Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Prof. Dr. Dr. H. Schliephake)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Wirkung von Dihydrotestosteron, 17-ß-Östrogen, Genistein und Equol auf das Remodelling der defekten osteoporotischen Tibia der männlichen Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde der medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Dr. Philipp Kauffmann
aus
Hünfeld

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. K.G. Wiese

2. Berichterstatter: PD Dr. M. Tezval

3. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:10.12.2013

Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AR (-Rezeptor)	Androgenrezeptor
BMD	Knochendichte: *bone mineral density*
bzw.	beziehungsweise
C	Kompaktheit
ca.	circa
C.I. of Mean	Konfidenzinterval
CSF	koloniestimulierender Faktor
DEXA	Dual-Energy-X-Ray-Absorptiometrie
DHT	5α-Dihydrotestosteron
E2	17β-Östradiol
EQ	Equol
ER (-Rezeptor)	Östrogenrezeptor
ERα (-Rezeptor)	Östrogenrezeptor α
ERβ (-Rezeptor)	Östrogenrezeptor β
et al.	et alii
EZM	Extrazellulärmatrix
FAS	TNF receptor superfamily, member 6
FASL	FAS Ligand
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GEN	Genistein
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
IGF	Insulin-like growth factors
KG	Körpergewicht
LH	luteinisierendes Hormon
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
µm	Mikrometer
n	Anzahl bzw. Stichprobenumfang
N	Anzahl der Flächen
OPG	Osteoprotegerin

p	Signifikanzniveau
PC	Personal Computer
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGE2	Prostagladin E2
PVC	Polyvinylchlorid
RANKL	Receptor Activator of NFkB Ligand
RANK	Receptor Activator of NF-κB
Runx2	Runt-related transcription factor
S.D.-Ratte	Sprague-Dawley-Ratte
SERM	selektiver Östrogenrezeptormodulator
SF	sojafrei
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
TGF	Transforming Growth Factor
tiff.	tagged image file format
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U	Umfang
vgl.	vergleiche
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Inhalt

1. Einleitung 1
2. Grundlagen 3
2.1 Knochen 3
2.2 Osteoporose 7
3. Material und Methoden 11
3.1 Versuchsaufbau und Versuchsablauf 11
3.2 Tierfutter 13
3.3 Schliffpräparate und Goldner- Färbung 13
3.4 Digitalisierung der Schliffpräparate sowie Imageanalyse 13
3.5 Statistik 17
4. Ergebnisse 18
4.1 Gewichtsentwicklung 18
4.2 Effekte der Hormonsubstitution auf die Kortikalisdicke 19
4.3 Effekte auf die Spongiosa 21
4.3.1 Effekt auf die relative Spongiosafläche 21
4.3.2 Effekt auf die Trabekelanzahl pro Fläche 21
4.3.3 Effekt auf die Fläche der Trabekel 22
4.3.4 Effekte auf die trabekuläre Achsenlänge 23
4.3.5 Effekt auf die trabekuläre Kompaktheit 25
4.4 Effekte auf die Epiphyse 26
5. Diskussion 27
5.1 Methodik 27
5.1.1 Tiermodell Ratte 27
5.2 Ergebnisse 28
5.2.1 Gewichtsentwicklung 28
5.2.2 Wirkung der Sexualhormone 28
5.2.3 Wirkung der Phytohormone 31
5.2.4 Effekte der Hormonsubstitution 33
6. Zusammenfassung 40
7. Anhang 42
7.1 Ergebnistabellen 42
7.2 Tabellenverzeichnis 47
7.3 Abbildungsverzeichnis 47
8. Literaturverzeichnis 48

1. Einleitung

Die Osteoporose ist in den letzten Jahrzehnten immer mehr in den Fokus der Mediziner gerückt. Noch vor wenigen Jahrzehnten wurde sie als physiologisches, unabwendbares Phänomen des Alterns angesehen. Mittlerweile hat sich mit dem Fachgebiet der Osteologie eine fächerübergreifende Expertengruppe gebildet. Nicht zuletzt aufgrund der Häufigkeit und ökonomischen Auswirkungen widmet sich die Osteologie der Prävention, Diagnostik und Therapie von Osteoporose (PFEILSTIFTER 2008). 7,8 Millionen Deutsche sind von Osteoporose betroffen (HAUSSLER et al. 2007). 1% aller 50-80jährigen Frauen erleidet eine osteoporotisch bedingte, radiologisch nachweisbare Sinterungsfraktur. Bei Männern dieser Altersgruppe sind es 0,6%. Die Häufigkeit peripherer Frakturereignisse bei Frauen dieser Altersgruppe liegt bei 1,9% und bei Männern bei 0,9%. Die Osteoporose ist hiermit eine der zehn häufigsten und, durch Frakturen bedingt, teuersten Erkrankungen des Menschen weltweit (SEEMAN 2001). Eine adäquate Prävention, Diagnostik und Therapie zur Behandlung bzw. Verhinderung der weitreichenden Folgen von Osteoporose ist daher in jeder Hinsicht absolut notwendig (PFEILSTIFTER 2008).

Epidemiologische Studien belegen, dass die Osteoporose in der asiatischen Bevölkerung, verglichen mit der europäischen, seltener auftritt. Ein Erklärungsversuch dieses Phänomens stellen die Phytoöstrogene im Sojaprotein dar (COXAM 2008). Diese werden aktuell daher als mögliche alternative Therapieoption in der Osteoporosetherapie diskutiert. Man erhofft sich aufgrund ihrer pflanzlichen Herkunft ein günstiges Nebenwirkungsprofil und eine gute Verträglichkeit. Somit würden Phytoöstrogene aus Sojaprotein als Therapeutikum verwendet werden.

In den vergangenen Jahrzehnten lag der Forschungsschwerpunkt auf der Untersuchung der weiblichen Osteoporose. Die weibliche Osteoporose manifestiert sich durch den postmenopausalen Östrogenmangel häufiger. Der männliche Anteil betroffener Osteoporosepatienten liegt bei 1/5. Die durch Osteoporose bedingten Frakturen führen bei Männern zu höherer Morbidität und Mortalität als bei Frauen (LAMBERT et al. 2011). Die geschlechtsspezifischen Unterschiede im Knochenstoffwechsel erfordern hier erhöhtes Engagement zur Erforschung der männlichen Osteoporose. Die Pathomechanismen bezüglich Ätiologie und Pathophysiologie werden noch nicht in gleicherweise verstanden wie bei der Frau.

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung der Sexualhormone Dihydrotestosteron und 17-ß-Östradiol sowie der Phytoöstrogene Genistein und Equol auf das Remodelling des

männlichen osteoporotischen im Heilungsprozess befindlichen Knochen zu untersuchen. Insbesondere sollte dabei untersucht werden, wie sich die jeweiligen Hormone in ihrer Wirkung auf die unterschiedlichen knöchernen Strukturen unterschieden. Außerdem sollte untersucht werden, wie sich die Hormontherapie auf den spongiösen und kortikalen Knochen auswirkt und ob Rückschlüsse auf den Heilungsverlauf und dessen Beeinflussung getroffen werden können.

2. Grundlagen

2.1 Knochen

Knochen bilden zusammen mit Muskeln und Gelenken den Bewegungsapparat, schützen innere Organe, beherbergen das blutbildende Knochenmark und dienen als Speicher von Ionen wie Kalzium und Phosphat (GRATZEL 2002).

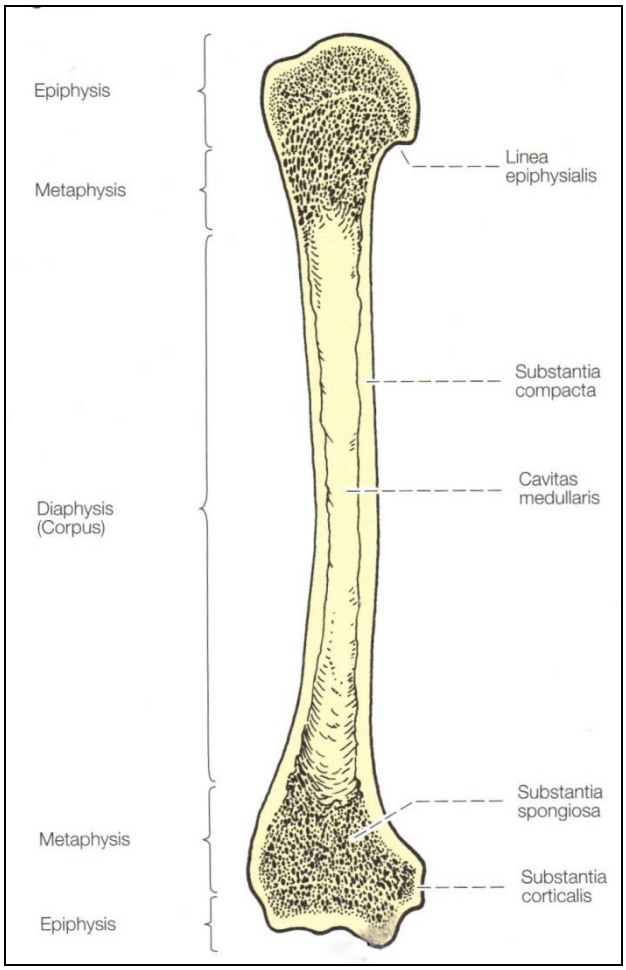

Abbildung 1: Aufbau eines Röhrenknochens (DRENCKHAHN und KUGLER 2003, (S. 134)).

An den langen Röhrenknochen werden Diaphyse, Metaphyse und Epiphyse unterschieden. Zwischen Metaphyse und Epiphyse liegt die Epiphysenfuge (siehe Abbildung 1). Sie verknöchert nach Abschluss der Pubertät zur Linea epiphysialis. Epiphysen und Metaphysen bestehen hauptsächlich aus Substantia spongiosa, die von einer dünnen Kompakta (Substantia corticalis) umgeben ist. Die Diaphyse hingegen besteht hauptsächlich aus Substantia compacta. Die äußere Oberfläche des Knochens wird von der Knochenhaut, dem Periost, bedeckt. An Gelenkflächen, Ansatzstellen für Muskel, Sehnen und Bändern sowie Knochenabschnitte, die von der Synovialmembran

überzogen sind, fehlt sie. Das Endost kann als innere Hüllstruktur des Markraums angesehen werden (DRENCKHAHN und KUGLER 2003).

Das Knochengewebe des Erwachsenen besteht hauptsächlich aus Lamellenknochen, der in den Organisationsformen Spongiosa und Kompakta vorkommt.
Die Spongiosatrabekel sind platte bzw. säulenförmige verzweigte Strukturen, die als Gitterwerk entlang der im Knochen herrschenden Zug- und Druckspannungen verlaufen (trajektorielle Spongiosa-Architektur). Die Trabekel sind und werden aus halbmondförmigen Lamellenpaketen aufgebaut. Osteone fehlen weitgehend. Die Oberfläche ist mit Endost bedeckt. Die Kompakta ist auf die Außenschicht des Knochens beschränkt (Substantia corticalis, s.o.). Die Räume zwischen den Trabekeln der Spongiosa und die Markräume in den Diaphysen enthalten das Knochenmark. Dieses wird in das rote und gelbe Knochenmark unterteilt.
In der Kompakta des Erwachsenen bilden Kollagenfibrillen dicke Lamellen, die konzentrisch in Schichten um einen zentralen Kanal angeordnet sind, dem sogenannten Havers-Kanal. Die Einheit aus Lamellen und Havers-Kanal wird als Havers-System bzw. Osteon bezeichnet. Osteone stellen also die Baueinheit des Lamellenknochens und somit der Kompakta dar. Kanäle, die die longitudinal durch die Kompakta verlaufenden Havers-Kanäle untereinander verbinden und transversal durch die Kompakta laufen, werden als Volkmannsche Kanäle bezeichnet. Ein Osteon wird durchschnittlich aus 30 einen Havers-Kanal konzentrisch umgebenden Knochenlamellen (Speziallamellen) gebildet. Die Kollagenfibrillen in den Osteon-Lamellen verlaufen in Schraubentouren, deren Drehrichtung von einer zur anderen Lamelle wechselt. Die Räume zwischen den Osteonen sind mit Schaltlamellen gefüllt, die übrig gebliebene Lamellen eines Havers-Systems darstellen, das im Zuge von Umbauprozessen abgebaut worden ist. Im äußeren Bereich der Kompakta sind die Lamellen nicht in Osteonen organsiert, sondern umfassen in Form einer Generallamelle die ganze Zirkumferenz. Eine innere Generallamelle begrenzt die Kompakta nach innen (DRENCKHAHN und KUGLER 2003, GRATZEL 2002).
Geflechtknochen fehlt im adulten Skelett weitestgehend, kommt jedoch während der Knochenentwicklung und Knochenbruchheilung in bestimmten Phasen dominierend vor (DRENCKHAHN und KUGLER 2003, GRATZEL 2002).
Das Knochengewebe besteht histologisch aus mineralisierter Extrazellulärmatrix (EZM) und verschiedenen Zelltypen. Die EZM besteht aus anorganischen Hydroxylapatit-

Kristallen sowie aus organischen Kollagenfibrillen (Kollagen Typ I). Kalzium und Phosphat bilden den Hauptbestandteil der Hydroxylapatit-Kristalle. Das Kollagen Typ I bildet typische Fibrillen mit einem hoch geordneten Verlaufsmuster. Die spezielle Zusammensetzung und Architektur des Knochens verleiht ihm eine besonders hohe Druck und Zugfestigkeit.

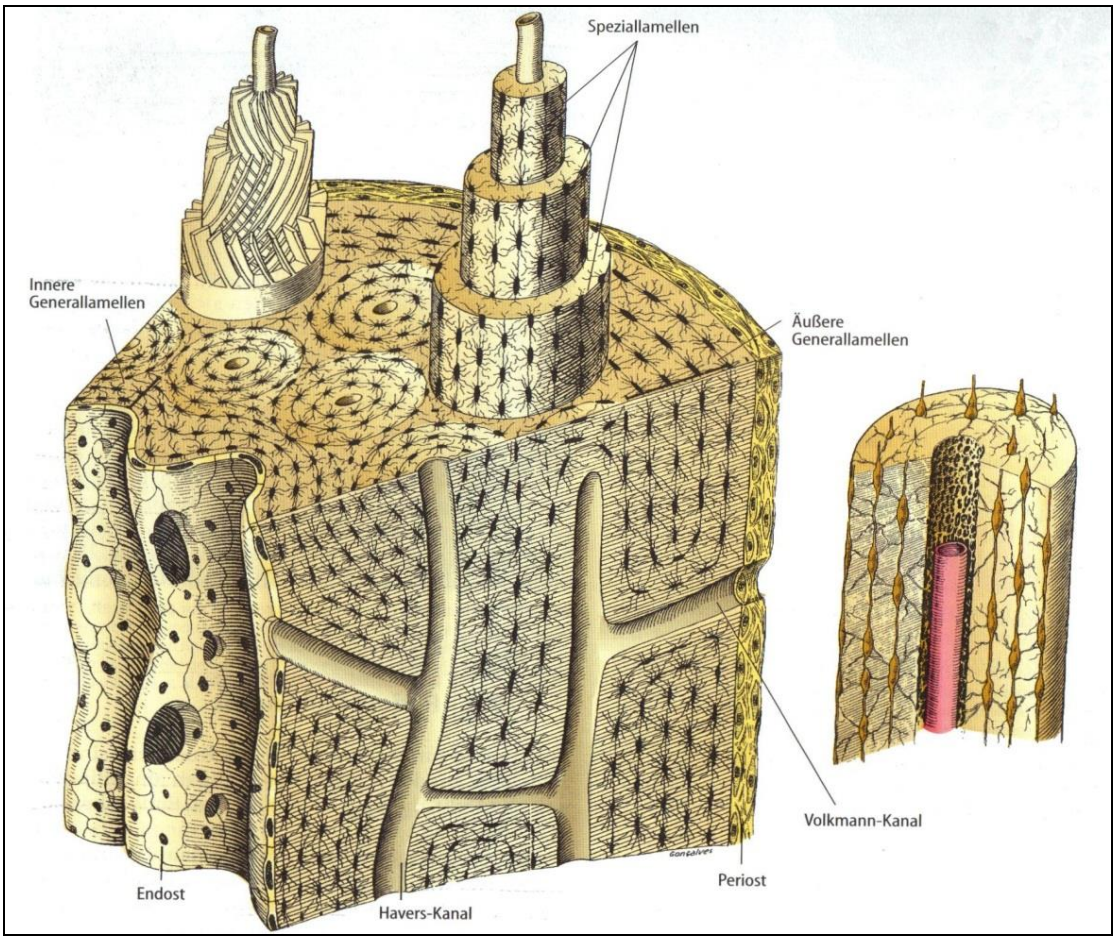

Abbildung 2: *Ausschnitt der Substantia compacta eines Röhrenknochens (GRATZEL 2002,(S. 96)).*

Der Knochen unterliegt einem ständigem Auf- und Abbauprozess. Die spezifischen Zellen des Knochens sind Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Osteoblasten leiten sich von mesenchymalen Vorläuferzellen (Osteoprogenitorzellen) ab. Sie sitzen palisadenartig der mineralisierten Matrix auf, von der sie durch eine Schicht nicht mineralisierter Kollagenfibrillen getrennt sind. Die Osteoblasten sezernieren die organische Matrix (Osteoid), in die vor allem Hydroxylapatit eingelagert wird. Osteoblasten werden zu Osteozyten, wenn sie sich durch die Prozesse der Mineralisation infolge der Lamellenbildung einmauern. Des Weiteren werden von Osteoblasten Zytokine gebildet, u.a. Interleukine (IL-1, -6, -1), Plättchenwachstumsfaktor, (PDGF),

TNF-α, TGF-β, CSF-I, IGF-I,-II, PGE2, Osteoprotegerin (OPG) und einen membranständigen Osteoklastenliganden (Osteoprotegerin Ligand bzw. RANKL). Diese Zytokine dienen unter anderem der Aktivierung bzw. Differenzierung der Osteoklasten. Die Bindung von Progenitorzellen der Osteoklasten an Osteoblasten wird durch Cadherin 6 vermittelt und erfolgt über Osteoprotegerin-Ligand und Osteoprotegerin-Rezeptor (siehe Abbildung 3) (DRENCKHAHN und KUGLER 2003, EGHBALI-FATOURECHI et al. 2003).

