol Sci* 65, Nr. 2, 228 – 238
- (Lampe et al. 2001) = LAMPE J W, SKOR H E, LI S, LA K W ha, HOWALD W N, CHEN C (2001): Wheat Bran and Soy Protein Feeding Do Not Alter Urinary Excretion of the Isoflavan Equol in Premenopausal Women. *Nutrition* 131, Nr. 3, 740 – 744
- (Lau et al. 2001) = LAU E M C, LEE J K, SURIWONGPAISAL P, SAW S M, DE S D, KHIR A, SAMBROOK P (2001): The Incidence of Hip Fracture in Four Asian Countries: The Asian Osteoporosis Study (AOS). *Osteoporosis Int* 12, Nr. 3, 239 – 243

- (Lee et al. 2004) = LEE Y-B, LEE H J, KIM K S, LEE J-Y, NAM S-Y, CHEON S-H, SOHN H-S (2004): Evaluation of the Preventive Effect of Isoflavone Extract on Bone Loss in Ovariectomized Rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, Nr. 5, 1040 – 1045
- (Legette et al. 2009) = LEGETTE L L, MARTIN B R, SHAHNAZARI M, LEE W-H, HELFERICH W G, QIAN J, WATERS D J, ARABSHAHI A, BARNES S, WELCH J, BOSTWICK D G, WEAVER C M (2009): Supplemental Dietary Racemic Equol Has Modest Benefits to Bone but Has Mild Uterotropic Activity in Ovariectomized Rats. *Nutrition* 139, Nr. 10, 1908 – 1913
- (Lelovas et al. 2008) = LELOVAS P P, XANTHOS T T, THOMA S E, LYRITIS G P, DON-TAS I A (2008): The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 58, Nr. 5, 424 – 430
- (Li und Yu 2003) = LI B, YU S (2003): Effect of puerarin on the bone metabolism in vitro. *Beijing Da Xue Xue Bao* 35, Nr. 1, 74 – 77
- (Lian und Stein 2008) = LIAN J B, STEIN G S: Osteoblast Biology. In: *Osteoporosis Bd 1*; MARCUS R, FELDMAN D, NELSON D A, ROSEN C J. Elsevier Academic Press, Burlington 2008, Kap. 6, 93 – 150
- (Lindsay und Cosman 2008) = LINDSAY R, COSMAN F: Osteoporosis. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*; LINDSAY R, COSMAN F. McGraw Hill Medical, New York, 2008, Kap. 348, 2397 – 2408
- (Lumachi et al. 2009) = LUMACHI F, ERMANI M, CAMOZZI V, TOMBOLAN V, LUI-SETTO G (2009): Changes of bone formation markers osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase in postmenopausal women with osteoporosis. *Ann NY Acad Sci* 1173 Suppl 1, E60 – E63
- (Lye et al. 2009) = LYE H-S, KUAN C-Y, EWE J-A, FUNG W-Y, LIONG M-T (2009): The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, Renin, and phytoestrogens. *Int J Mol Sci* 10, Nr. 9, 3755 – 3775
- (Mahmud 2010) = MAHMUD K (2010): Natural hormone therapy for menopause. *Gynecol Endocrinol* 26, Nr. 2, 81 – 85
- (Majeska et al. 1994) = MAJESKA R J, RYABY J T, EINHORN T A (1994): Direct modulation of osteoblastic activity with estrogen. *Bone Joint Surg Am* 76, Nr. 5, 713 – 721