Osteozyten sind weitgehend inaktive Osteoblasten, die in verkalkte Knochensubstanz eingemauert sind und dort in Höhlungen (Osteozyten-Lakunen) liegen. Über dünne Kanälchen sind die Knochenzellen über Zellausläufer und Gap junctions miteinander verbunden (DRENCKHAHN und KUGLER 2003).

Osteoklasten sind 50-100µm große mehrkernige Riesenzellen, die zum monozytären Phagozytensystem (MPS) gehören. Sie dienen dem Knochenabbau. Der aktive Osteoklast liegt der mineralisierten Matrix direkt an. Die Kalziumverbindungen werden durch die von den Osteoklasten sezernierte Säure (H+ATPase) aufgelöst. Die sezernierten lysosomalen Enzyme, u.a. Cathepsin K, führen zur Zerlegung der organischen Matrix in Fragmente, die von den Osteoklasten rezeptorvermittelt durch Endozytose aufgenommen werden. Die Osteoklastenaktivität wird durch Osteoblasten gesteuert. Osteoblasten bilden das RANKL-Protein (RANK-Liganden) das am RANK-Rezeptor von Vorläuferzellen der Osteoklasten und an reifen Osteoklasten andockt. Dadurch werden Osteoklasten aktiviert. Osteoklasten bauen Knochen ab. Osteoblasten bilden auch das Osteoprotegerin (OPG), das RANKL bindet und als decoy-Rezeptor dient. Wenn das RANKL nicht mehr an RANK bindet, können keine weiteren Osteoklasten aktiviert werden. Ein erhöhter Parathormonspiegel bzw. ein Vitamin D3-Mangel stimulieren die Synthese des RANKL-Proteins der Osteoblasten (PIETSCHMANN et al. 2004), wohingegen Östrogen die Synthese inhibiert und so die Knochenresorption verhindert (FRENKEL et al. 2010). Mesenchymale Zellen produzieren außerdem den FAS- Liganden (FASL), welcher über einen proapoptotischen FAS-Rezeptor der Osteoklasten bindet und den programmierten Zelltod auslöst. Östrogen stimuliert die Expression von FASL, der zur schnelleren Apoptose der Osteoklasten führt (KRUM et al. 2008). Die Osteoklastenanzahl nimmt ab und mit ihr die Knochenresorption. Das Hormon Calcitonin hemmt die Osteoklasten über osteoklastäre Calcitoninrezeptoren, was im Resultat zu einer Lösung des Osteoklasten vom Knochen und von seiner Resorptionszone führt.

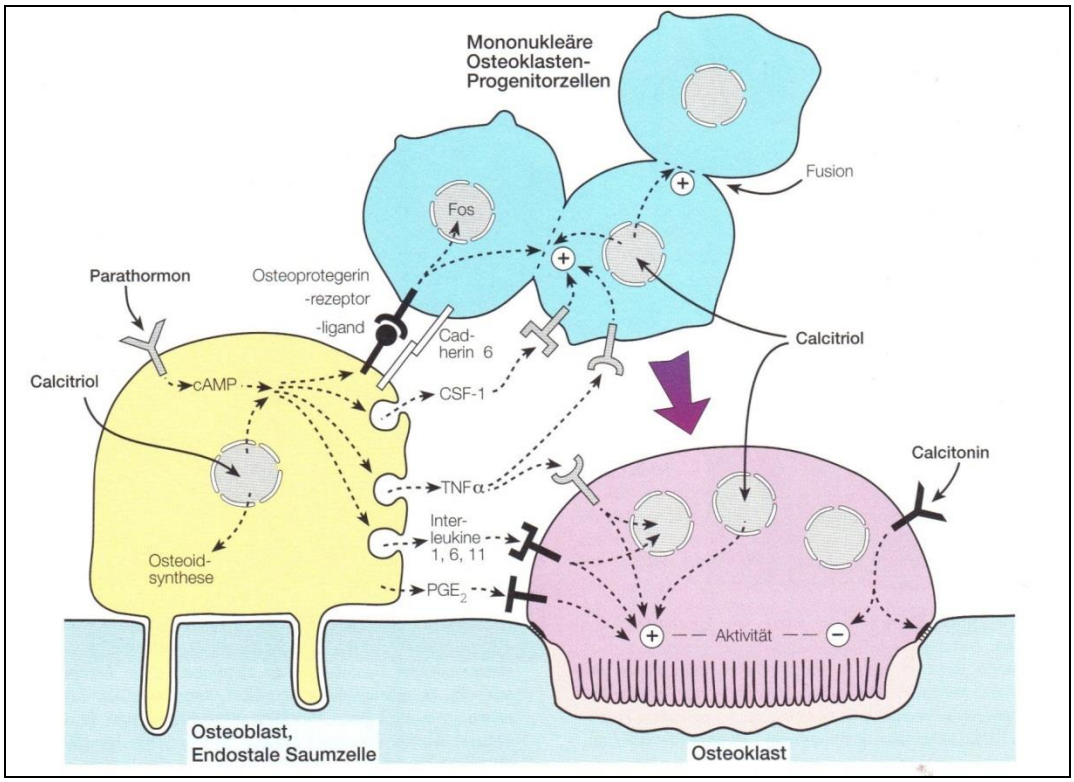

Abbildung 3: *Interaktion zwischen Osteoblast und Osteoklast (DRENCKHAHN und KUGLER 2003,(S. 142)).*

Runx2 (Runt-related transcription factor 2) wird ebenfalls von Osteoblasten synthetisiert. Er ist der Hauptregulator der Osteoblastendifferenzierung und somit des Knochenaufbaus (BANIWAL et al. 2011, DUCY et al. 1997). Darüber hinaus wird durch Runx2 auch die Osteoklastogenese und somit auch die Knochenresorption gefördert. Die Wirkung ist von der Aktivität des Runx2 abhängig. Hieraus wird ersichtlich, dass es für eine ausgewogene Balance zwischen Knochenaufbau und Abbau einer strengen Regulation der Runx2 Aktivität bedarf (BANIWAL et al. 2011, GEOFFROY et al. 2002). Eine Dysbalance in diesem Gleichgewicht führt zu pathologischen Veränderungen der Knochenmasse, -struktur und –funktion, die sich beim Menschen am häufigsten in Form der Osteoporose manifestieren kann.

2.2 Osteoporose

Die Osteoporose ist als systemische Skeletterkrankung definiert, die durch unzureichende Knochenfestigkeit mit einem erhöhten Frakturrisiko charakterisiert ist (PFEILSTIFTER 2008). Die WHO hat die Osteoporose aus praktischen Gründen über die Knochendichte definiert (BMD: *bone mineral density*). Die Methode der Wahl zur Knochendichtemessung und zur Diagnose einer Osteoporose ist die Osteodensometrie

mit dem am weitesten verbreiteten Verfahren der Dual-Energy-X-Ray-Absorptiometrie (DEXA). Hier werden gleichzeitig zwei Röntgenquellen mit unterschiedlichen Wellenlängen eingesetzt und dadurch ermöglicht, die Abschwächung verschiedener Materialien genauer zu unterscheiden. Die dreidimensionale Geometrie des Messobjektes wird nicht erfasst und auch keine Dichtewerte im physikalischen Sinne, sondern eine flächenprojektierte Masse (SI-Einheit: kg/m^2, auch als Flächendichte bezeichnet) (BLAKE und FOGELMAN 2007). Darüber hinaus gibt es noch eine Menge anderer Verfahren der Osteodensometrie, die miteinander nicht vergleichbar sind. Daher wird das Ergebnis in Form eines T-Wertes (T-Score) wiedergegeben. Hierbei handelt es sich um eine dimensionslose statistische Größe, die die Abweichung vom Mittelwerte der Knochendichte (BMD) eines gesunden 30jährigen Referenzkollektivs angibt. Liegt der Messwert, der durch die Osteodensometrie ermittelt wurde, mindestens 2,5 Standardabweichungen unter dem Durchschnitt der geschlechtsgleichen 30jährigen Gesunden, so handelt es sich um eine Osteoporose (WHO 1994). Die Osteodensometrie korreliert mit dem Frakturrisiko als Komplikation der Osteoporose (CUMMINGS et al. 2006).

Bei der Osteoporose werden die primäre Osteoporose und die sekundäre Osteoporose unterschieden.

Zur primären Osteoporose wird die postmenopausale, senile, sowie die selten auftretende idiopathische Form gezählt. Ursächlich für den Knochenverlust nach der Menopause ist der einsetzende Östrogenmangel. Hierbei kommt es überwiegend zum Abbau des spongiösen und weniger des kortikalen Knochen (SEEMAN 2003).

Die senile Osteoporose kommt bei Frauen und Männern im Verhältnis 2:1 ab dem 60. Lebensjahr vor. Hier wird die altersbedingte Reduktion der Sexualhormone Östrogen und Testosteron als Ursache betrachtet (EBELING 1998). Es kommt zu einem Verlust der spongiösen und kortikalen Knochenanteile (SEEMAN 2003).

Bei einer sekundären Osteoporose liegt die Ursache in einer Erkrankung. Hier seien exemplarisch die endokrinen Störungen Hypogonadismus und Hyperkortisolismus erwähnt, die eine Osteoporose bedingen können (OLSZYNSKI et al. 2004). Bei der Diagnosesicherung einer primären Osteoporose müssen die sekundären Formen stets laborchemisch ausgeschlossen werden.

In dieser Arbeit wird die altersbedingte Osteoporose des Mannes betrachtet. Die Folgen einer Osteoporose sind als klinische Manifestation Frakturen, die es aus gesundheitlicher und ökonomischer Sicht zu verhindern gilt. Bei beiden Geschlechtern kommt es ab dem

75. Lebensjahr zu einem rasanten Anstieg der Frakturhäufigkeit. Insbesondere sind hier die Wirbelkörper, der Femur, der Radius und die Ulna betroffen (EBELING 1998, FELDSTEIN et al. 2005). Die größte Bedeutung haben bei Männern die hüftgelenksnahen Frakturen, die 30% des männlichen Geschlechtes betreffen (JOHNELL und KANIS 2006). Die 1-Jahres-Mortalitätsrate liegt bei Männern bei 31-35% und bei Frauen bei 17-22% (FORSEN et al. 1999).

Aufgrund der höheren Morbiditäts- und Mortalitätsrate nach Osteoporose assoziierter Fraktur bei Männern (BLIUC et al. 2009), sollte auf eine frühzeitige Prävention, Diagnostik und Therapie der Osteoporose hingewirkt werden.

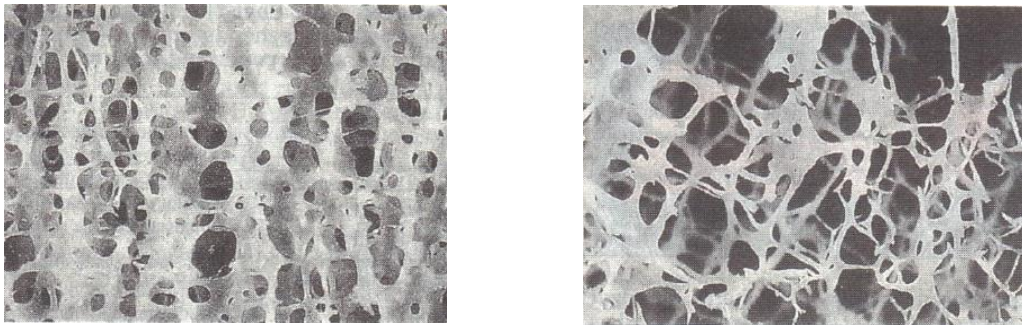

Abbildung 4: *Darstellung der Spongiosa eines gesunden Patienten (links) und eines Patienten mit Osteoporose (rechts) (PSCHYREMBEL 2002, (S.1228)).*

Die Therapie der primären Osteoporose setzt sich aus Basistherapie, spezieller medikamentöser Therapie und Schmerztherapie zusammen. Zur Basistherapie gehört die Umsetzung von Empfehlungen zur Osteoporose und Frakturprophylaxe wie z.B. Förderung der Muskelkraft und Koordination, Senkung des Sturzrisikos sowie Substitution von Vitamin D_3 und Calcium. Die spezielle medikamentöse Therapie wird in Abhängigkeit der Knochendichte, dem Geschlecht, dem Lebensalter sowie weiteren Faktoren eingesetzt. Hier wird auf die Medikamentengruppen der Bisphosphonate, der selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERM), Strontiumranelat und Parathormon zurückgegriffen (DVO-LEITLINIEN 2009). Östrogene stellen zwar eine sehr effektive Therapie der Osteoporose dar, jedoch führen die karzinogene Wirkung auf die Mamma, Ovarien und das Endometrium sowie das gehäufte Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen, etwa venöse Thromboembolien und Schlaganfälle, zu kontroversen Diskussionen dieser Therapiestrategie (CAUFRIEZ 2007). Bei Männern wird aufgrund der zu erwartenden Nebenwirkungen wie Feminisierung und Gynäkomastie eine Monotherapie nicht durchgeführt (STUERMER et al. 2009). Der Einsatz von

Phytoöstrogenen wird aktuell als Therapieoption diskutiert. Sie ähneln in Ihrer Wirkweise den SERMs. Ihre Wirkung auf den in Defektheilung befindlichen Knochen soll im Fokus dieser Arbeit stehen.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau und Versuchsablauf

Für die Studie wurden 180 männliche Ratten der Gattung Sprague-Dawley (S.D.-Ratten, Fa. Winkelmann, Borchen) verwendet. Zum Startzeitpunkt waren sie drei Monate alt und wogen im Mittel 380g. Im Studienzeitraum befanden sich vier Tiere in je einem Käfig (Makrolonkäfig Typ IV, Fa. Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißberg). Zur Käfigausstattung gehörten eine Trinkwasserversorgung mit Frischwasser und eine Futterschale, zu der jederzeit Zugang bestand. Die durchschnittliche Raumtemperatur lag bei 23°C und die Luftfeuchtigkeit bei 55%. Die Raumbeleuchtung erfolgte in einem 12h-Zyklus, in dem der Raum von 6-18 Uhr beleuchtet war. Die Versorgung und Reinigung der Käfige wurde durch Tierpfleger übernommen. Der Tierversuch fand in Tierställen der Universitätsmedizin Göttingen unter Aufsicht von Prof. Dr. Dr. K. G. Wiese und PD Dr. D. Seidlová-Wuttke statt. Eine Genehmigung der Bezirksregierung Braunschweig lag vor (Aktenzeichen G 43.08). Nachdem sich die Tiere drei Wochen unter gleichen Bedingungen eingewöhnt hatten, erfolgte die Orchiektomie zum Einleiten der Osteoporose. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde sojafreies Futter verwendet.

Der Eingriff der Orchiektomie erfolgte unter Vollnarkose. Hierfür erhielten die Tiere eine CO_2-Inhalationsnarkose sowie eine intraperitoneale Injektion von Xylozin (Rompun®, Fa. Bayer, Leverkusen) und Ketamin (Hostaket®, Fa. Hoechst, Bad Soden) im Verhältnis 4:5. Es wurden 10mg/kg KG Xylozin sowie 45mg/kg KG Ketamin verabreicht. Zum Schutz der Augen vor Austrocknung wurde ein Feuchtigkeitsgel (Thilo-Tears®, Fa. Alcon) verwendet. Nach Lagerung und Abwaschen erfolgte die sterile Abdeckung des Operationsfeldes. Durch Palpation der Bauchhöhle wurden die Hoden aufgesucht. Nun erfolgte die Schnittsetzung im Bereich der medialen Skrotalhaut mit anschließender Durchtrennung des viszeralen Peritoneums zur operativen Freilegung des Hodens. Der Ductus epididymidis mit seiner Gefäßversorgung wurde mit Vicryl-Fäden ligiert und anschließend der Hoden entfernt. Auf der kontralateralen Seite identisches Vorgehen. Der Wundverschluss beendete den operativen Eingriff. Zur Identifizierung wurde den Tieren ein Transponder in das subkutane Fettgewebe des Nackens implantiert, um eine Identifizierung mittels eines tragbaren Transponderlesegerätes jederzeit zu gewährleisten. Es wurde das Transponder-UNO Micro-ID-System mit ISO-Transponder der Länge 12mm verwendet (Gesreder II Ge S008: ISO- kompatibler Taschenleser). Jedem Tier

wurde so eine Identifikationsnummer zugewiesen, unter der alle erhobenen Daten festgehalten wurden. Die Narkoseausleitung wurde mit einer intraperitonealen Injektion von 0,3-0,5 ml einer 10%igen Antipamezolhydrochlorid-Lösung in NaCl durchgeführt (Antisedan®, Fa. Pfizer, Freiburg). Postoperativ erhielten die Tiere zur Dehydratationsprophylaxe 5ml einer isotonen NaCl Lösung (Fa. Braun, Melsungen) subkutan..

Vier Wochen nach Orchiektomie und manifester Osteoporose wurden die Tiere in fünf Gruppen zu je 36 Tieren eingeteilt. Jede der Gruppen bekam eine Testsubstanz verabreicht. Vier Gruppen bekamen als Verum jeweils Dihydrotestosteron (DHT), Östrogen (E2), Genistein (GEN) oder Equol (EQ) im Futter verabreicht. Die fünfte Gruppe (Kontrollgruppe) wurde weiter mit sojafreiem Futter ernährt. Bei der Futterumstellung erfolgte die Trepanation der Rattentibia, um als definiert gesetztes Trauma die Effekte auf die Defektheilung und das Remodelling des Knochens zu untersuchen. Hierfür wurden die Tiere erneut narkotisiert. Unter sterilen Bedingungen erfolgte nach operativer Freilegung der rechten Tibia 3mm unterhalb des Kniegelenks, mit Hilfe eines Knochenbohrers (Durchmesser 1,5mm) die Trepanation in der Kortikalis der Metaphyse.

46 Tage nach Futterumstellung und Trepanation wurde eine erste Obduktion an zwölf Tieren jeder Gruppe durchgeführt. Die Tiere wurden in Inhalationsnarkose getötet. Zur histologischen Untersuchung wurde die rechte trepanierte Rattentibia entnommen, präpariert und in Formalin fixiert. 53 und 102 Tage nach Futtertausch und Trepanation wurde eine zweite bzw. dritte Obduktion durchgeführt.

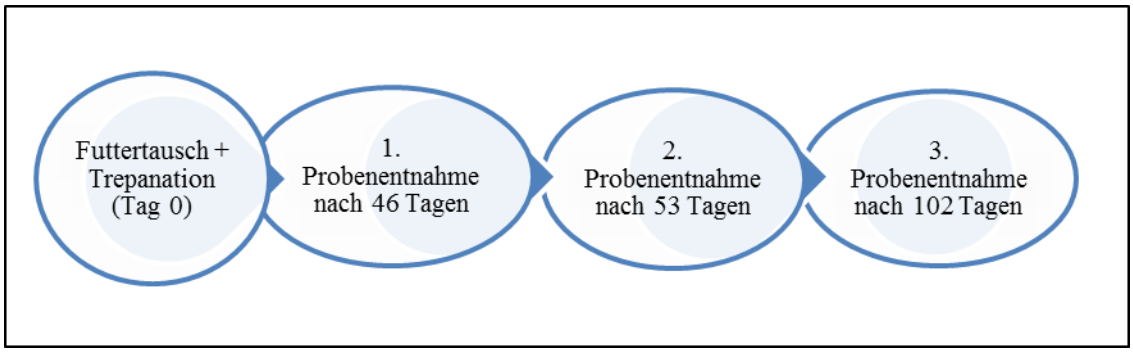

Abbildung 5: *Zeitlicher Ablauf vom Zeitpunkt der Futterumstellung und Trepanation bis zur dritten Probenentnahme. Der Zeitpunkt des Futtertausches stellt den medikamentösen Therapiebeginn.*

3.2 Tierfutter

Die Fütterung erfolgte bis zum Futtertausch mit soja- bzw. medikamentfreiem Futter (V1354, ssniff R-Z, Phytoestrogenarm, Fa. Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Die Kontrollgruppe wurde weiter mit medikamentfreiem Futter ernährt. Die anderen Gruppen erhielten Futter mit Dihydrotestosteron (1mg/kg KG), 17-ß-Östradiol (10mg/kg KG), Genistein (1g/kg KG) und Equol (400mg/kg KG) versetzt.

3.3 Schliffpräparate und Goldner- Färbung

Die operativ gewonnenen Rattentibiae wurden zunächst eine Woche in 4%iger Formalinlösung fixiert. Anschließend erfolgte die Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei Raumtemperatur. Nach der Entfettung mit Xylol wurden die Tibiae in Kunststoff eingebettet (Technovit 9100 neu, Hearus Kulzer, GmbH). Hierfür war es notwendig, die Präparate in einer Präinfiltrationslösung zu tränken, um eine gleichmäßige Durchsetzung von Methylacrylat zu gewährleisten. Zur Blockherstellung wurden die Präparate in spezielle Formen gelegt, die zu ¾ mit Methylacrylat gefüllt waren. Dann wurden sie bei 200 mbar für 10 Minuten im Exsikkator evakuiert. Im Vakuum unter 30°C kommt es zu einer Polymerisation des Kunststoffes. Hiernach wurden die Kunststoffblöcke in ihren Formen luftdicht verpackt und bei -8°C für 2 Tage aufbewahrt. Nach der kompletten Aushärtung wurden die Kunststoffblöcke mit einem Rotationstischmikrotom (Leica RM 2165, Leica Biosystems GmbH, Nussloch) in 7 µm dicke Präparate geschnitten. Hierbei wurden die eingebetteten Tibiae längs angeschnitten. Diese Schnitte wurden auf einen Objektträger gezogen, mit 96%igem Alkohol gestreckt, mit PVC-Folie abgedeckt und bei 50°C in einer Schnittpresse über Nacht getrocknet. Anschließend wurden die histologischen Präparate nach Goldner gefärbt. Hierfür wurden die Präparate initial für 3x30 min mit Xylol, 2x15 min mit 2-Methoxyethylacetat, 2x5 min mit Aceton und für 2x2 min mit Aqua dest. behandelt bzw. gespült.

3.4 Digitalisierung der Schliffpräparate sowie Imageanalyse

Zur Auswertung wurden mit einem Mikroskop und einer an diesem Mikroskop installierten, hochauflösenden Kamera (Axioskop 2 plus mit Axio Cam MRc5, Zeiss GmbH, Jena) digitale Bilder generiert. Es wurde jeweils eine Übersichtsaufnahme mit 1,25-facher Vergrößerung, sowie zwei Zielaufnahmen von der Spongiosa in 500µm Abstand zur Epiphysenfuge in 10-facher Vergrößerung angefertigt. Die Übertragung des Maßstabes in Form eines Maßstabbalkens sowie die Umwandlung in das Dateiformat tif erfolgte mit der Software von Zeiss (Axio Vision 4.8, Zeiss GmbH). Die so erstellten

Bilder im tiff-Format konnten nun in das Programm Sigma Scan Pro 5 (SPSS Inc., Chicago) zur weiteren histomorphometrischen Auswertung sowie Ausmessung geladen werden.

Nach Digitalisierung der Feinschliffe wurde mit dem Ausmessen der Kortikalisdicke bei 1,25-facher Vergrößerung begonnen. Alle Messungen, sowohl der Kortikalis als auch der Spongiosa, erfolgten mit dem Programm Sigma Scan Pro 5 (SPSS Inc., Chicago). Zur Identifizierung des Diaphysenbereichs wurde ein Abstand von 3750µm zur Epiphyse eingehalten. Es erfolgten zehn Dickenmessungen im diaphysären Bereich pro Seite. Ebenfalls zehn Messungen pro Seite im Bereich der Metaphyse, definitionsgemäß der Bereich innerhalb des Abstandes von 3750µm zur Epiphyse und letztendlich 20 Messungen im Bereich der Epiphysenfuge. Mit diesen Messungen erfolgte die Untersuchung des Einflusses der Medikamente auf die Kortikalisdicke der Diaphyse, Metaphyse sowie auf die Breite der Epiphysenfuge.

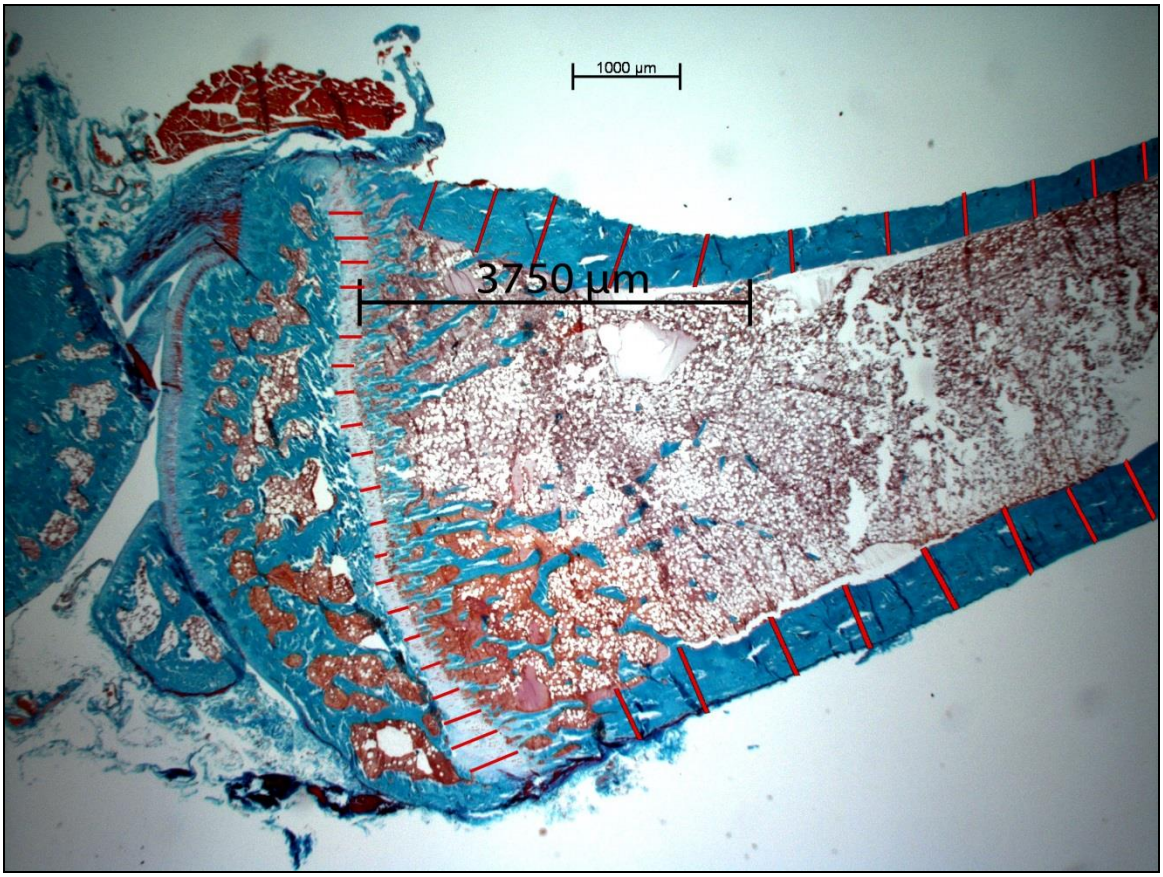

Abbildung 6: *Messungen im Bereich der Diaphyse, Metaphyse und Epiphyse mit der Software Sigma Scan Pro5. Darstellung der Tibia in 1,25-facher Vergrößerung im Längsschnitt. Die roten Linien markieren die Messdistanz und dienen zusammen mit dem Maßstab als Rechengrundlage zur Bestimmung der Kortikalisdicke bzw. der Epiphysenfugenbreite.*

Zur Beurteilung der Wirkung auf die Spongiosa wurden am tibialen Knochen der Ratte die relative Spongiosafläche, die Trabekelanzahl pro Fläche, der Feretdurchmesser mit maximaler und minimaler Achsenlänge und die Kompaktheit betrachtet. Zur Bestimmung der oben genannten Parameter wurde mit den Bildern in 10-facher Vergrößerung des metaphysären Bereiches immer in 500µm Abstand zur Epiphysenfuge gearbeitet. Die Software Sigma Scan Pro bietet hierfür die Funktion, über die durch die Goldner-Färbung grünlich hervorgehobenen Knochenanteile einen sogenannten Overlay (Farblayer) zu legen. Dieser dient als Rechengrundlage für das Programm. In unserem Falle wurde für das Overlay die Farbe Rot gewählt (siehe Abbildung 7).

Die Trabekelfläche wird durch das Programm Sigma Scan Pro nach Kalibrierung mit Hilfe des Vergrößerungsmaßstabes in μm^2 wiedergegeben. Die gemessenen Strecken sind in µm angegeben. Die einzelnen Trabekel sind durch ein rotes Overlay markiert und dienen als Rechengrundlage. Des Weiteren wird durch das Overlay die Trabekelanzahl bestimmt. Somit werden also die Gesamtfläche pro Bildausschnitt und die Fläche einzelner Trabekel wiedergegeben.

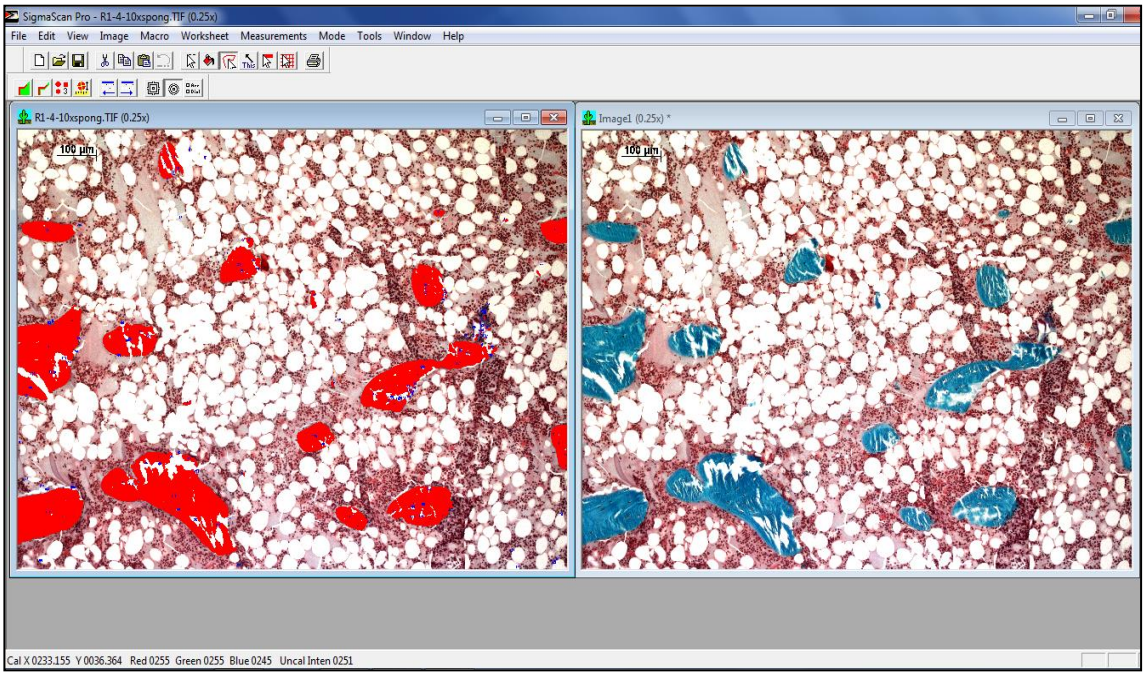

Abbildung 7: *Ausschnitt aus der Sigma Scan Pro Software. Darstellung der Spongiosa bei 10facher Vergrößerung, links mit rotem Overlay, rechts ohne roten Overlay.*

Der Feretdurchmesser (Feretdiameter) in der Dimension µm und die Kompaktheit (Compactness) als dimensionslose Zahl beschreiben die Form der Trabekel genauer. Der Feretdurchmesser berechnet den Durchmesser eines theoretischen Kreises, dessen Flächeninhalt dem des zu messenden Objektes entspricht. Er wird in µm angegeben und

gibt im vorliegenden Fall Rückschlüsse über die Trabekelgröße. Der Verzweigungsgrad wird hierbei nicht berücksichtigt, hierfür dient die Kompaktheit. Die Kompaktheit ist eine dimensionslose Größe und definiert als Umfang zum Quadrat, dividiert durch die Fläche ($C=U^2/A$). In Form eines Kreises nimmt die Kompaktheit ihr Minimum an. Bei gleicher Fläche zweier Objekte, jedoch mit unterschiedlich großem Umfang, kann man Aussagen über die Verzweigung treffen. Je verzweigter ein Objekt ist, desto größer ist sein Umfang und desto größer seine Kompaktheit und umgekehrt. Wie bereits oben erwähnt, wird als Minimum die Kompaktheit eines Kreises erreicht.

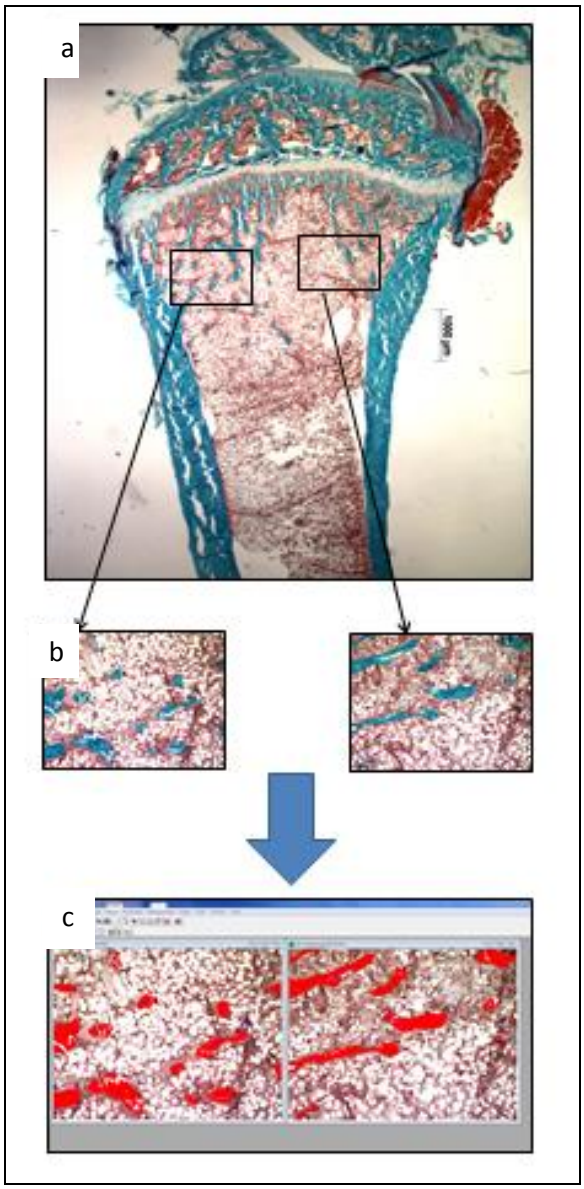

Abbildung 8: *Übersicht über den Ablauf der Untersuchung. a) Digitalisierung in 1,25facher Vergrößerung b) 10fache Vergrößerung in 500µm Abstand zur Epiphysenfuge (hier linker und rechter Sponigosaausschnitt dargestellt). c) histomorphometrische Auswertung mit Sigma Scan Pro Software (hier bereits roter Overlay eingefügt).*

3.5 Statistik

Alle Graphiken im Ergebnisteil dieser Arbeit wurden mit dem Sigma STAT und Sigma PLOT (SPSS Inc., Chicago) am PC erstellt. Zur statistischen Beschreibung wurden die Daten als Messreihen zu Spalten gefasst und bei Normalverteilung als Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. Standardfehler wiedergegeben. In der Grafiken werden großenteils die Mittelwerte mit dem 95% Konfidenzinterval dargestellt. Wir führten bei den normalverteilten Daten eine Signifikanztestung mit einer Varianzanalyse und dem Holm-Sidak-Test durch. Bei den nicht parametrischen Daten wurde auf eine ANOVA der Ränge zurückgegriffen.

4. Ergebnisse

Insgesamt gingen 178 von 180 Tieren in die Studie ein. Zwei Tiere verstarben im Laufe der Untersuchung.