- (Manolagas 2000) = MANOLAGAS S C (2000): Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocr Rev* 21, Nr. 2, 115 – 137
- (Marini et al. 2008) = MARINI H, BITTO A, ALTAVILLA D, BURNETT B P, POLITO F, STEFANO V D, MINUTOLI L, ATTERITANO M, LEVY R M, D'ANNA R, FRISINA N, MAZZAFERRO S, CANCELLIERI F, CANNATA M L, CORRADO F, FRISINA A, ADAMO V, LUBRANO C, SANSOTTA C, MARINI R, ADAMO E B, SQUADRITO F (2008): Breast safety and efficacy of genistein aglycone for postmenopausal bone loss: a follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 93, Nr. 12, 4787 – 4796
- (Marotti 2000) = MAROTTI G (2000): The osteocyte as a wiring transmission system. *J Musculoskel et Neuronal Interact* 1, Nr. 2, 133 – 136
- (Marrian und Haslewood 1932) = MARRIAN F, HASLEWOOD G A D (1932): Equol, a new inactive phenol isolated from the Ketohydroxyoestrin fraction of mares' urine. *Biochem J* 26, Nr. 4, 1227 – 1232
- (Martínez et al. 2009) = MARTÍNEZ J, OLMOS J M, HERNÁNDEZ J L, PINEDO G, LLORCA J, OBREGÓN E, VALERO C, GONZÁLEZ-MACÍAS J (2009): Bone turnover markers in Spanish postmenopausal women: the Camargo cohort study. *Clin Chim Acta* 409, Nr. 1 - 2, 70 – 74
- (Maskarinec et al. 2008) = MASKARINEC G, WATTS K, KAGIHARA J, HEBSHI S M, FRANKE A A (2008): Urinary Isoflavonoid Excretion is Similar after Consuming Soy Milk and Miso Soup in Japanese-American Women. *Br J Nutr* 100, Nr. 2, 424 – 429
- (Mathey et al. 2007) = MATHEY J, MARDON J, FOKIALAKIS N, PUEL C, KATI-COULIBALY S, MITAKOU S, BENNETAU-PELISSERO C, LAMOTHE V, DAVICCO M J, LEBECQUE P, HORCAJADA M N, COXAM V (2007): Modulation of soy isoflavones bioavailability and subsequent effects on bone health in ovariectomized rats: the case for equol. *Osteoporosis Int* 18, Nr. 5, 671 – 679
- (Mattei et al. 2006) = MATTEI V D, SCALFI L, BRANCA F: Phytoestrogens and Body Composition. In: *Phytoestrogens in Functional Foods*; YILDIZ F. Taylor & Francis Group, Boca Raton 2006, 153 – 165
- (McGowan und Stefanick 2008) = MCGOWAN J A, STEFANICK M L: Estrogen Therapy: Prevention and Treatment of Osteoporosis. In: *Osteoporosis Bd. 2*; MCGOWAN J A, STEFANICK M L. Elsevier Academic Press, Burlington 2008, Kap. 72, 1687 – 1703

- (Michelfelder 2009) = MICHELFELDER A J (2009): Soy: A Complete Source of Protein. *Am Fam Physician* 79, Nr. 1, 43 – 47
- (Mihaljević et al. 2009) = MIHALJEVIĆ I, MUDRI D, SMOLIĆ R, SMOLIĆ M, TUČAK-ZORIĆ S (2009): Biochemical bone turnover markers: significance in patients with osteoporosis. *Coll Antropol* 33 Suppl. 2, 21 – 24
- (Miller 2008) = MILLER P D: Bisphosphonates: Pharmacology and Use in the Treatment of Osteoporosis. In: *Osteoporosis Bd. 1*; MARCUS R, FELDMAN D, NELSON D A, ROSEN C J. Elsevier Academic Press, Burlington 2008, Kap. 74, 1725 – 1742
- (Morel et al. 1993) = MOREL I, LESCOAT G, COGREL P, SERGENT O, PASDELOUP N, BRISSOT P, CILLARD P, CILLARD J (1993): Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids Catechin, Quercetin and Diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte. *Biochem Pharmacol* 45, Nr. 1, 13–19
- (Morgan et al. 2008) = MORGAN E F, BARNES G L, EINHORN T A: The Bone Organ System: Form and Function. In: *Osteoporosis Bd. 1*; MARCUS R, FELDMAN D, NELSON D A, ROSEN C J. Elsevier Academic Press, Burlington 2008, Kap. 1, 3 – 25
- (Naciff et al. 2004) = NACIFF J M, OVERMANN G J, TORONTALI S M, CARR G J, TIESMAN J P, DASTON G P (2004): Impact of the Phytoestrogen Content of Laboratory Animal Feed on the Gene Expression Profile of the Reproductive System in the Immature Female Rat. *Environ Health Perspect* 112, Nr. 15, 1519 – 1526
- (Nagata 2010) = NAGATA C (2010): Factors to Consider in the Association Between Soy Isoflavone Intake and Breast Cancer Risk. *Int J Epidemiol* 20, Nr. 2, 83 – 89
- (Nagel et al. 1998) = NAGEL S C, SAAL F S vom, WELSHONS W V (1998): The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity. *Exp Biol Med* 217, Nr. 3, 300–309
- (Newton et al. 2006) = NEWTON K, LACROIX A, LEVY L, LI S, QU P, POTTER J, LAMPE J (2006): Soy protein and bone mineral density in older men and women: a randomized trial. *Maturitas* 55, Nr. 3, 270 – 277
- (Nicolella et al. 2008) = NICOLELLA D, FENG J, MORAVITS D, BONIVITCH A, WANG Y, DUSECICH V, YAO W, LANE N, BONEWALD L (2008): Effects of nanomechanical bone tissue properties on bone tissue strain: Implications for osteocyte mechanotransduction. *J Musculoskel et Neuronal Interact* 8, Nr. 4, 330 – 331