4.1 Gewichtsentwicklung

Die Versuchstiere wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Behandlungszeitraumes gewogen. Die gruppenspezifische Gewichtsentwicklung ist in Abbildung 9 graphisch dargestellt. Bis zur Trepanation wurden alle Gruppen wirkstofffrei mit sojafreier Kost ernährt. Bis zu diesem Zeitpunkt stellt sich in allen Gruppen die Entwicklung des Gewichtes unauffällig dar. Alle Gruppen zeigen einen kontinuierlichen Anstieg ihres Gewichtes von durchschnittlich 374g zu Beginn der Untersuchung bis zu ca. 431g am Tag der Trepanation und des Futtertausches. Mit dem Beginn der Substanzapplikation zeigen sich gruppenspezifische Unterschiede bei der Gewichtsentwicklung.

Bei der SF-, DHT-, GEN- und EQ-Gruppe wurde eine stetige Gewichtszunahme über die gesamte Versuchsdauer beobachtet. Den größten Gewichtszuwachs über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet verzeichnet die DHT- Gruppe. Die E2-Gruppe zeigte nach Beginn der Hormongabe (Futtertausch) eine kontinuierliche Gewichtsreduktion. Dabei wurde das Gewicht bei Behandlungsbeginn nur unwesentlich unterschritten und stellte somit keine gesundheitliche Gefährdung der Tiere dar.

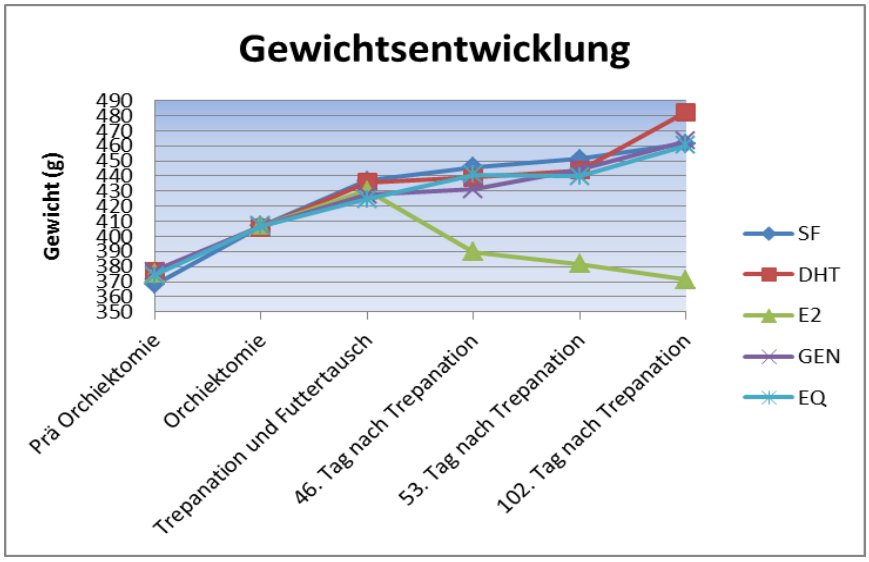

Abbildung 9: *Grafische Darstellung des Gewichtes der Versuchsgruppen zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten bei 36 Tieren pro Gruppe (Daten wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Wuttke/Wiese zur Verfügung gestellt; siehe auch Tabelle A-1).*

4.2 Effekte der Hormonsubstitution auf die Kortikalisdicke der Diaphyse und Metaphyse

Nach 46-tägiger Substanzapplikation war in allen Gruppen die Kortikalisdicke im Bereich der Diaphyse signifikant größer als in der Referenzgruppe SF. Nach 53-tägiger Substanzapplikation war in der E2-Gruppe die Kortikalisdicke signifikant kleiner als in der Referenzgruppe SF.

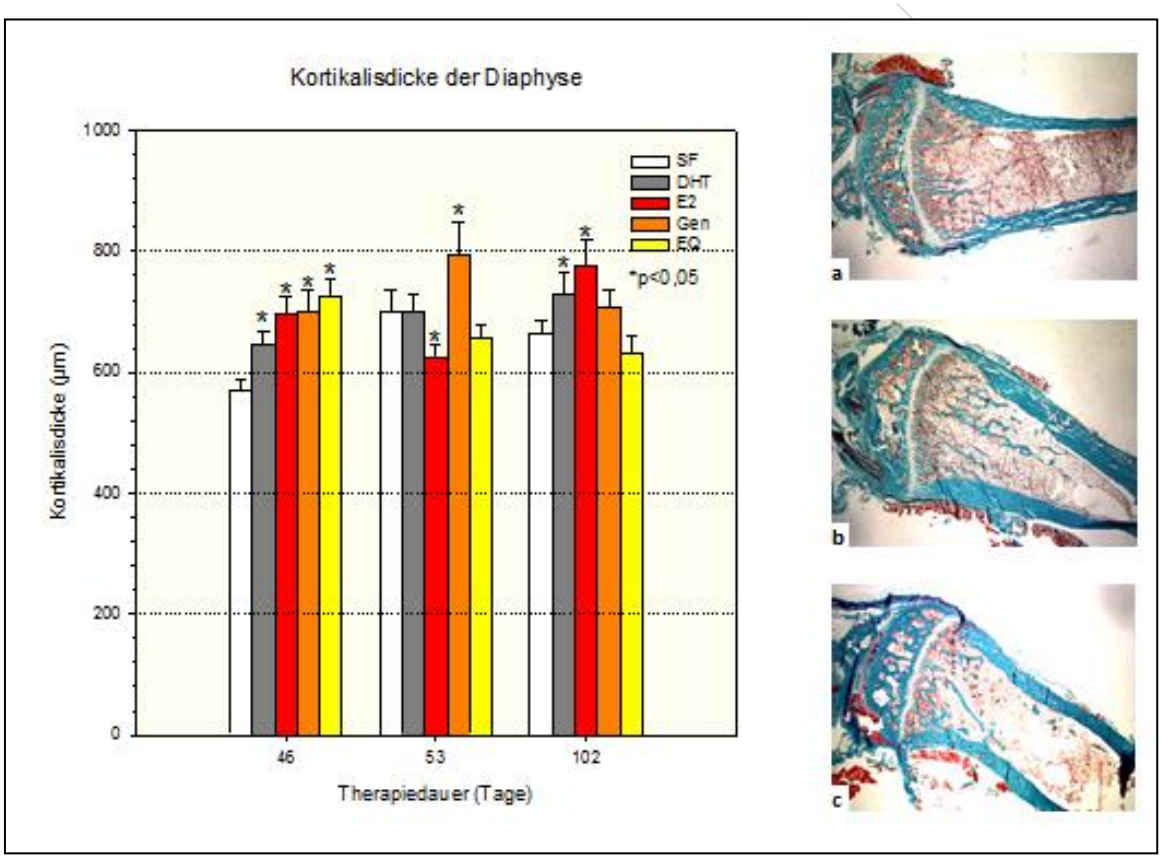

Abbildung 10: *Mittelwerte und 95% Konfidenzinterval der Kortikalisdicke der Diaphyse nach 46-, 53- und 102-tägiger Substanzapplikation der DHT-, E2-, GEN-, EQ- sowie der SF-Gruppe; *p≤0,05 (ANOVA und multipler Vergleich gegen die SF-Referenzgruppe einer jeden Obduktionsgruppe nach Holm-Sidak). Rechts: 1,25-fache Vergrößerung einer Rattentibia im Längsschnitt, nach Goldner gefärbt, der SF Gruppe nach a) 46 Tagen, b) 53 Tagen und c) 102 Tagen in der Übersicht.*

Die Kortikalisdicke der GEN-Gruppe war dagegen größer als in der SF-Gruppe. Die Gruppen von DHT und EQ zeigten nach 53 Tagen keinen signifikanten Unterschied zur SF-Gruppe. Nach 102-tägiger Substanzapplikation war wiederum ein signifikanter Anstieg der Dicke der E2-Gruppe verglichen mit der Referenzgruppe SF zu sehen. Auch die DHT-Gruppe zeigte nach 102 Tagen eine signifikante Dickenzunahme gegenüber SF.

Die Phytohormongruppen GEN und EQ zeigten nach 102 Tagen keinen signifikanten diaphysären Dickenunterschied zur Referenzgruppe SF.

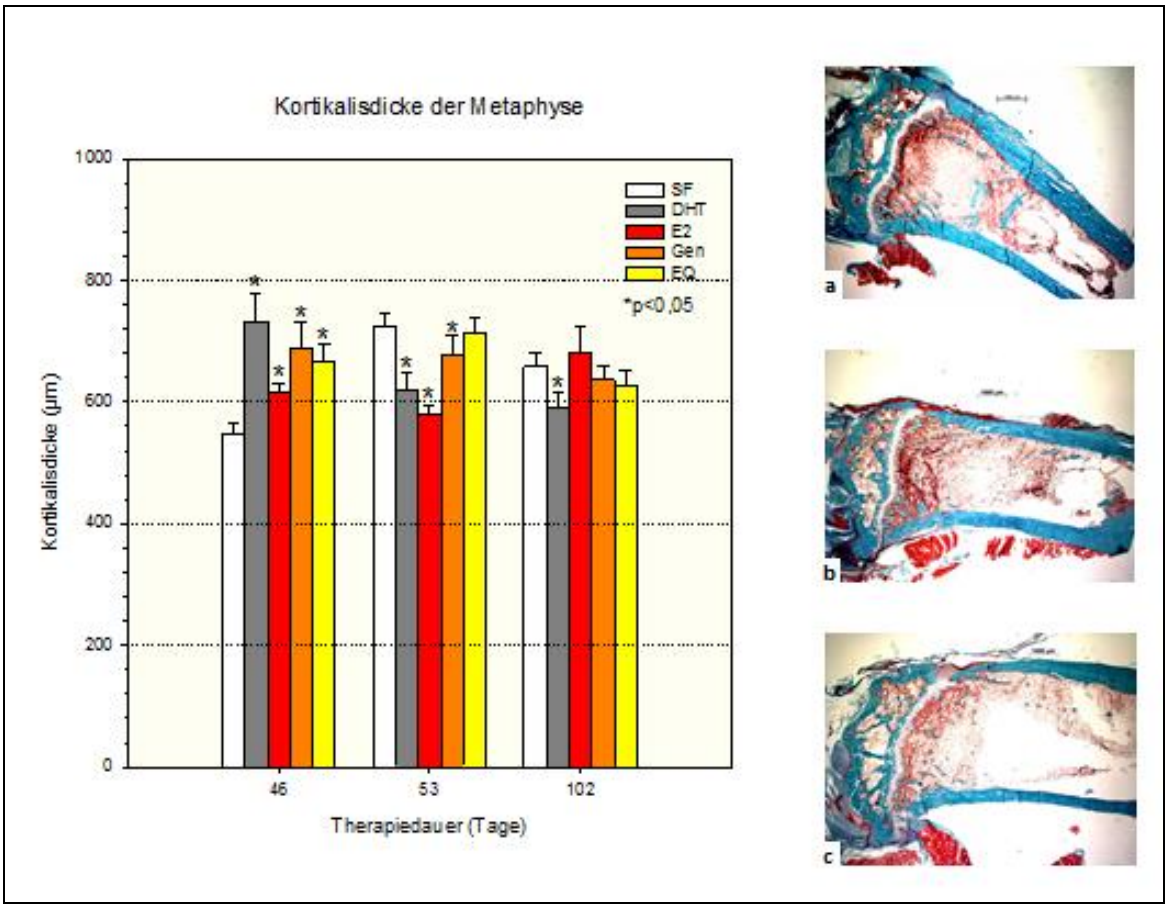

Abbildung 11: *Mittelwerte und 95% Konfidenzinterval der Kortikalisdicke der Metaphyse nach 46-, 53- und 102-tägiger Substanzapplikation der DHT-, E2-, GEN-, EQ- sowie der SF-Gruppe; *p≤0,05 (ANOVA und multipler Vergleich gegen die SF-Referenzgruppe einer jeden Obduktionsgruppe nach Holm-Sidak). Rechts: 1,25-fache Vergrößerung einer Rattentibia im Längsschnitt, nach Goldner gefärbt, der DHT Gruppe nach a) 46 Tagen, b) 53 Tagen und c) 102 Tagen in der Übersicht.*

Im Bereich der Metaphyse war die Kortikalisdicke nach 46-tägiger Substanzapplikation in allen Gruppen signifikant größer als in der Kontrollgruppe SF, wobei hier die DHT Gruppe den größten Wert zeigte. Nach 53 Tagen waren in den Gruppen DHT, E2 und GEN die Kortikalisdicken signifikant kleiner als in der SF-Kontrollgruppe, während die EQ-Gruppe nahezu die gleiche Dicke aufwies wie die SF-Gruppe. Nach 102 Tage langer Applikation war die Kortikalisdicke in der DHT-Gruppe weiterhin signifikant kleiner als in der SF-Gruppe. Alle anderen zeigten keine signifikanten Größenunterschiede zur Referenzgruppe SF.

4.3 Effekte auf die Spongiosa

4.3.1 Effekt auf die Spongiosafläche pro Gewebefläche (relative Spongiosafläche)

Die Spongiosafläche (Summe aller Trabekelflächen innerhalb eines Bildausschnittes) pro Gewebefläche (Knochenmarksraumgewebe innerhalb des Bildausschnitts) als Parameter der Knochenquantität zeigte nach 46 Tagen in der SF-Gruppe die größten Werte aller Gruppen. Nach 53 Tagen lag die E2-Gruppe an der Spitze, dicht gefolgt von der SF-Gruppe. DHT und EQ waren fast mit gleichen Werten vertreten und niedriger als die oben genannten Gruppen. GEN lag deutlich unter allen anderen. Nach 102 Tagen war die Knochenquantität in der SF-Gruppe am größten verglichen mit den anderen Gruppen. Innerhalb der SF-Gruppe zeigte sich ein stetiger Anstieg während des Behandlungszeitraumes. DHT, E2, GEN und EQ hatten deutlich weniger Knochenmenge nach 102 Tagen als die SF-Gruppe. Innerhalb der Gruppen zeigte sich bei DHT, E2 und GEN kein stetiger Anstieg sondern eine Fluktuation. In der EQ-Gruppe war ein stetiger Knochenverlust der Spongiosa erkennbar (vgl. Abbildung 12).

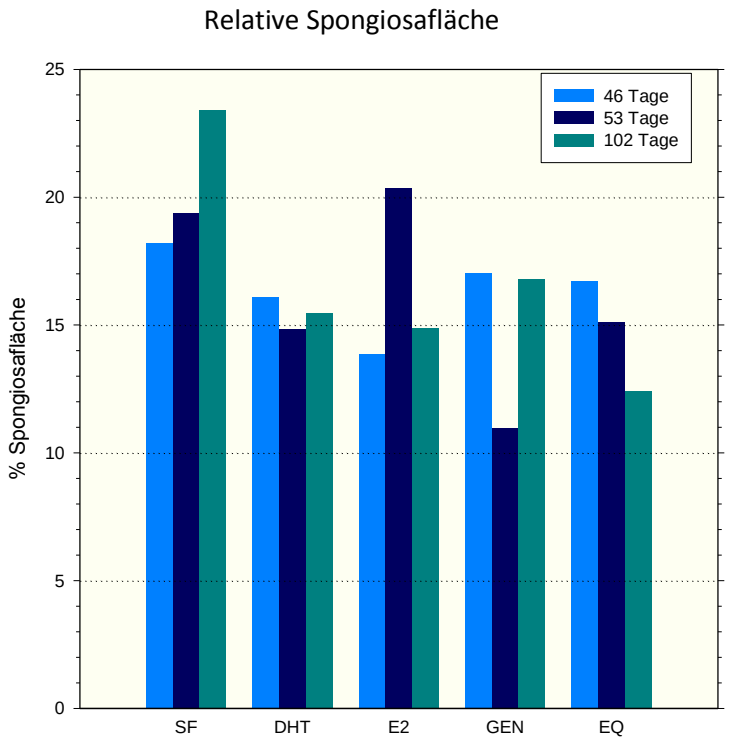

Abbildung 12: *Darstellung der relativen Spongiosafläche/Markraum in % nach 46-, 53-, und 102-tägiger Substanzapplikation der SF-, DHT-, E2-, GEN- und EQ-Gruppe.*

4.3.2 Effekt auf die Trabekelanzahl pro Fläche

Die Untersuchung der Trabekelanzahl der einzelnen Therapiegruppen zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten ergab, dass nach 46 Tagen die E2- und EQ-

Gruppe eine signifikant höhere Trabekelanzahl aufwiesen als die SF-Gruppe. Die GEN- und DHT-Gruppen hingegen unterschieden sich nicht signifikant von SF. Nach 53 Tagen war die Trabekelzahl von E2 und EQ signifikant kleiner als in der Kontrollgurppe SF. Die DHT- und EQ-Gruppe unterschieden sich weiterhin statistisch gesehen nicht von ihrer Referenzgruppe SF. Zum dritten Obduktionszeitpunkt nach 102 Tagen unterschied sich keine der Gruppen statistisch signifikant von der SF-Gruppe (vgl. Abbildung 13).

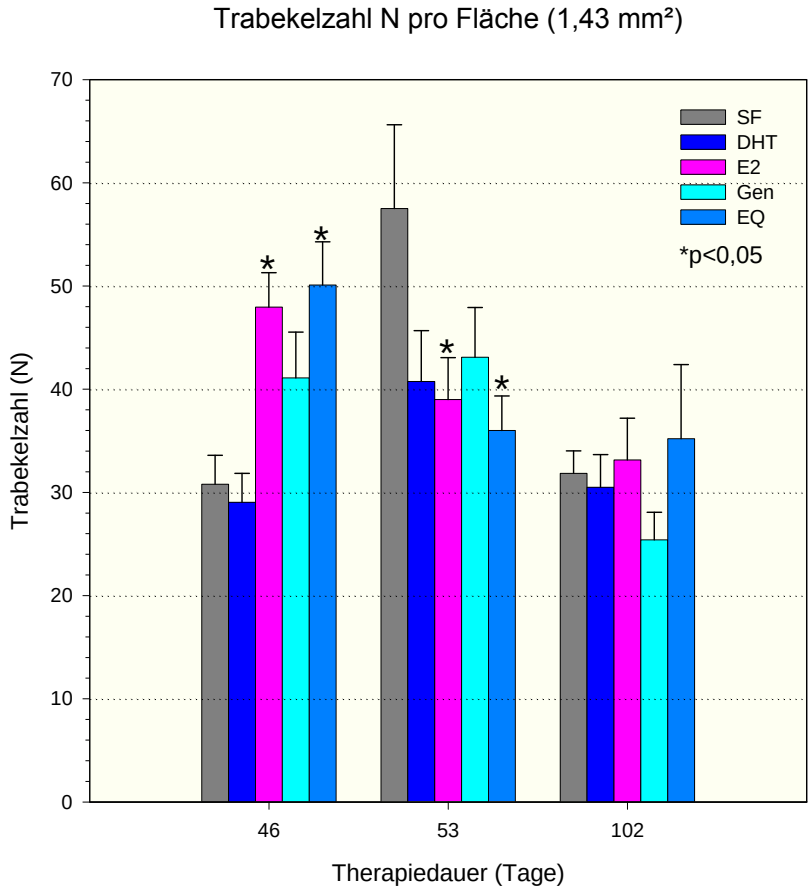

Abbildung 13: *Darstellung des Mittelwerts der Trabekelanzahl pro Fläche nach 46-, 53-, 102-tägiger Substanzapplikation der DHT-, E2-, GEN-, EQ- und SF-Gruppe (*p≤0,05, ANOVA und multipler Vergleich gegen die SF- Referenzgruppe nach Holm-Sidak).*

4.3.3 Effekt auf die Fläche der Trabekel

Der mittlere Feretdurchmesser lag nach 46-tägiger Substanzapplikation bei E2 und EQ signifikant niedriger als in der SF-Gruppe. Die EQ- und DHT-Gruppen wiesen keine signifikanten Abweichungen von der SF-Gruppe auf. Nach 53 Tagen medikamentöser Behandlung war in der EQ-Gruppe ein signifikant höherer Feretdurchmesser als bei der SF-Gruppe zu beobachten. Alle anderen Gruppen zeigten keine signifikanten Abweichungen. Nach 102 Tagen war der Feretdurchmesser nur für die EQ-Gruppe signifikant niedriger gegenüber der Kontrollgruppe SF (vgl. Abbildung 14).

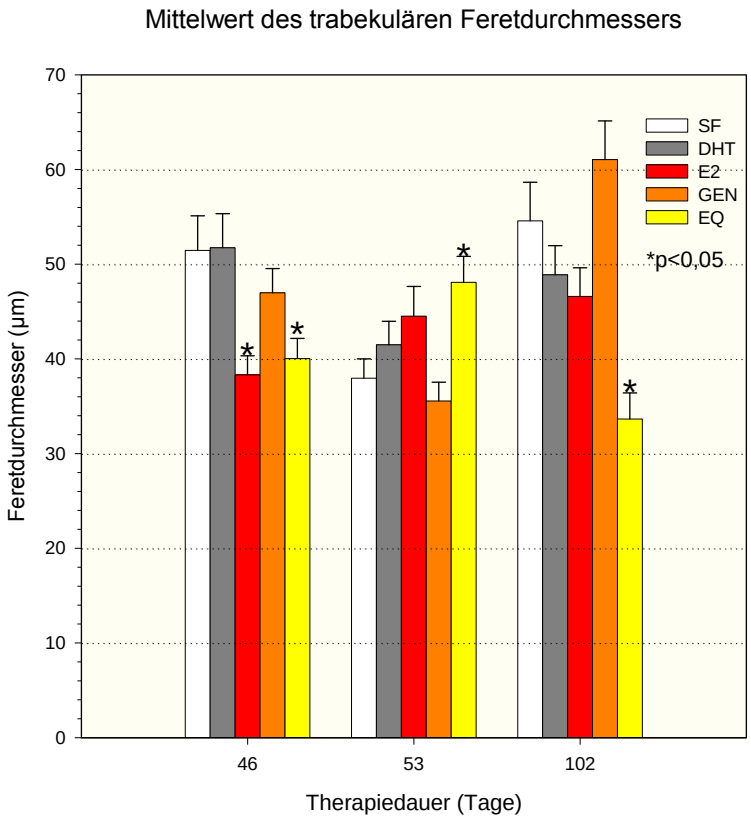

Abbildung 14: *Mittelwert und Standardfehler des trabekulären Feretdurchmessers nach 46-, 53- und 102-tägiger Substanzapplikation der DHT-, E2-, GEN-, EQ- sowie der SF-Gruppe (*p≤0,05, ANOVA und multipler Vergleich gegen die SF-Referenzgruppe nach Holm-Sidak).*

4.3.4 Effekte auf die trabekuläre Achsenlänge

Die maximale trabekuläre Achsenlänge war nach 46-tägiger Substanzapplikation in der E2- und EQ-Gruppe signifikant geringer als in der Referenzgruppe SF. Nach 53 Tagen konnte statistisch gesehen kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen erkannt werden. 102 Tage nach Beginn der Applikation war nur in der EQ-Gruppe ein signifikant geringeres Ergebnis sichtbar. Alle anderen Gruppen zeigten erneut keinen signifikanten Unterschied zur Referenzgruppe SF.

Die minimale trabekuläre Achsenlänge zeigte die gleichen Signifikanzen zu den einzelnen Obduktionszeitpunkten wie bei der Darstellung der maximalen trabekulären Achsenlängen, sodass auf eine erneute Beschreibung hier verzichtet wird.

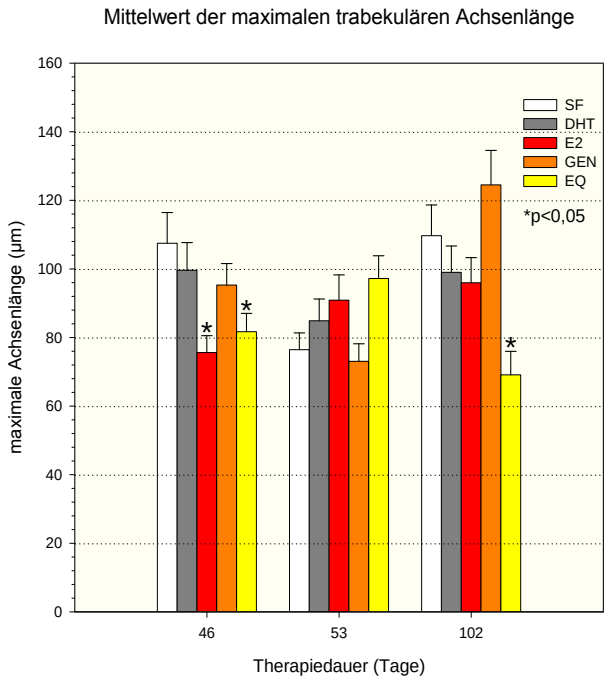

Abbildung 15: *Darstellung des durchschnittlichen Mittelwerts und Standardfehler der maximalen Achsenlänge nach 46-, 53-und 102-tägiger Substanzapplikation der DHT-, E2-, GEN-, EQ- sowie der SF-Gruppe (*p≤0,05, ANOVA und multipler Vergleich gegen die SF-Referenzgruppe nach Holm- Sidak).*

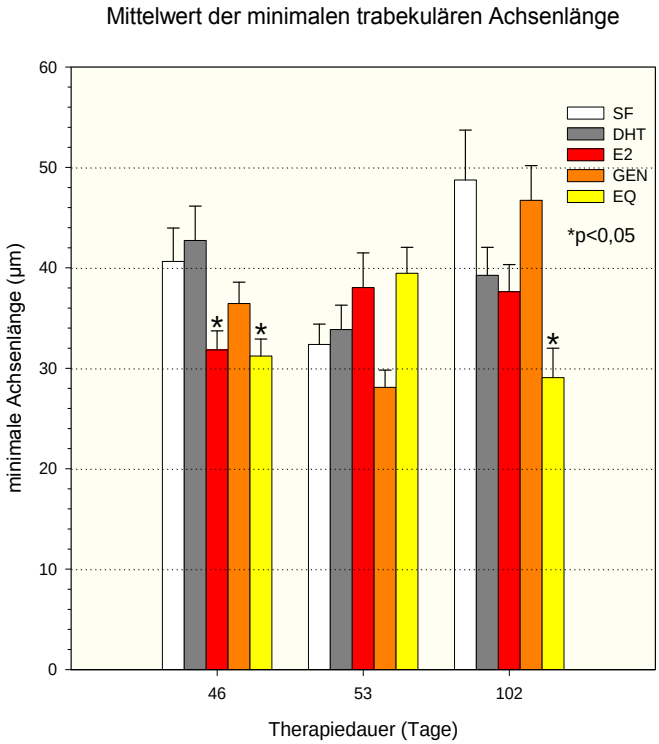

Abbildung 16: *Darstellung des durchschnittlichen Mittelwerts und Standardfehler der minimalen Achsenlänge nach 46-, 53-und 102-tägiger Substanzapplikation der DHT-, E2-, GEN-, EQ- sowie der SF-Gruppe (*p≤0,05, ANOVA und multipler Vergleich gegen die SF-Referenzgruppe einer jeden Obduktionsgruppe nach Holm- Sidak).*

4.3.5 Effekt auf die trabekuläre Kompaktheit

Betrachtet man im Mittel die Kompaktheit aller 5 Gruppen über den Therapiezeitraum, zeigten sich, verglichen mit der SF-Referenzgruppe, keine signifikanten Unterschiede der einzelnen Gruppen zueinander. Jedoch lassen sich Trends erkennen. SF zeigte über den gesamten Behandlungszeitraum eine deutliche Schwankung. Die DHT-Gruppe blieb konstant. Die E2-Gruppe nahm stetig an Kompaktheit zu. GEN und EQ zeigten ebenfalls leichte Fluktuationen. Alle Veränderungen waren jedoch zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikant unterschiedlich zur SF Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 17).

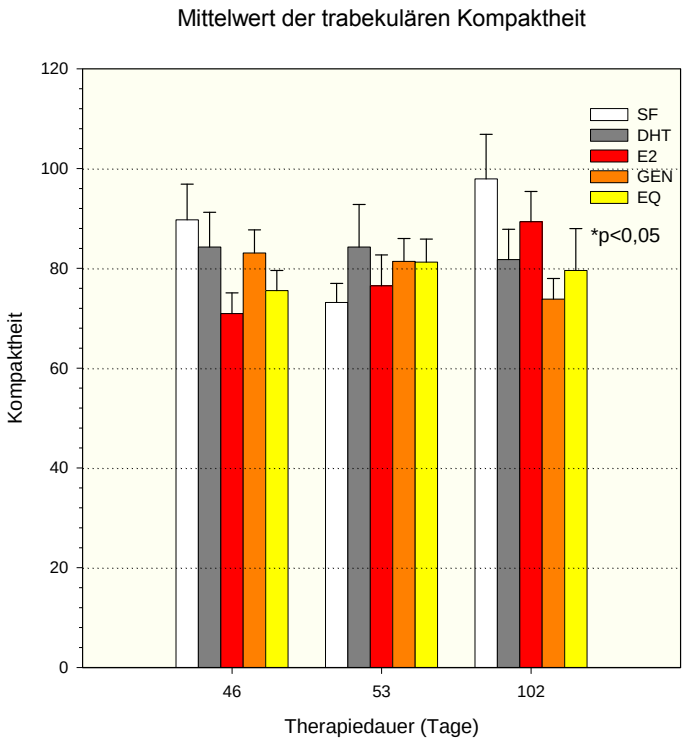

Abbildung 17: *Mittelwert und Standardfehler der Kompaktheit nach 46-, 53-und 102-tägiger Substanzapplikation der DHT-, E2-, GEN-, EQ- sowie der SF-Gruppe (*p≤0,05, ANOVA und multipler Vergleich gegen die SF-Referenzgruppe nach Holm- Sidak).*

Tabelle 1: *Zusammenfassung der Wirkung der Testsubstanzen auf die Spongiosa nach 102-tägiger Substanzapplikation in Bezug zur SF-Kontrollgruppe.*

	DHT	E2	GEN	EQ
relative Spongiosafläche	↓	↓	↓	↓
Trabekelanzahl pro Fläche	↔	↔	↔	↔
Mittlerer Feretdurchmesser	↔	↔	↔	↓
Maximaler Achsendurchmesser	↔	↔	↔	↓
Minimaler Achsendurchmesser	↔	↔	↔	↓

4.4 Effekte auf die Epiphyse

Die Breite der Epiphysenfugen zeigte in allen Gruppen zu allen Obduktionszeitpunkten, bis auf die E2-Gruppe, keinen signifikanten Unterschied bezogen auf die Kontrollgruppe SF. In der E2-Gruppe war jedoch zu allen Untersuchungszeitpunkten eine signifikant schmalere Epiphysenfuge erkennbar (vgl. Abbildung 18).

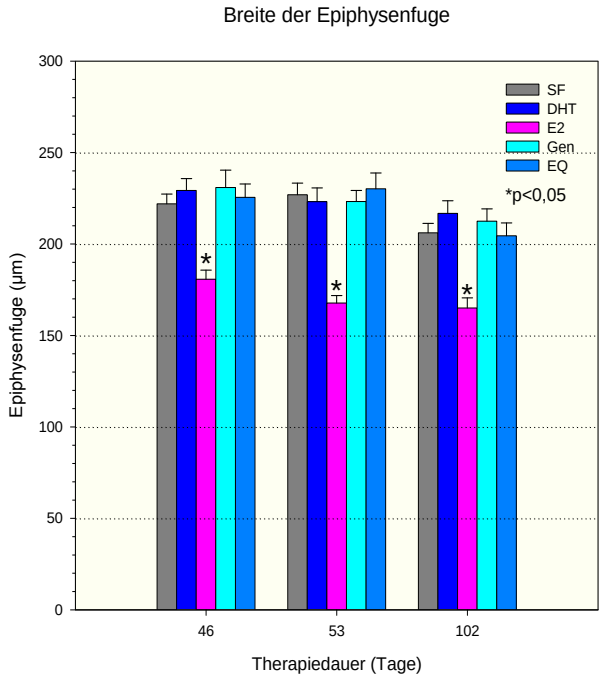

Abbildung 18: *Darstellung des Mittelwert und 95% Konfidenzinterval der Breite der Epiphysenfuge nach 46-, 53- und 102-tägiger Substanzapplikation der DHT-, E2-, GEN-, EQ- sowie der SF-Gruppe (*p≤0,05, ANOVA und multipler Vergleich gegen die SF-Referenzgruppe einer jeden Obduktionsgruppe nach Holm-Sidak).*

5. Diskussion

Die Osteoporose wurde lange Zeit als typische Erkrankung der Frau angesehen. Während die Osteoporose beim Mann unterdiagnostiziert wurde, weil sie auch heute noch in vielen Kulturen als Erkrankung der Frau gesehen wird. Diese Tatsache bedeutet große Nachteile für das männliche Geschlecht, das mit dieser Erkrankung lebt (CAWTHON 2011, LAMBERT et al. 2011, SOLIMEO 2011). Nicht zuletzt deswegen werden in der aktuellen Literatur weitergehende Untersuchungs- und Therapieansätze der männlichen Osteoporose gefordert (CAWTHON 2011). Die Östrogenersatztherapie, die Verabreichung von Androgenpräparaten sowie die Therapie mit Phytohormonen wie Equol und Genistein sind im Rahmen der weiblichen Osteoporose bereits eingehend untersucht worden (KOLIOS et al. 2009, KOSTELAC et al. 2003, RIESCO et al. 2011, SEHMISCH et al. 2010a, SEHMISCH et al. 2010b). Wie sich diese Wirkstoffe auf die Defektheilung und das Remodelling der osteoporotischen männlichen Rattentibia ausgewirkt haben, soll nachfolgend dargestellt und im wissenschaftlichen Kontext diskutiert werden.

5.1 Methodik

5.1.1 Tiermodell Ratte

Die männliche orchiektomierte Ratte wird häufig als Tiermodell bei Studien zur Erforschung der männlichen Osteoporose eingesetzt und als geeignetes Modell zur Untersuchung und Erforschung der männliche Osteoporose angesehen (ERBEN 2001, KALU 1991). Die Tiere sind nach wenigen Monaten geschlechtsreif und entwickeln nach Orchiektomie innerhalb von vier Wochen eine Osteoporose. Sie sind daher bestens als Untersuchungstier geeignet (ROUDEBUSH et al. 1993).

Erben hat 2001 nachgewiesen, dass eine Orchiektomie von männlichen Ratten zu einem deutlichen und anhaltenden erhöhten Knochenturnover (ERBEN 2001) sowie einem Verlust des spongiösen und des kortikalen Knochens führt (VANDERSCHUEREN et al. 1992). Kalu stellte in seiner Studie fest, dass bei ovarektomierten weiblichen Ratten, der Verlust an spongiösem Knochen gegenüber den kortikalen Knochenanteilen größer ist (KALU 1991). Der östrogenregulierte spongiöse Knochenanteil, so wurde durch Hertrampf 2006 publiziert, ist besonders vom Knochenverlust betroffen (HERTRAMPF et al. 2006). Da die proximale Tibia im Bereich der Epiphyse besonders stark durch die Osteoporose bei Ratten betroffen ist (WRONSKI et al. 1985),wurde dieser Bereich auch in der vorliegenden Arbeit untersucht. In Bezug auf den Knochen eignet sich das

Tiermodell aufgrund ähnlicher Knochenregulationsmechanismen wie beim Menschen gut zur Untersuchung der Wirkung von Androgenen und Östrogenen. Das Rattentiermodell eignet sich ebenfalls zur Untersuchung von Phytohormonen, wie in unserem Falle GEN und EQ (FROST und JEE 1992, KALU et al. 1991).