- (NIH) = NIH: *Structure of Bone Tissue*. U. S. National Institute of Health. – URL <http://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/tissue.html>. – Im Internet abgerufen am 31. Januar 2010
- (Ohtori et al. 2010) = OHTORI S, AKAZAWA T, MURATA Y, KINOSHITA T, YAMASHITA M, NAKAGAWA K, INOUE G, NAKAMURA J, ORITA S, OCHIAI N, KISHIDA S, TAKASO M, EGUCHI Y, YAMAUCHI K, SUZUKI M, AOKI Y, TAKAHASHI K (2010): Risedronate decreases bone resorption and improves low back pain in postmenopausal osteoporosis patients without vertebral fractures.. *J Clin Neurosci* 17, Nr. 2, 209 – 213
- (Om und Shim 2007) = OM A-S, SHIM J-Y (2007): Effect of daidzein, a soy isoflavone, on bone metabolism in Cd-treated ovariectomized rats. *Acta Biochim Pol* 54, Nr. 3, 641 – 646
- (Ørgaard und Jensen 2008) = ØRGAARD A, JENSEN L (2008): The Effects of Soy Isoflavones on Obesity. *Exp Biol Med (Maywood)* 233, Nr. 9, 1066 – 1080
- (Oseni et al. 2008) = OSENI T, PATEL R, PYLE J., JORDAN V C (2008): Selective Estrogen Receptor Modulators and Phytoestrogens. *Planta Med* 74, Nr. 13, 1656 – 1665
- (Palumbo et al. 2009) = PALUMBO C, FERRETTI M, LAURA BERTONI AND F C, RESCA E, CASOLARI B, CARNEVALE G, ZAVATTI M, MONTANARI C, BENELLI A., ZANOLI P (2009): Influence of ferutinin on bone metabolism in ovariectomized rats. I: role in preventing osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 27, Nr. 5, 538 – 545
- (Penetar et al. 2006) = PENETAR D M, TETER C J, A Z M, TRACY M, LEE D Y-W, LUKAS S E (2006): Pharmacokinetic Profile of the Isoflavone Puerarin After Acute and Repeated Administration of a Novel Kudzu Extract to Human Volunteers. *J Altern Complement Med* 12, Nr. 6, 543 – 548
- (Picherit et al. 2000) = PICHERIT C, COXAM V, BENNETAU-PELISSERO C, KATI-COULIBALY S, DAVICCO M-J, LEBECQUE P, BARLET J-P (2000): Daidzein Is More Efficient than Genistein in Preventing Ovariectomy-Induced Bone Loss in Rats. *Nutrition* 130, Nr. 7, 1675 – 1681
- (Piekariski und Munro 1977) = PIEKARSKI K, MUNRO M (1977): Transport mechanism operating between blood supply and osteocytes in long bones. *Nature* 269, Nr. 5623, 80 – 82