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Gewichtsentwicklung

Betrachtet man die Entwicklung des Köpergewichts, so lassen sich zwei Kernbeobachtungen machen. Zum einen zeigte die DHT-Gruppe die stärkste Gewichtszunahme aller Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum. Zum anderen zeigte die E2-Gruppe einen stetigen Verlust an Körpermasse. Die anderen Gruppen verhielten sich ähnlich wie die wirkstofffreie Referenzgruppe SF. Sie nahmen stetig an Körpermasse zu. Die Betrachtung der Gewichtsentwicklung bestätigt, dass die Phytohormone bei männlichen Ratten keinen appetitzügelnden Effekt haben. Dies wurde bereits 2008 beobachtet (SANTOLLO und ECKEL 2008). GEN und EQ unterschieden sich nicht relevant von der SF-Gruppe. Sie scheinen folglich keinen zusätzlichen anabolen Effekt gegenüber SF zu haben. Der katabole Effekt in der E2-Gruppe wurde schon in anderen Studien beobachtet. So konnten Studien zur Postmenopause zeigen, dass es bei Östrogenmangel oder Östrogenresistenz zu einer deutlichen Adipositas bzw. Gewichtszunahme kommt (GENAZZANI und GAMBACCIANI 2006 MACGILLIVRAY et al. 1998). Die Gewichtszunahme nach Testosteronapplikation (DHT-Gruppe) ist in der Literatur ebenfalls bereits beschrieben und konnte hier bestätigt werden (GENTRY und WADE 1976).

5.2.2 Wirkung der Sexualhormone

5.2.2.1 Dihydrotestosteron

Dihydrotestosteron (DHT) ist ein biologisch aktiver Metabolit des Hormons Testosteron. Es ist ein C-19-Steroid und zählt zu den Androgenen, einer Klasse von Sexualhormonen. Testosteron wird in den Leydig-Zwischenzellen des Hodens gebildet und nach zuvor erfolgter Stimulation durch das luteinisierende Hormon (LH) der Hypophyse sezerniert, welches wiederum durch das Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) des Hypothalamus reguliert wird. Über einen negativen Feedbackmechanismus hemmt Testosteron wiederum die Ausschüttung von LH und GnRH (DRENCKHAHN und KUGLER 2003, PSYCHREMBEL 2002). Testosteron wirkt über zytosolische

Androgenrezeptoren (AR- Rezeptoren). Es wird ferner durch die 5α-Reduktase in 5α-Dihydrotestosteron umgewandelt, welches affiner an diese AR-Rezeptoren bindet als Testosteron selbst. Testosteron fördert Wachstum und Differenzierung der männlichen Fortpflanzungsorgane in der fetalen Phase. Durch seinen Mangel in dieser Phase entsteht das weibliche Genitale. Es bewirkt die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale und fördert die Ausreifung der Spermien in den Sertoli-Zellen des Hodens. Das muskuloskelettale Wachstum wird maßgeblich durch Androgene beeinflusst. Unter ihnen kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Muskelmasse und Zunahme des Skelettlängenwachstums (PSYCHREMBEL 2002). Während der Adoleszenz verstärken Androgene den periostalen Knochenanbau und führen somit zu einer Zunahme der Kortikalisdicke (SEEMAN 2002). In der Spongiosa führen Androgene zu einer Steigerung der Trabekeldicke und sorgen für die Aufrechterhaltung der Trabekelanzahl (KHOSLA et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde das am stärksten wirkende Androgen DHT verwendet, dass nicht durch Aromatase in Östrogen umgewandelt werden kann (PSYCHREMBEL 2002, VIDAL et al. 2000, WANG und SWERDLOFF 2002). Daher wurde nur die spezifische androgene Wirkung über AR- Rezeptoren am Knochen untersucht. In Studien an männlichen orchiektomierten Ratten verhinderte Dihydrotestosteron den Verlust von kortikalem Knochen und teilweise den des trabekulären Knochens (TRAMONTANA et al. 2001, VANDENPUT et al. 2002, WAKLEY et al. 1991). Das DHT hatte in der vorliegenden Untersuchung einen positiven Effekt auf die Kortikalisdicke der Diaphyse. DHT führte in der Diapyhse zu einer Dickenzunahme der Kortikalis. Auf die Kortikalisdicke der Metaphyse hatte DHT nur anfänglich einen positiven Effekt. Über den gesamten Behandlungszeitraum betrachtet, führte das DHT jedoch zu einem Kortikalisdickenverlust. Die periostale Apposition scheint im vorliegenden Fall nur für den Bereich der Diaphyse zu gelten und nicht für die Kortikalis der Metaphyse (SEEMAN 2003). Die in der Literatur beschriebenen positiven Einflüsse auf die Kortikalis können wir für den Bereich der Diaphyse bestätigen. Für die Spongiosa des sich in Defektheilung und Remodelling befindlichen osteoporotischen Knochens, ließ sich kein positiver Effekt beobachten. DHT konnte in unserer Untersuchung weder die Knochenquantität, noch die Trabekelanzahl, noch die Trabekelgröße oder die Verzweigung positiv beeinflussen, wie dies in anderen Studien nachgewiesen wurde (KHOSLA et al. 2006). Effekte auf die Epiphysenfugenbreite wurden in der vorliegenden Arbeit nicht gesehen.

5.2.2.2 17-ß-Östradiol

Östradiol (E2) ist neben Estron und Estriol eines der wichtigsten natürlichen Östrogene. Es wird bei Männern in der Nebennierenrinde und teilweise im Unterhautfettgewebe gebildet. Es gehört, wie auch Testosteron, zur Gruppe der Sexualhormone. Die Synthese der Sexualhormone geht vom Cholesterin aus. Ihnen dient als gemeinsames Grundgerüst das Sterangerüst. Die Biosynthese von Östrogenen erfolgt stets über Testosteron, welches durch Aromatase umgewandelt wird. Auch hier ist der Kontrollmechanismus wie bei den Androgenen über den Hypothalamus und die Hypophysenhormone (GnRH, FSH, LH) geregelt. Östrogene binden an Östrogenrezeptoren, von denen ERα und ERβ hier besondere Bedeutung zukommen. ERα kommt vor allem im Gehirn, der Leber und den Nieren vor (KRUM et al. 2008) bei der Frau zusätzlich in der Mamma und im Uterus, wohingegen ERβ in den Ovarien überwiegt. Beim Mann überwiegt ERβ in der Prostata und im Epididymidis (KHOSLA und RIGGS 2003). Im Knochengewebe werden beide Subtypen exprimiert (HOU et al. 2006). Östrogen ist für die Ausbildung der weiblichen Geschlechtsmerkmale verantwortlich, stimuliert die Brustentwicklung und koordiniert den Menstruationszyklus. Es stimuliert das Knochenwachstum und bewirkt den Schluss der Epiphysenfuge am Ende der Pubertät. Es spielt eine zentrale Rolle im Knochenstoffwechsel und hat eine antiresorptive Wirkung auf den Knochen (KOSTELAC et al. 2003, KRUM et al. 2008, KUIPER et al. 1998). Es ist bekannt, dass Östrogen den Verlust von kortikalen und trabekulären Knochen verhindern kann, indem es unter anderem einer Reduktion der Trabekelanzahl entgegenwirkt (TAKANO-YAMAMOTO und RODAN 1990, VANDENPUT et al. 2002, VIDAL et al. 2000). Auch werden dem E2 positive Einflüsse auf die Knochenheilung nachgesagt (KOLIOS et al. 2009). E2 wirkte in unserer Untersuchung im diaphysären Kortikalisbereich einem Knochenverlust entgegen. Es lässt sich festhalten, dass E2 nach 102-tägiger Applikation die stärkere Wirkung auf die Kortikalis der Diaphyse zeigte als DHT, im Bereich der Metaphyse jedoch nicht. Hier war innerhalb der ersten 46 Tagen ein knochenprotektiver Effekt nachweisbar. Es zeigte sich ein temporärer knochenprotektiver Effekt im Spongiosabereich. Die Anzahl der Trabekel stieg innerhalb der ersten 46 Tage signifikant an, während die Trabekelgröße in diesem Zeitraum signifikant gegenüber SF abnahm. Jedoch ist an dieser Stelle festzuhalten, dass die Trabekelgröße nicht so entscheidend für die Knochenstabilität ist wie die Trabekelanzahl. Die in der Literatur beschriebene erhöhte Bruchfestigkeit unter Östrogentherapie steht der bei uns beobachteten Trabekelgrößenabnahme also nicht entgegen (ESTAI et al. 2011, KHOSLA et al. 2006)

Nach 53 Tagen war die Trabekelanzahl signifikant niedriger als in der SF-Gruppe. Über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet wies bei uns die Östrogensubstitution keinen positiven Einfluss auf die Knochenquantität, die Trabekelanzahl, die Trabekelgröße und den Verzweigungsgrad gegenüber der Kontrollgruppe SF auf. Die Epiphysenfugenbreite war zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant dünner. Dies ist ein bereits bekannter Effekt und wird auch bei uns beobachtet (NILSSON und BARON 2005, VIDAL et al. 2000).

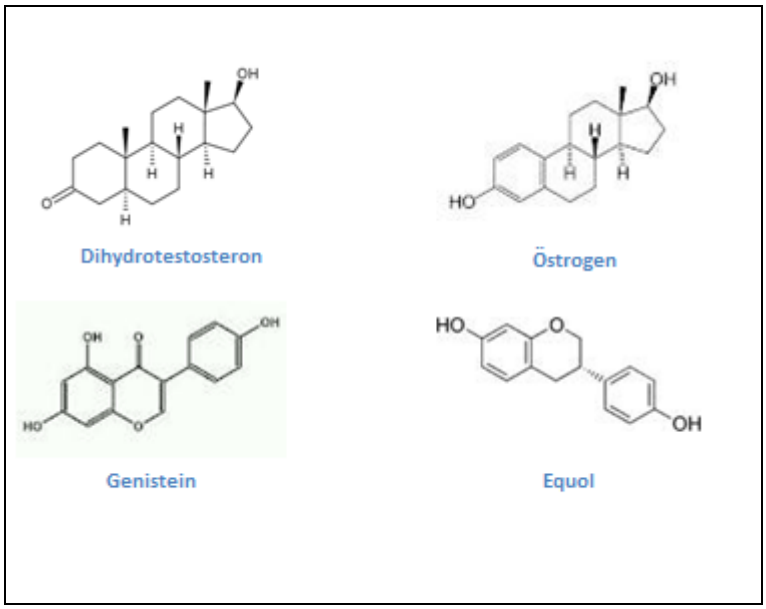

Abbildung 19: *Chemische Strukturformel der einzelnen in dieser Studie verwendeten Wirkstoffe*

5.2.3 Wirkung der Phytohormone

5.2.3.1 Genistein

Genistein (GEN) ist ein Phytoöstrogen aus der Gruppe der Isoflavonoide, die in Pflanzen und vor allem in Sojabohnen enthalten sind. Chemisch betrachtet handelt es sich um heterozyklische Aromaten, die eine phenolische Hydroxylgruppe in ihrem Ringsystem aufweisen. Es wird oral aufgenommen, nach intestinaler Metabolisierung im Darm resorbiert und über die Niere ausgeschieden. GEN hat östrogenähnliche Struktur. Diese Ähnlichkeit ermöglicht es, ebenfalls an Östrogenrezeptoren, ERα und ERβ, zu binden (RICKARD et al. 2003). Hierbei ist seine Affinität zu ERβ am stärksten (KUIPER et al. 1998). Es gibt eine Fülle von Studien, die die Wirkung von GEN untersucht haben. An weiblichen Ratten konnte eine antiresorptive Wirkung auf den Knochen nachgewiesen werden (FANTI et al. 1998). Des Weiteren konnte ein signifikant positiver Effekt auf die Knochenbrüchigkeit bei weiblichen Ratten gezeigt werden. GEN führt zu besserer

Knochenqualität, erhöht die OPG- Serumproteinkonzentration und reduziert die Proteinkonzentration von RANKL im Serum (BITTO et al. 2008). Die östrogene Wirkung auf Mamma und Uterus scheint nur schwach zu sein. Es wird daher als alternative in der Hormonersatztherapie zur Behandlung der Osteoporose diskutiert (SEHMISCH et al. 2010a). Die Studien an weiblichen Individuen überwiegen deutlich und zeigen, dass weitere Forschung bezüglich des männlichen Geschlechts notwendig ist. GEN wies in unserer Untersuchung innerhalb der ersten 46 Tage einen signifikant positiven Effekt auf die Kortikalisdicke der Diaphyse und Metaphyse auf. Dieser konnte allerdings, über den kompletten Versuchszeitraum betrachtet, in unserer Arbeit nicht beobachtet werden. In der Spongiosa gab es weder eine signifikante Erhöhung der Trabekelanzahl noch der mittleren Trabekelgröße. Die Verzweigung der Trabekel wurde ebenfalls nicht beeinflusst verglichen mit SF-Gruppe. Auffallend war nur, dass nach 53 Tagen GEN die geringste relative Spongiosafläche zeigte. Demnach hatten wir einen temporären katabolen Effekt. Dieser katabole Effekt war aber über den kompletten Versuchszeitraum dann nicht mehr nachweisbar. Ein negativer Einfluss auf die Knochenheilung wurde auch durch die Arbeitsgruppe von Kolios beobachtet (KOLIOS et al. 2009). Die Epiphysenfugenbreite wurde, trotz der östrogenähnlichen Struktur und der Fähigkeit an Östrogenrezeptoren zu binden, in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet (RICKARD et al. 2003). Hier scheinen die Rezeptoren für Östrogen hoch spezifisch zu sein und die Bindung östrogenähnlicher Substanzen nicht zuzulassen.

5.2.3.2 Equol

Equol (EQ) ist ein Metabolit des Daidzain, eines weiteren Phytohormons, das nach oraler Aufnahme im Darm zu EQ verstoffwechselt und anschließend resorbiert wird. Die Bioverfügbarkeit ist interindividuell verschieden und von den metabolisierenden Darmbakterien abhängig (FRANKENFELD et al. 2005). Daher wurde in dieser Arbeit auf die direkte Substitution zurückgegriffen und somit der Metabolisierung ausgewichen. Tatsächlich sind nur 30-50% der Menschen in der Lage, EQ zu produzieren. Es wird davon ausgegangen, dass die Wirkung der Isoflavone von der Kompetenz, EQ zu bilden, abhängt (WU et al. 2007). Die Ausscheidung erfolgt auch hier wie bei GEN über den Urin (LIU et al. 2010). Equol bindet an ERα und ERβ und hat einen größeren Östrogeneffekt als GEN (TOUSEN et al. 2011). Studien deuten darauf hin, dass Individuen, die viel EQ metabolisieren können, ein geringeres Risiko haben, an einem Mammakarzinom zu erkranken (ADLERCREUTZ und MAZUR 1997). Es konnte

beobachtet werden, dass Frauen, die viel EQ metabolisieren, nach der Menopause weniger Knochenmasse verlieren (LYDEKING-OLSEN et al. 2004). Die Behandlung mit EQ konnte in Studien mit osteopenischen Mäusen zu einer signifikanten Zunahme der Knochenmasse führen (FUJIOKA et al. 2004), teilweise ohne proliferativen Effekt auf den Uterus (SEHMISCH et al. 2010b), teilweise mit proliferativem Effekt (RACHON et al. 2007). Im Rattenmodell wurde durch EQ-Applikation eine Verringerung der Gewichtszunahme beobachtet sowie günstige Auswirkungen auf metabolische Parameter (RACHON et al. 2007). EQ und GEN sollen stärker auf die spongiösen Anteile des Knochens wirken als auf die kortikalen (MATHEY et al. 2007). EQ wies in unserer Untersuchung innerhalb der ersten 46 Tage, wie GEN, einen signifikant positiven Effekt auf die Kortikalisdicke der Diaphyse und der Metaphyse auf. Dieser positive Effekt konnte, wie schon bei GEN und auch bei E2, über den kompletten Versuchszeitraum betrachtet, nicht bestätigt werden. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass EQ die frühe metaphysäre Knochenheilung positiv beeinflussen kann (KOLIOS et al. 2009). Die Arbeitsgruppe um Kolios verwendete aber für Ihre Untersuchung weibliche Ratten. Protektive Effekte auf die Spongiosa konnten temporär in unserer Untersuchung, innerhalb der ersten 46 Tage, nur von EQ nachgewiesen werden. EQ führte nach 46 Tagen zu einer erhöhten Trabekelanzahl. Nach 53 Tagen war die Trabekelanzahl dann signifikant niedriger. Über den gesamten Zeitraum von 102 Tagen betrachtet zeigte sich kein protektiver bzw. anaboler Effekt. Die mittlere Trabekelfläche schwankte stark von Untersuchungszeitpunkt zu Untersuchungszeitpunkt. Insgesamt nahm die mittlere Trabekelfäche jedoch ab. Die relative Spongiosafläche zeigte einen stetigen Verlust an Fläche. Die Epiphysenfugenbreite wurde nicht beeinflusst. EQ scheint nicht an die Östrogenrezeptoren in der Region der Epiphyse zu binden.

5.2.4 Effekte der Hormonsubstitution

5.2.4.1 Effekte auf die Kortikalisdicke der Diaphyse und der Metaphyse

Nach einem Behandlungszeitraum von 46 Tagen zeigten alle Testsubstanzen im Bereich der Diaphyse eine signifikant größere Kortikalisdicke als die Kontrollgruppe SF. Nach 53 Tagen zeigten nur die E2- und GEN-Gruppe signifikante Unterschiede gegenüber SF. Die E2-Gruppe hatte signifikant niedrigere und die GEN-Gruppe signifikant größere Kortikalisdicken als die SF Gruppe. 102 Tage nach Behandlungsbeginn lagen nur die DHT- und E2-Gruppe signifikant höher als die SF-Gruppe. Die anderen Gruppen

hingegen zeigten keinen signifikanten Unterschied. Die Zunahme der Kortikalisdicke innerhalb der DHT-Gruppe stimmt hier mit Ergebnissen vorliegenden Literatur überein. In der Literatur wir im Vergleich zu postmenopausalen Frauen bei Männern ein erhöhter periostaler Knochenanbau beobachtet (SEEMAN 2003, SEEMAN 2004, VANDENPUT et al. 2002). Diesem periostalen Knochenanbau wird auch die geringere Frakturanfälligkeit des männlichen osteoporotischen Knochens zugeschrieben. Somit wird ein ausgleichender, stabilisierender Effekt des periostalen Knochenanbaus vermutet (SEEMAN 2003, SEEMAN 2004). Nach 53 Tagen zeigte die E2-Gruppe im Bereich der Diaphyse eine signifikant geringere Kortikalisdicke. Nach 102 Tagen jedoch eine signifikant höhere Kortikalisdicke. Diese gegensätzliche Beobachtung zeigt im Gesamtverlauf der Untersuchung die Dynamik der Knochenheilung bzw. des Knochenumbaus. Es lassen sich somit abhängig vom Stand der Heilung unterschiedliche Wirkungen des E2 vermuten. Der positive Effekt des GEN auf die Kortikalisdicke zum Zeitpunkt der ersten beiden Obduktionen zeigt, dass in unserer Untersuchung GEN einen zeitlich längeren positiven Einfluss auf die diaphysäre Kortikalisdicke hatte als das Phytohormon EQ. Das zweite in unserer Studie verwendete Phytohormon, EQ, zeigte nach 46 Tagen die größte signifikante Kortikalisdicke. Dieser Effekt war nach 53 und 102 Tagen jedoch nicht mehr nachweisbar. Somit hatte EQ also nur zu Beginn eine positive Wirkung auf die Kortikalisdicke der Diaphyse. Über einen längeren Behandlungszeitraum haben allerdings nur die Sexualhormone E2 und DHT eine signifikant höhere Dicke der diaphysären Kortikalis zur Folge. Insgesamt war die Wirkung der Testsubstanzen stark abhängig von der Dauer der Behandlung.