- (Poulsen et al. 2009) = POULSEN R C, DU T L, MOUGHAN P J, MC M C (2009): Ileal and faecal digestibility of daidzein and genistein and plasma bioavailability of these isoflavones and their bioactive metabolites in the ovariectomised rat.. *Mol Nutr Food Res* 53, Nr. 1, S27 – S35
- (Prouillet et al. 2004) = PROUILLET C, MAZIÈRE J-C, MAZIÈRE C, WATTEL A, BRAZIER M, KAMEL S (2004): Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. *Biochem Pharmacol* 67, Nr. 7, 1307 – 1313
- (Qu et al. 1998) = QU Q, PERÄLÄ-HEAPE M, KAPANEN A, DAHLLUND J, SALO J, VÄÄNÄNEN H K, HÄRKÖNEN P (1998): Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone* 22, Nr. 3, 201 – 209
- (Rachoń et al. 2007a) = RACHOŃ D, SEIDLOVÁ-WUTTKE D, VORTHERMS T, WUTTKE W (2007a): Effects of dietary equol administration on ovariectomy induced bone loss in Sprague-Dawley rats. *Maturitas* 58, Nr. 3, 308 – 315
- (Rachoń et al. 2007b) = RACHOŃ D, VORTHERMS T, SEIDLOVÁ-WUTTKE D, WUTTKE W (2007b): Dietary daidzein and puerarin do not affect pituitary LH expression but exert uterotrophic effects in ovariectomized rats. *Maturitas* 57, Nr. 2, 161 – 170
- (Rachoń et al. 2007c) = RACHOŃ D, VORTHERMS T, SEIDLOVÁ-WUTTKE D, MENCHE A, WUTTKE W (2007c): Uterotrophic effects of dietary equol administration in ovariectomized Sprague–Dawley rats. *Climacteric* 10, Nr. 5, 416 – 426
- (Raimondi et al. 2009) = RAIMONDI S, RONCAGLIA L, LUCIA M D, AMARETTI A, LEONARDI A, PAGNONI U M, ROSSI M (2009): Bioconversion of soy isoflavones daidzin and daidzein by Bifidobacterium strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 81, Nr. 5, 943 – 950
- (Raisz 2005) = RAISZ L G (2005): Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *Eur J Clin Invest* 115, Nr. 12, 3318 – 3325
- (Ren et al. 2007) = REN P, JI H, SHAO Q, CHEN X, HAN J, SUN Y (2007): Protective Effects of Sodium Daidzein Sulfonate on Trabecular Bone in Ovariectomized Rats. *Pharmacology* 79, Nr. 3, 129 – 136
- (Riggs et al. 1998) = RIGGS B L, KHOSLA S, MELTON L J (1998): A Unitary Model for Involutional Osteoporosis: Estrogen Deficiency Causes Both Type I and Type II

- Osteoporosis in Postmenopausal Women and Contributes to Bone Loss in Aging Men. *J Bone Miner Res* 13, Nr. 5, 763 – 773
- (Riggs et al. 2002) = RIGGS B L, KHOSLA S, MELTON L J (2002): Sex Steroids and the Construction and Conservation of the Adult skeleton. *Endocr Rev* 23, Nr. 3, 279 – 302
- (Rishi 2006) = RISHI R K: Chemistry and Mechanism of Action of Phytoestrogens. In: *Phytoestrogens in functional foods*; YILDIZ F. Taylor & Francis Group, Boca Raton 2006, Kap. 3, 81 – 95
- (Rissanen et al. 2008) = RISSANEN J P, SUOMINEN M I, PENG Z, MORKO J, RASI S, RISTELI J, HALLEEN J M (2008): Short-term changes in serum PINP predict long-term changes in trabecular bone in the rat ovariectomy model. *Calcif Tissue Int* 82, Nr. 2, 155 – 161
- (Rochleder 1858) = ROCHLEDER F (1858): Über das Vorkommen des Quercitrin als Blütenfarbestoff. *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften* 29, 565 – 568
- (Rossouw et al. 2002) = ROSSOUW J E, ANDERSON G L, PRENTICE R L, LACROIX A Z, KOOPERBERG C, STEFANICK M L, JACKSON R D, BERESFORD S A, HOWARD B V (2002): Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women. *JAMA* 288, Nr. 3, 321 – 333
- (Roudsari et al. 2005) = ROUDSARI A H, TAHBAZ F, HOSSEIN-NEZHAD A, ARJMANDI B, LARIJANI B., KIMIAGAR S M (2005): Assessment of soy phytoestrogens' effects on bone turnover indicators in menopausal. *Nutr J* 4, Nr. 30, 1 – 5
- (Schorlemmer) = SCHORLEMMER S: Bildgebende Verfahren zur Knochendichtemessung / Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Universität Ulm. URL <http://www.uni-ulm.de/med/fakultaet/studium-und-lehre/dozenten.html>. – Forschungsbericht. Im Internet abgerufen am 24. Juli 2011
- (Schwartz et al. 1999) = SCHWARTZ A V, KELSEY J L, MAGGI S, TUTTLEMAN M, HO S C, JONSSON P V, POOR G, CASTRO J A S de, L X, MATKIN C C, NELSON L M, HEYSE S P (1999): International variation in the incidence of hip fractures: Cross-National Project on osteoporosis for the World Health Organization Program for Research on Aging. *Osteoporosis Int* 9, Nr. 3, 242 – 253

- (Sehmisch et al. 2010a) = SEHMISCH S, ERREN M, KOLIOS L, TEZVAL M, SEIDLOVÁ-WUTTKE D, WUTTKE W, STUERMER K M, STUERMER E K (2010a): Effects of isoflavones equol and genistein on bone quality in a rat osteopenia model. *Phytother Res* 24, Nr. 2, S168 – S174
- (Sehmisch et al. 2010b) = SEHMISCH S, UFFENORDE J, MAEHLMEYER S, TEZVALA M, JARRY H, STUERMER K, STUERMER E (2010b): Evaluation of bone quality and quantity in osteoporotic mice - The effects of genistein and equol. *Phytomedicine* 17, Nr. 6, 424 – 430
- (Seidlová-Wuttke et al. 2003) = SEIDLOVÁ-WUTTKE D, JARRY H, BECKER T, CHRISTOFFEL V, WUTTKE W (2003): Pharmacology of Cimicifuga racemosa extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. *Maturitas* 44 Suppl 1, S39 – S50
- (Seidlová-Wuttke et al. 2008) = SEIDLOVÁ-WUTTKE D, PRELLE K, FRITZEMEIER K H, WUTTKE W (2008): Effects of estrogen receptor alpha- and beta-selective substances in the metaphysis of the tibia and on serum parameters of bone and fat tissue metabolism of ovariectomized rats. *Bone* 43, Nr. 5, 849 – 855
- (Selvaraj et al. 2004) = SELVARAJ V, ZAKROCZYMSKI M A, NAAZ A, MUKAI M, JU Y H, DOERGE D R, KATZENELLENBOGEN J A, HELFERICH W G, PAUL S COOKE² (2004): Estrogenicity of the Isoflavone Metabolite Equol on Reproductive and Non-Reproductive Organs in Mice. *Biol Reprod* 71, Nr. 3, 966 – 972
- (Setchell 2001) = SETCHELL K D R (2001): Soy Isoflavones—Benefits and Risks from Nature’s Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). *J Am Coll Nutr* 20, Nr. 5, 354S – 362S
- (Setchell und Lydeking-Olsen 2003) = SETCHELL K D R, LYDEKING-OLSEN E (2003): Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr* 78, Nr. 3, 593S – 609S
- (Setchell et al. 2002) = SETCHELL K D R, BROWN N M, LYDEKING-OLSEN E (2002): The clinical importance of the Metabolite Equol - a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr* 132, Nr. 12, 3577 – 3584
- (Setchell et al. 2009a) = SETCHELL K D R, ZHAO X, JHA P, HEUBI J E, BROWN N M (2009a): The pharmacokinetic behavior of the soy isoflavone metabolite S(-)-equol and