Im Bereich der Metaphyse zeigten auch hier alle Versuchsgruppen nach 46 Tagen eine signifikant erhöhte Kortikalisdicke, verglichen mit der SF-Referenzgruppe. Diese Beobachtung konnte nach 53 Tagen nicht gemacht werden. Hier zeigten die Sexualhormone DHT und E2 sowie das Phytohormon GEN signifikant kleinere Dicken der metaphysären Kortikalis. EQ unterschied sich hingegen nicht von der Referenzgruppe SF. Nach 102 Tagen war weder bei E2-, GEN- noch bei der EQ-Gruppe ein signifikanter Unterschied gegenüber der SF-Gruppe zu erkennen. Nur die Tiere der DHT-Gruppe wiesen eine signifikant dünnere metaphysäre Kortikalis gegenüber allen anderen Gruppen auf.

Zusammenfassend muss also zwischen den Effekten auf die diaphysäre und metaphysäre Kortikalis unterschieden werden. Über den gesamten Untersuchungszeitraum wirkten nur die Sexualhormone E2 und DHT im Bereich der Diaphyse einem kortikalen

Knochenverlust signifikant entgegen. Die Gruppe der Phytohormone konnte hier keinen signifikanten Nutzen hervorbringen. Sie hatten nur in den ersten 46 Tagen positiven Einfluss auf den Knochenverlust. Das DHT und E2 dem kortikalen Knochenverlust bei Osteoporose entgegen, wurde bereits in der Literatur (VANDENPUT et al. 2002). Allerdings, so haben wir festgestellt, muss hier zwischen Metaphyse und Diaphyse unterschieden werden. Der Knochenverlust im Bereich der metaphysären Kortikalis wurde in unserer Untersuchung von keiner Testsubstanz verhindert. DHT führte sogar, über den gesamten Behandlungszeitraum betrachtet, eher zu einem kortikalen Knochenverlust der Metaphyse. Die positiven Effekte von DHT und E2 auf den diaphysären Bereich der osteoporotischen, männlichen Ratte, wurden bereits beschrieben (BOHNSACK 2010). Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden allerdings nicht im Hinblick auf die Frakturheilung der Osteoporose untersucht (BOHNSACK 2010). Osteoporotischer Knochen, der sich in Defektheilung und Remodelling befindet, scheint also ähnlich auf die Hormone anzusprechen wie osteoporotischer Knochen, der sich nicht in Defektheilung befindet.

5.2.4.2 Effekte auf die Spongiosa

Der Knochenverlust im Rahmen der Osteoporose ist bekanntermaßen nicht nur im Bereich der Kortikalis lokalisiert, sondern ist vor allem und vermehrt im Bereich der Spongiosa anzutreffen (SEEMAN 2003). Die Untersuchung der spongiösen Struktur mittels histomorphometrischer Parameter war daher von besonderem Interesse. Als histomorphometrische Parameter wurden die relative Spongiosafläche, die Trabekelanzahl pro Fläche, der Feretdurchmesser mit maximaler und minimaler Achsenlänge und die Kompaktheit betrachtet.

Relative Spongiosafläche

Die Betrachtung der relativen Spongisoafläche ermöglicht es, Aussagen über die Knochenquantität zu machen. Interessanterweise war in der SF-Gruppe die Spongiosafläche zu jedem Zeitpunkt größer als in den Vergleichsgruppen. Eine Ausnahme bildet hier nur die E2-Gruppe, die nach 46 Tagen die größte Fläche hatte. Diese Beobachtung konnte jedoch für die E2-Gruppe zu keinem anderen Obduktionszeitpunkt gemacht werden. Betrachtet man nun jede Gruppe einzeln für sich, so kam es innerhalb der SF-Gruppe mit zunehmender Versuchsdauer zu einer kontinuierlichen Spongiosaflächenzunahme. Die DHT-Gruppe zeigte kaum Veränderung im Therapieverlauf. Die relative Spongiosafläche des DHT war nach 46 Tagen am

größten. Nach 53 Tagen fiel sie leicht ab, um anschließend nach 102 Tagen wieder auf ähnliche Werte anzusteigen wie zum ersten Obduktionszeitpunkt. Die E2-Gruppe hatte seine maximale Spongiosafläche nach 53 Tagen. Hier zeigte sich aber, wie oben bereits erwähnt, die größte Fläche aller Gruppen. Nach 46 und 102 Tagen waren die Flächen deutlich geringer als nach 53 Tagen. Es scheint also im Rahmen des Heilungsprozesses ein temporär besonders gutes Ansprechen des spongiösen Konchenstoffwechsels auf das Sexualhormon E2 zu geben. Eine positive Beeinflussung des Heilungsprozesses von E2 ist aus der Literatur bekannt (KOLIOS et al. 2010, STUERMER et al. 2010). Innerhalb der GEN-Gruppe kam es nach 53 Tagen zu einem temporären Knochenverlust. Die Knochenfläche stieg nach 102 Tagen jedoch wieder auf den anfänglichen Wert vom ersten Obduktionszeitpunkt an. Die EQ-Gruppe zeigte keine derartigen Schwankungen der relativen Spongiosafläche, so wie dies in der E2- und GEN- Gruppe zu beobachten war. Es kam hier zu einem geringen, jedoch stetigen Abfall der relativen Spongiosafläche.

Trabekelanzahl pro Fläche

Die Trabekelanzahl pro Fläche wurde ebenfalls von den einzelnen Gruppen unterschiedlich beeinflusst und war auch hier stark von der Behandlungsdauer abhängig. Nach 46 Tagen zeigten E2 und EQ signifikant höhere Trabekelanzahlen als SF. Die anderen Gruppen wiesen keine signifikanten Unterscheide gegenüber der SF-Gruppe auf. Am Tag 53 waren die Trabekelzahlen von E2 und EQ signifikant kleiner als in der SF-Kontrollgruppe. Die DHT- und GEN-Gruppe waren nach 53 Tagen nicht signifikant gegenüber SF verändert. Nach 102 Tagen unterschied sich keine der Gruppen signifikant von der SF Gruppe.

In unserer Untersuchung konnte der Effekt der Trabekelzunahme unter Androgentherapie gegenüber einer Kontrollgruppe nicht bestätigt werden, wie dies in einer Studie von Koshla 2006 beobachtet wurde (KHOSLA et al. 2006). Die Steigerung der Trabekelanzahl von E2 wurde in unserer Untersuchung nur nach 46 Tagen beobachtet. Äquivalent zu E2 verhielt sich hier das EQ. GEN beeinflusste die Trabekelanzahl nur unwesentlich.

Mittlere Trabekelfläche (Feretdurchmesser) mit minimalem und maximalem Achsendurchmesser

Die Auswertung des mittleren Feretdurchmessers mit dem minimalen und maximalen Achsendurchmesser (als Maß für die mittlere Trabekelfläche) ergab nach 46 Tagen, dass

E2 und EQ eine signifikant kleinere Trabekelfläche aufzeigten als die SF-Gruppe. Die DHT- und GEN-Gruppe unterschieden sich nicht signifikant von SF. Nach 53 Tagen wies das EQ eine signifikant größere Trabekelfläche gegenüber SF auf. DHT, E2 und GEN zeigten hier keine Signifikanz bezüglich eines Unterschiedes auf. Nach 102 Tagen hingegen war es das EQ, was eine signifikant kleiner Trabekelfläche aufwies als SF. Die anderen Gruppen zeigten hier erneut keine signifikanten Unterscheide.
Der mittlere maximale und mittlere minimale Achsendurchmessers sind das Maß für den maximalen und minimalen Trabekeldurchmesser. Sie zeigten äquivalente Verläufe und werden deshalb im Folgenden zusammen beschrieben. Nach 46 Tagen waren die minimalen und maximalen Achsendurchmesser des E2 und des EQ im Mittel signifikant kleiner als die SF-Gruppe. Nach 53 Tagen ließ sich bei EQ und E2 keine Signifikanz erkennen, weder zu kleineren noch zu größeren Werten. Nach 102 Tagen war es sowohl bei der minimalen als auch bei der maximalen Achsenlänge das EQ, welches signifikant kleiner war als die Referenzgruppe SF. Die DHT- und GEN-Gruppe zeigte zu keinem Untersuchungszeitpunkt eine signifikante Abweichung von der Kontrollgruppe SF.

Kompaktheit

Die Kompaktheit, die den Grad der Trabekelverzweigung wiedergibt, zeigte zu keinem Untersuchungszeitpunkt einen Unterschied zwischen einer Testgruppe und der Referenzgruppe SF.

Insgesamt lässt sich anhand der histomorphometrischen Auswertung der Spongiosa festhalten, dass die positiven Effekte der Sexualhormone E2 und DHT wie sie bei weiblichen Tieren beobachtet wurden (STUERMER et al. 2009, STUERMER et al. 2010, VANDENPUT et al. 2002), sich in unserer Arbeit mit männlichen Ratten nicht bestätigen lassen. Jedoch sei angemerkt, dass vor allem E2 durch die Zunahme der relativen Spongiosafläche einen durchaus positiven Effekt auf die Spongiosa nach 53 Tagen hatte. Dies lässt auf ein temporär positives Ansprechen einer zeitlich begrenzten Östrogentherapie schließen. Diese Beobachtung lässt sich auch in der Literatur finden (KOLIOS et al. 2010). Der für GEN in der Literatur als positiv beschriebene Effekt auf die Spongiosa kann von uns nicht bestätigt werden (DEVAREDDY et al. 2006, FANTI et al. 1998). Es sei hier erwähnt, dass diese Arbeitsgruppen ebenfalls mit weiblichen Tieren arbeiteten. Aber auch die Untersuchung an männlichen Mäusen, wie sie von Ishimi durchgeführt wurde, steht unserer Beobachtung entgegen. Dort zeigte sich ein positiver Effekt des GEN auf die Spongiosa (ISHIMI et al. 2002). EQ wird ebenfalls ein

protektiver Einfluss auf die Spongiosa nachgesagt (DEVAREDDY et al. 2006, FILIPOVIC et al. 2010, MATHEY et al. 2007). Diese Feststellung kann in unserer Arbeit nur teilweise bestätigt werden und zeigt das stark zeitabhängige Ansprechen des Phytohormons im Rahmen der Knochenheilung und des Remodellings. Den in der Literatur als größer beschriebenen Einfluss auf die Sponigosa als auf die Kortikalis sahen wir nicht (MATHEY et al. 2007).

Epiphysenfuge

Ein weiteres Augenmerk wurde in dieser Arbeit auf die Epiphysenfuge gelegt. Diese ist beim Knochen für das Längenwachstum verantwortlich. Hier zeigte sich ein deutlicher Einfluss des E2 auf die Breite der Epiphysenfuge. Die Epiphysenfuge war bei E2 zu allen Obduktionszeitpunkten signifikant kleiner als in der SF-Referenzgruppe. Die restlichen Testsubstanzen unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe SF. Somit lässt sich festhalten, dass die Epiphyse nur auf das Hormon E2 reagierte. Dieses Ergebnis ist insofern nicht überraschend, da bereits aus der Literatur der Effekt des durch Östrogen bedingten Epipyhsenschlusses bekannt ist und dass beim weiblichen Geschlecht das Längenwachstum der Epiphyse östrogenabhängig beendet wird (NILSSON und BARON 2005). Denselben Effekt haben Östrogene auch beim männlichen Geschlecht, unabhängig von einer manifesten Osteoporose (VIDAL et al. 2000). Des Weiteren ist aus unserer Arbeit ersichtlich, dass das verwendete Androgen DHT, wie gewünscht, nicht durch enzymatische Umwandlung in Östrogene überführt wurde (WANG und SWERDLOFF 2002). Somit konnte das DHT das Epiphysenwachstum nicht beeinflussen. Die Phytohormone EQ und GEN zeigten ebenfalls keinen Effekt auf die Epiphysenfuge. Sie verhielten sich somit wie die Referenzgruppe SF. EQ und GEN scheinen die Ihnen nachgesagte östrogenartige Wirkung im Bereich der Epiphysenfuge nicht entfalten zu können.

Die in dieser Arbeit verwendeten Hormone scheinen vor allem im Bereich der diaphysären Kortikalis ein positives Ansprechverhalten auf die Defektheilung und das Remodelling zu haben. Positive Effekte beobachtet man im Bereich der Diaphyse stärker als im Bereich der Metaphyse.

Der Heilungsprozess scheint unserer Beobachtung zufolge vor allem im Bereich der diaphysären Kortikalis medikamentös beeinflussbar zu sein. Es ist festzuhalten, dass positive und negative Effekte stark vom jeweiligen Behandlungszeitraum abhängig sind. Die Effekte können stark von Untersuchungszeitpunkt zu Untersuchungszeitpunkt

schwanken. Dies ist bei Betrachtung der Kortikalisdicke von E2 in Abbildung 10 ersichtlich. Für die männliche Osteoporose mit begleitender Defektheilung lässt sich zusammenfassend sagen, dass vor allem das kortikale Knochenwachstum einer medikamentösen Beeinflussung in positiver Hinsicht mit DHT und E2 über längeren Zeitraum zugänglich ist. Die Phytohormone EQ und GEN zeigten hier ebenfalls einen positiven Effekt auf die Kortikalisdicke. Dieser positive Effekt war jedoch nur von begrenzter Dauer und konnte nicht über den kompletten Versuchszeitraum beobachtet werden (vgl. Abbildung 10).

Der spongiöse Knochen wird von den Testsubstanzen unterschiedlich beeinflusst. E2 und EQ sind hier die einzigen Hormone, die einen, wenn auch nur temporären positiven Effekt hervorrufen. DHT und GEN sind hier nicht von therapeutischer Relevanz. In wieweit die in dieser Untersuchung gemachten Beobachtungen auch wirklich die Stabilität des Knochens positiv beeinflussen und somit als klinisch sichtbarer Erfolg gewertet werden können, lässt sich anhand unserer Ergebnisse nicht beurteilen. Es bedarf hier bezüglich der Knochenbelastbarkeit weiterer Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

Wurde die Osteoporose lange Zeit als Erkrankung der Frau angesehen, so zeigten Studien vermehrt die Wichtigkeit weiterer Forschung auf dem Gebiet der männlichen Osteoporose. Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung der Sexualhormone DHT und E2 sowie der Phytohormone GEN und EQ auf das Remodelling des männlichen osteoporotischen sich im Heilungsprozess befindlichen Knochen zu untersuchen.

Hierfür wurden 180 Ratten in fünf Gruppen zu je 36 Tieren eingeteilt, denen im Futter als Verum sojafreies Futter, DHT, E2, GEN oder EQ verabreicht wurden. In jeder Gruppe wurden nach 46, 53 bzw. 102 Tagen jeweils zwölf Tiere geopfert. Nach Orchiektomie mit reaktiver manifester Osteoporose wurde die Trepanation der proximalen Tibia durchgeführt. Mit dem Futtertausch begann die Therapie. Die Tiere wurden zu regelmäßigen Zeitpunkten gewogen. Nach Opferung wurden histologische Präparate angefertigt, nach Goldner gefärbt und nach Digitalisierung ausgewertet. Hierbei wurden die Kortikalisdicke im Bereich der Metaphyse und Diaphyse sowie die Breite der Epiphysenfuge gemessen. Wir bestimmten die relative Spongiosafläche, die Trabekelanzahl pro Fläche, die mittlere Trabekelfläche in Form des Feretdurchmessers sowie den minimalem und den maximalem Achsendurchmesser und die Kompaktheit der Trabekel.

Die SF-, GEN-, EQ- und DHT-Gruppe nahmen stetig an Gewicht zu, wobei die Gewichtszunahme bei der DHT-Gruppe am stärksten ausfiel. In der E2-Gruppe kam es zu einem kontinuierlichen Gewichtsverlust. DHT führte zu einer Dickenzunahme der Diaphyse. Auf die Kortikalisdicke der Metaphyse hatte DHT lediglich anfänglich einen anabolen Effekt. Über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet, führte DHT an der Metaphysenkortikalis jedoch zu einem Dickenverlust. Die Knochenspongiosa wurde von DHT nicht beeinflusst. E2 wirkte ebenfalls im diaphysären Kortikalisbereich einem Knochenverlust entgegen, jedoch nicht im Bereich der Metaphyse. Im Bereich der Metaphyse war nur nach 46 Tagen ein knochenprotektiver Effekt nachweisbar. E2 ließ außerdem nach 46 Tagen eine signifikante Zunahme der Tabekelanzahl pro Fläche gegenüber SF und nach 53 Tagen die größte relative Spongiosafläche aller Gruppen beobachten. E2 hatte folglich im Gegensatz zu DHT, GEN auch einen temporär knochenprotektiven Effekt im Spongiosabereich. Nach 102-tägiger Substanzzufuhr hatte E2 zu stärkerer Knochenapposition im Bereich der Kortikalis der Diaphyse geführt als in der Gruppe von DHT. GEN und EQ führten innerhalb der ersten 46 Tage zu einem

Dickenwachstum sowohl im Bereich der Diaphyse wie auch dem der Metaphyse. Über den kompletten Versuchszeitraum konnte jedoch für GEN und EQ kein Dickenwachstum nachgewiesen werden. EQ führte im Gegensatz zu GEN innerhalb der ersten 46 Tage zu einer Erhöhung der Trabekelanzahl und beeinflusste somit auch die Spongiosa initial positiv. Über den gesamten Behandlungszeitraum betrachtet, wiesen jedoch weder EQ noch GEN ein vermehrtes Knochenwachstum im spongiösen Knochen auf.