- its diastereoisomer R-(+)equol in healthy adults determined by using stable-isotope-labeled tracers. *Am J Clin Nutr* 90, Nr. 4, 1029 – 1037
- (Setchell et al. 2009b) = SETCHELL K D R, ZHAO X, SHOAF S E, RAGLAND K (2009b): The pharmacokinetics of S-(-)equol administered as SE5-OH tablets to healthy postmenopausal women.. *J Nutr* 139, Nr. 11, 2037 – 2043
- (van Seumeren 2000) = SEUMEREN I van (2000): Weight gain and hormone replacement therapy : are women's fears justified?. *Maturitas* 34 Suppl 1, S3 – S8
- (Siddiqui et al. 2011) = SIDDIQUI J A, SWARNKAR G, SHARAN K, CHAKRAVARTI B, GAUTAM A K, RAWAT P, KUMAR M, GUPTA V, MANICKAVASAGAM L, DWIVEDI A K, MAURYA R, CHATTOPADHYAY N (2011): A naturally occurring rare analog of quercetin promotes peak bone mass achievement and exerts anabolic effect on osteoporotic bone. *Osteoporosis Int* 22, Nr. 12, 3013 – 3027
- (Srivastava et al. 2005) = SRIVASTAVA A K, VLIET E L, LEWIECKI E M, MARICIC M, ABDELMALEK A, GLUCK O, BAYLINK D J (2005): Clinical Use of Serum and Urine Bone Markers in the Management of Osteoporosis. *Curr Med Res Opin* 21, Nr. 7, 1015 – 1026
- (Starke und Herrmann 1976) = STARKE H, HERRMANN K (1976): Flavonole und Flavone der Gemüsearten. *Eur Food Res Technol* 161, Nr. 1, 137 – 142
- (Stratec 2000) = Stratec Medizintechnik GmbH: *XCT Research Serie SA+*. Pforzheim 2000
- (Swedenborg et al. 2009) = SWEDENBORG E, POWER K A, CAI W, PONGRATZ I, RÜEGG J (2009): Regulation of estrogen receptor beta activity and implications in health and disease. *Cell Mol Life Sci* 66, Nr. 24, 3873 – 3894
- (Syed et al. 2005) = SYED F A, MÖDDER U I, FRASER D G, SPELSBERG T C, ROSEN C J, KRUST A, CHAMBON P, JAMESON J L, KHOSLA S (2005): Skeletal Effects of Estrogen Are Mediated by Opposing Actions of Classical and Nonclassical Estrogen Receptor Pathways. *J Bone Miner Res* 20, Nr. 11, 1992 – 2001
- (Szulc und Delmas 2008) = SZULC P, DELMAS P D: Biochemical Markers of Bone Turnover in Osteoporosis. In: *Osteoporosis Bd. 1*; MARCUS R, FELDMAN D, NELSON D A, ROSEN C J. Elsevier Academic Press, Burlington 2008, Kap. 63, 1519 – 1545

- (Taguchi et al. 2006) = TAGUCHI H, CHEN H, YANO R, SHOUMURA S (2006): Comparative effects of milk and soymilk on bone loss in adult ovariectomized osteoporosis rat.. *Okajimas Folia Anat Jpn* 83, Nr. 2, 53 – 59
- (Tezval et al. 2010) = TEZVAL M, SEHMISCH S, SEIDLOVÁ-WUTTKE D, RACK T, KOLIOS L, WUTTKE W, STUERMER K M, STUERMER E K (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, Nr. 3, 235 – 240
- (Thawornkuno et al. 2009) = THAWORNKUNO C, TANAKA M, SONE T, ASANO K (2009): Biotransformation of daidzein to equol by crude enzyme from *Asaccharobacter celatus* AHU1763 required an anaerobic environment. *Biosci Biotechnol Biochem* 73, Nr. 6, 1435 – 1438
- (Wada et al. 2009) = WADA S, FUKAWA T, KAMIYA S (2009): Biochemical markers of bone turnover. New aspect. Bone metabolic markers available in daily practice.. *Clin Calcium* 19, Nr. 8, 1075 – 1082
- (Wang et al. 2003) = WANG X, WU J, CHIBA H, UMEGAKI K, YAMADA K, ISHIMI Y (2003): Puerariae radix prevents bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab* 21, Nr. 5, 268 – 275
- (Watanabe et al. 1998) = WATANABE S, YAMAGUCHI M, SOBUE T, TAKAHASHI T, MIURA T, ARAI Y, MAZUR W, WÄHÄLÄ K, ADLERCREUTZ H (1998): Pharmacokinetics of Soybean Isoflavones in Plasma, Urine and Feces of Men after Ingestion of 60 g Baked Soybean Powder (Kinako). *J Nutr* 128, Nr. 10, 1710 – 1715
- (Weaver und Legette 2010) = WEAVER C M, LEGETTE L L (2010): Equol, via Dietary Sources or Intestinal Production, May Ameliorate Estrogen Deficiency-Induced Bone Loss. *J Nutr* 140, Nr. 7, 1377S – 1379S
- (Wolff 1986) = WOLFF J: *The Law of Bone-Remodeling*. Springer Verlag, Berlin 1986, 1 – 126
- (Woo et al. 2004) = WOO J, NAKAGAWA H, NOTOYA M, YONEZAWA T, UDAGAWA N, IS, OHNISHI M, HAGIWARA H, NAGAI K (2004): Quercetin suppresses bone resorption by inhibiting the differentiation and activation of osteoclasts.. *Biol Pharm Bull* 27, Nr. 4, 504 – 509

- (van der Woude et al. 2005) = WOUDE H van der, VELD M G R ter, JACOBS N, SAAG P T van der, MURK A J, RIETJENS I M C M (2005): The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor. *Mol Nutr Food Res* 49, Nr. 8, 763 – 771
- (Wronski et al. 1987) = WRONSKI J, SCHENK P A, CINTRON M, WALSH C C (1987): Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 40, Nr. 3, 155 – 159
- (Wronski et al. 1988) = WRONSKI T J, CINTRON M, DANN L M (1988): Temporal Relationship between Bone Loss and Increased Bone Turnover in Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int* 43, Nr. 3, 179 – 183
- (Wronski et al. 1989) = WRONSKI T J, DANN L M, SCOTT K S, CINTRÓN M (1989): Long-Term Effects of Ovariectomy and Aging on the Rat Skeleton. *Calcif Tissue Int* 45, Nr. 6, 360 – 366
- (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, Nr. 5, 866 – 874
- (Yamaguchi 2006) = YAMAGUCHI M (2006): Regulatory Mechanism of Food Factors in Bone Metabolism and Prevention of Osteoporosis. *Yakugaku Zasshi* 126, Nr. 11, 1117 – 1137
- (Yarnell und Abascal 2003) = YARNELL E, ABASCAL K (2003): Herbal Medicine for Treating Menopausal Symptoms. *J Altern Complement Med* 9, Nr. 6, 299 – 306
- (Zang et al. 2005) = ZANG H M, CHEN J C, LIU Y H, WANG K Z (2005): Experimental study of the effects of puerarin on biological characters of osteoblasts in vitro. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 30, Nr. 24, 1947 – 1949
- (Zhang Ya et al. 2001) = ZHANG Ya, WANG G-J, SONG T T, MURPHY P A, HENDRICH S (2001): Urinary Disposition of the Soybean Isoflavones Daidzein, Genistein and Glycitein Differs among Humans with Moderate Fecal Isoflavone Degradation Activity. *J Nutr* 131, Nr. 1, 147 – 148
- (Zhang Yu et al. 2007) = ZHANG Yu, ZENG X, ZHANG L, ZHENG X (2007): Stimulatory Effect of Puerarin on Bone Formation through Activation of PI3K/Akt Pathway in Rat Calvaria Osteoblasts. *Planta Med* 73, Nr. 4, 341 – 347

(Zhang Y-B et al. 2010) = ZHANG Y-B, YANG ZHANG L-N L, ZHAO X-Y, NA X-L
(2010): Soy isoflavone and its effect to regulate hypothalamus and peripheral orexigenic gene expression in ovariectomized rats fed on a high-fat diet. *Biomed Environ Sci* 23, Nr. 1, 68 – 75

(Zhuo et al. 2006) = ZHUO X-G, MELBY M K, WATANABE S: Soy Isoflavones and Health. In: *Phytoestrogens in Functional Foods*; YILDIZ F. Taylor & Francis Group, Boca Raton 2006, Kap. 9, 243 – 262

Lebenslauf

Am 07. März 1977 wurde ich - Susanne Moysich - in Mühlhausen/ Thüringen geboren. Mein Vater, Herbert Moysich, war als Ingenieur beruflich an der Entwicklung von Taschenrechnern und Kleincomputern beteiligt. Meine Mutter, Frau Lieselotte Moysich (geb. Gräf), arbeitete als Finanzkauffrau.

Von 1984 bis 1991 besuchte ich die Grund- und Oberschule in Mühlhausen und wechselte mit dem 8. Schuljahr auf das Albert-Schweitzer-Gymnasium meiner Heimatstadt, wo ich das Abitur im Jahre 1996 abschloss. Vom August 1996 bis Juli 1999 absolvierte ich im Landratsamt Unstrut-Hainich eine Ausbildung zur Fachangestellten für Bürokommunikation. Nach erfolgreich abgeschlossener Ausbildung arbeitete ich als Sachbearbeiterin im Fahrerlaubniswesen der o. g. Behörde.

Zum Sommersemester 2001 begann ich mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Das Studium beinhaltete während des Praktischen Jahres zwei Ausbildungssequenzen in der Chirurgischen Klinik des Triemli-Spitals in Zürich und in der Inneren Medizin des Schweizer Paraplegiker Zentrums Nottwil.

Im Juni 2008 schloß ich das Hochschulstudium mit der Note "Gut" ab und trat meine erste Assistenzarztstelle in der Inneren Medizin des Schweizer Paraplegiker Zentrums Nottwil an. Von der multi-modalen Versorgung der dortigen Patienten sehr beeindruckt, entschied ich mich für eine weitere Facharztausbildung zur späteren Neuro-Urologin.

Im April 2010 setzte ich daher meine weitere Ausbildung in der Urologie des Südharzkrankenhauses Nordhausen fort. Im Juni 2011 hatte ich schließlich die Gelegenheit, eine Anstellung in der größten neuro-urologischen Klinik Deutschlands zu erhalten und bin seither als Assistenzärztin in der Neuro-Urologie der Werner-Wicker-Klinik Bad Wildungen tätig.

Mein Ziel ist es, den Facharztstitel für Urologie zu erwerben, um später an der spezialisierten Versorgung querschnittgelähmter Menschen oder Menschen mit neuro-degenerativen Erkrankungen mitzuwirken.

Die vorliegende Doktorarbeit wurde von mir in der Abteilung Klinische und Experimentelle Endokrinologie der Universitätsfrauenklinik Göttingen angefertigt. Die Betreuung erfolgte durch Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Doktorarbeit unter seiner wissenschaftlichen und fachlichen Betreuung anfertigen zu dürfen. Ich danke Herrn Prof. W. Wuttke auch für seine Hinweise und Beratungen, durch welche ich die grundsätzliche Herangehensweise an wissenschaftliche Fragestellungen erlernen durfte und welche mir auch während meiner aktuellen Facharztausbildung von großem Nutzen ist.

Ich bedanke mich bei Frau MUDr. Dr. med. Dana Seidlova-Wuttke für ihre Unterstützung während der Versuchs-Durchführung sowie bei der Konzept-Erstellung dieser Arbeit. Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Klinische und Experimentelle Endokrinologie der Frauenklinik für die angenehme Zusammenarbeit.