Für die Defektheilung bei der männlichen Osteoporose und das Remodelling lässt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zusammenfassend sagen, dass vorwiegend das kortikale Knochenwachstum medikamentös beeinflusst werden kann. DHT und E2 führen über den kompletten Beobachtungszeitraum von 102 Tagen zu einem Knochenwachstum im Bereich der Diaphyse. Die Phytohormone EQ und GEN wiesen in der Kortikalis der Diaphyse ebenfalls Knochenwachstum auf, das jedoch nur von begrenzter Dauer war. Das vermehrte Knochenwachstum konnte bei den Phytohormonen nicht über den kompletten Versuchszeitraum beobachtet werden. Einfluss auf die Epiphysenfugenbreite hatte nur das Sexualhormon E2, das zu einer schmaleren Epiphysenfuge führte. Bei allen anderen Substanzgruppen sowie bei der SF-Gruppe traten keine Veränderungen an der Epiphysenfuge auf. In Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit kann folgende Schlussfolgerung gezogen werden:

1. Phytohormone sind zur kurzfristigen Therapie der Defektheilung bei männlicher Osteoporose geeignet, haben jedoch keinen osteoprotektiven Effekt als Dauertherapeutikum bei der männlichen Osteoporose. Eine Dauertherapie mit Phytohormonen erscheint anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht sinnvoll zu sein. Jedoch wäre eine positive Beeinflussung durch Phytohormone in der initialen Phase der männlichen Osteoporose denkbar.
2. E2 und DHT zeigen vor allem in der Kortikalis der Diaphyse osteoprotektive Effekte, die bei E2 deutlich stärker sind. Als Therapeutikum für die männliche Osteoporose wäre deshalb Testosteron, welches von α-Aromatase in Östrogen umgewandelt wird besser geeignet als DHT.

7. Anhang

7.1 Ergebnistabellen

Tabelle A-1: *Gewichtsentwicklung der Ratten innerhalb der Substanzgruppe zu den einzelnen Untersuchungsterminen (diese Daten wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Wuttke/Wiese zur Verfügung gestellt).*

Gewichtsentwicklung							
	Anzahl (n)	Prä Orchiektomie (in g)	Orchiektomie (in g)	Trepanation (in g)	46. Tag post Trepanation (in g)	53. Tag post Trepanation (in g)	102. Tag post Trepanation (in g)
SF	36	367,8	407,1	436,9	446,1	451,4	461,4
DHT	36	376,9	405,8	435,7	438,9	443,7	482,2
E2	36	375,5	406,9	430,5	389,7	381,8	371,2
GEN	36	377,1	406,9	427,4	431,3	444,5	463,3
EQ	36	374,1	407,1	424,7	440,9	439,8	460,5

Tabelle A-2: *Mittelwerte der Kortikalisdicke im diaphysären Bereich für die verschiedenen Testgruppen nach 46-, 53-, 102-tägiger Applikation, sowie Stichprobenumfang (n) der Messwerte, Standardabweichung (SD), Standardfehler (SE), 95% Konfidenzinterval und Signifikanz (p≤0,05, Varianzanalyse mit ANOVA und Test nach Holm-Sidak).*

Kortikalisdicke im diaphysären Bereich						
Gruppe	Anzahl (n)	Mittelwert in µm	SD in µm	SE in µm	C.I. of Mean (95%) in µm	p≤0,05
Substanzapplikation 46 Tage						
SF	200	569,6	125,6	8,9	17,5	--
DHT	200	645,5	170,4	12,1	23,8	Ja
E2	200	695,8	203,1	14,4	28,3	Ja
GEN	200	701,4	245,8	17,4	34,3	Ja
EQ	200	724,7	219,9	15,6	30,7	Ja
Substanzapplikation 53 Tage						
SF	200	701,5	245,8	17,4	34,3	--
DHT	200	699,7	217,3	15,4	30,3	Nein
E2	200	623,9	160,6	11,4	22,4	Ja
GEN	200	795,3	389,6	27,5	54,3	Ja
EQ	200	656,6	161,7	11,4	22,6	Nein
Substanzapplikation 102 Tage						
SF	200	664,5	155,4	10,9	21,7	--
DHT	240	728,6	295,6	19,1	37,6	Ja
E2	200	776,6	296,5	20,9	41,3	Ja
GEN	200	708,8	188,5	13,3	26,3	Nein
EQ	200	633,2	207,9	14,7	28,9	Nein

Tabelle A-3: *Mittelwerte der Kortikalisdicke im metaphysären Bereich für die verschiedenen Testgruppen nach 46-, 53-, 102-tägiger Applikation sowie Stichprobenumfang (n) der Messwerte, Standardabweichung (SD), Standardfehler (SE), 95% Konfidenzinterval und Signifikanz (p≤0,05, Varianzanalyse mit ANOVA und Test nach Holm-Sidak).*

Kortikalisdicke im metaphysären Bereich						
Gruppe	Anzahl (n)	Mittelwert in µm	SD in µm	SE in µm	C.I. of Mean (95%) in µm	p≤0,05
Substanzapplikation 46 Tage						
SF	200	548,6	129,1	9,1	18,0	--
DHT	200	731,6	334,8	23,7	46,7	Ja
E2	200	613,9	128,8	9,1	17,9	Ja
GEN	200	688,2	308,6	21,8	43,0	Ja
EQ	200	665,4	202,9	14,4	28,3	Ja
Substanzapplikation 53 Tage						
SF	200	725,0	159,9	11,3	22,3	--
DHT	200	618,0	224,0	15,8	31,2	Ja
E2	200	578,2	114,8	8,1	16,0	Ja
GEN	200	675,7	235,2	16,6	32,8	Ja
EQ	200	712,3	175,3	12,3	24,4	Nein
Substanzapplikation 102 Tage						
SF	200	658,7	148,6	10,5	20,7	--
DHT	240	590,9	185,4	11,9	23,5	Ja
E2	200	681,2	313,4	22,2	43,7	Nein
GEN	200	635,6	174,0	12,3	24,3	Nein
EQ	200	624,7	192,9	13,6	26,9	Nein

Tabelle A-4: *Prozentuale Trabekelfläche pro Bildfläche für die verschiedenen Testgruppen nach 46-, 53-, 102-tägiger Applikation sowie Summe aller Trabekel innerhalb einer Gruppe (Summe), Anzahl der Bilder (n), Trabekelfläche pro Bild, prozentuale Anteil der Trabekelfläche bezogen auf die Gesamtfläche eines Bildes von 1430586,3 µm² (1,43mm²).*

Trabekelfläche pro Bildfläche				
Gruppe	Summe µm²	Anzahl Bilder (n)	Fläche/Bild µm²	Spong/mm² %
Substanzapplikation 46 Tage				
SF	5259958,1	20	262997,9	18,1
DHT	4656895,9	20	232844,8	16,1
E2	4010155,8	20	200507,7	13,8
GEN	4918372,9	20	245918,6	17,0
EQ	4836784,2	20	241839,2	16,7
Substanzapplikation 53 Tage				
SF	5606476,1	20	280323,8	19,3
DHT	4284133,4	20	214206,6	14,8
E2	5879267,6	20	293963,3	20,3
GEN	3163816,1	20	158190,8	10,9
EQ	4370822,3	20	218541,1	15,1
Substanzapplikation 102 Tage				
SF	6767345,4	20	338367,2	23,4
DHT	5366452,3	24	223602,1	15,4
E2	4299322,0	20	214966,1	14,8
GEN	4859545,4	20	242977,2	16,8
EQ	3588451,2	20	179422,5	12,4

Tabelle A-5: *Trabekelanzahl n pro 1,43mm² Spongiosafläche für die verschiedenen Testgruppen nach 46-, 53-, 102-tägiger Substanzmittelapplikation. N Anzahl der Flächen, Mittelwert, Standardfehler (SE) und Signifikanz (p≤0,05, Varianzanalyse mit ANOVA und Test nach Holm-Sidak).*

Trabekelanzahl pro Spongiosa Fläche				
Gruppe	N Flächen	Mittelwert	SE	p≤0,05
Substanzapplikation 46 Tage				
SF	20	30,8	2,8	--
DHT	20	29,0	2,8	Nein
E2	20	47,9	3,3	Ja
GEN	20	41,1	4,4	Nein
EQ	20	50,1	4,2	Ja
Substanzapplikation 53 Tage				
SF	20	57,5	8,1	--
DHT	20	40,7	4,9	Nein
E2	20	39,0	4,1	Ja
GEN	20	43,1	4,8	Nein
EQ	20	36,0	3,3	Ja
Substanzapplikation 102 Tage				
SF	20	31,8	2,2	--
DHT	24	30,5	3,2	Nein
E2	20	33,1	4,0	Nein
GEN	20	25,4	2,7	Nein
EQ	20	35,2	7,2	Nein

Tabelle A-6: *Mittelwert des Feretdurchmessers für die verschiedenen Testgruppen nach 46-, 53-, 102-tägiger Applikation sowie Anzahl (n) der Messwerte, Mittelwert und Standardfehler (SE) und Signifikanz (p≤0,05, Varianzanalyse mit ANOVA und Test nach Holm- Sidak).*

Mittelwert Feretdurchmesser				
Gruppe	Anzahl (n)	Mittelwert in µm	SE in µm	p≤0,05
Substanzapplikation 46 Tage				
SF	616	51,5	3,7	--
DHT	581	51,7	3,6	Nein
E2	959	38,3	2,0	Ja
GEN	822	46,9	2,5	Nein
EQ	1002	40,0	2,1	Ja
Substanzapplikation 53 Tage				
SF	1151	37,9	2,0	--
DHT	815	41,5	2,5	Nein
E2	780	44,5	3,1	Nein
GEN	862	35,6	1,9	Nein
EQ	720	48,1	2,7	Ja
Substanzapplikation 102 Tage				
SF	637	54,6	4,1	--
DHT	732	48,9	3,1	Nein
E2	663	46,6	3,0	Nein
GEN	508	61,1	4,1	Nein
EQ	704	33,7	2,8	Ja

Tabelle A-7: *Maximale Achsenlänge für die verschiedenen Testgruppen. Angegeben sind die Werte nach 46-, 53-, 102-tägiger Applikation sowie Stichprobenumfang (n) der Messwerte, Median, Standardfehler (SE) und Signifikanz (p≤0,05, Varianzanalyse mit ANOVA und Test nach Holm-Sidak).*

Maximale Achsenlänge				
Gruppe	Anzahl (n)	Mittelwert in µm	SE in µm	p≤0,05
Substanzapplikation 46 Tage				
SF	616	107,4	8,9	--
DHT	581	99,6	8,0	Nein
E2	959	75,5	4,9	Ja
GEN	822	95,2	6,2	Nein
EQ	1002	81,6	5,3	Ja
Substanzapplikation 53 Tage				
SF	1151	76,4	4,9	--
DHT	815	84,8	6,3	Nein
E2	780	90,8	7,4	Nein
GEN	862	73,0	5,1	Nein
EQ	720	97,2	6,6	Nein
Substanzapplikation 102 Tage				
SF	637	109,6	8,9	--
DHT	732	99,0	7,6	Nein
E2	663	95,9	7,3	Nein
GEN	508	124,5	10,0	Nein
EQ	704	69,1	6,8	Ja

Tabelle A-8: *Minimale Achsenlänge für die verschiedenen Testgruppen. Angegeben sind die Werte nach 46-, 53-, 102-tägiger Applikation sowie Stichprobenumfang (n) der Messwerte, Mittelwert, Standardfehler (SE) und Signifikanz (p≤0,05, Varianzanalyse mit ANOVA und Test nach Holm-Sidak).*

Minimale Achsenlänge				
Gruppe	Anzahl (n)	Mittelwert in µm	SE in µm	p≤0,05
Substanzapplikation 46 Tage				
SF	616	40,6	3,3	--
DHT	581	42,7	3,4	Nein
E2	959	31,8	1,9	Ja
GEN	822	36,4	2,1	Nein
EQ	1002	31,2	1,6	Ja
Substanzapplikation 53 Tage				
SF	1151	32,3	2,0	--
DHT	815	33,8	2,4	Nein
E2	780	38,0	3,4	Nein
GEN	862	28,1	1,7	Nein
EQ	720	39,4	2,5	Nein
Substanzapplikation 102 Tage				
SF	637	48,7	4,9	--
DHT	732	39,2	2,7	Nein
E2	663	37,6	2,7	Nein
GEN	508	46,7	3,4	Nein
EQ	704	29,1	2,9	Ja

Tabelle A-9: *Mittelwert der trabekulären Kompaktheit. Für die verschiedenen Testgruppen nach 46-, 53-, 102-tägiger Applikation sowie Stichprobenumfang (n) der Messwerte, Mittelwert, Standardfehler (SE) und Signifikanz (p≤0,05 Varianzanalyse mit ANOVA und Test nach Holm-Sidak).*

Mittelwert der trabekulären Kompaktheit				
Gruppe	Anzahl (n)	Mittelwert	SE	p≤0,05
Substanzapplikation 46 Tage				
SF	616	89,7	7,1	--
DHT	581	84,2	6,9	Nein
E2	959	70,9	4,1	Nein
GEN	822	83,0	4,6	Nein
EQ	1002	75,5	4,0	Nein
Substanzapplikation 53 Tage				
SF	1151	73,1	3,8	--
DHT	815	84,2	8,5	Nein
E2	780	76,4	6,2	Nein
GEN	862	81,4	4,5	Nein
EQ	720	81,2	4,6	Nein
Substanzapplikation 102 Tage				
SF	637	97,9	8,9	--
DHT	732	81,7	6,0	Nein
E2	663	89,3	6,0	Nein
GEN	508	73,8	4,1	Nein
EQ	704	79,5	8,4	Nein

Tabelle A-10: *Mittelwerte der Breite der Epiphysenfuge. Für die verschiedenen Testgruppen nach 46-, 53-, 102-tägiger Applikation sowie Stichprobenumfang (n) der Messwerte, Standardabweichung (SD), Standardfehler (SE) und Signifikanz (p≤0,05, Varianzanalyse mit ANOVA und Test nach Holm-Sidak).*

Breite der Epiphysenfuge						
Gruppe	Anzahl (n)	Mittelwert in µm	SD in µm	SE in µm	C.I. of Mean (95%) in µm	p≤0,05
Substanzapplikation 46 Tage						
SF	200	221,9	38,1	2,6	5,3	--
DHT	200	229,3	46,4	3,2	6,4	Nein
E2	200	180,7	35,6	2,5	4,9	Ja
GEN	200	230,9	67,8	4,8	9,4	Nein
EQ	200	225,5	52,1	3,6	7,2	Nein
Substanzapplikation 53 Tage						
SF	200	226,9	45,7	3,2	6,3	--
DHT	200	223,1	53,5	3,7	7,4	Nein
E2	200	167,7	29,4	2,1	4,1	Ja
GEN	200	223,2	43,5	3,1	6,1	Nein
EQ	200	230,1	62,1	4,3	8,6	Nein
Substanzapplikation 102 Tage						
SF	200	206,1	37,2	2,6	5,1	--
DHT	240	216,7	54,2	3,4	6,8	Nein
E2	200	165,0	39,4	2,7	5,5	Ja
GEN	200	212,4	48,3	3,4	6,7	Nein
EQ	200	204,5	50,3	3,5	7,0	Nein

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der Wirkung der Testsubstanzen 26
Tabelle A-1: Gewichtsentwicklung der Ratten (Daten freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Wuttke/Wiese zur Verfügung gestellt) 42
Tabelle A-2: Mittelwerte der Kortikalisdicke derDiaphyse 42
Tabelle A-3: Mittelwerte der Kortikalisdicke der Metaphyse 43
Tabelle A-4: Prozentuale Trabekelfläche pro Bildfläche 43
Tabelle A-5: Trabekelanzahl n Spongiosafläche 44
Tabelle A-6: Mittelwert des Feretdurchmessers 44
Tabelle A-7: Maximale Achsenlänge für die verschiedenen Testgruppen 45
Tabelle A-8: Minimale Achsenlänge für die verschiedenen Testgruppen 45
Tabelle A-9: Mittelwert der trabekulären Kompaktheit 46
Tabelle A-10: Mittelwerte der Breite der Epiphysenfuge 46

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Röhrenknochens *3*
Abbildung 2 : Ausschnitt der Substantia compacta eines Röhrenknochens *5*
Abbildung 3: Interaktion zwischen Osteoblast und Osteoklast *7*
Abbildung 4: Darstellung der Spongiosa *9*
Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf vom Zeitpunkt *12*
Abbildung 6: Messungen im Bereich der Diaphyse, Metaphyse und Epiphyse *14*
Abbildung 7: Ausschnitt aus der Sigma Scan Pro Software *15*
Abbildung 8: Übersicht über Ablauf der Untersuchung *16*
Abbildung 9: Grafische Darstellung des Gewichtes *18*
Abbildung 10: Kortikalisdicke der Diaphyse *19*
Abbildung 11: Kortikalisdicke der Metaphyse *20*
Abbildung 12: Darstellung der relativen Spongiosafläche/Markraum *21*
Abbildung 13: Darstellung der Trabekelanzahl pro Fläche *22*
Abbildung 14: Mittelwert des trabekulären Feretdurchmessers *23*
Abbildung 15: Darstellung des Median der maximalen Achsenlänge. *24*
Abbildung 16: Darstellung des Median der minimalen Achsenlänge *24*
Abbildung 17: Mittelwert der Kompaktheit *25*
Abbildung 18: Breite der Epiphysenfugen. *26*
Abbildung 19: Chemische Strukturformel *31*

8. Literaturverzeichnis

Adlercreutz H, Mazur W (1997): Phyto-oestrogens and Western diseases. Ann Med 29, 95-120

Baniwal SK, Shah PK, Shi Y, Haduong JH, Declerck YA, Gabet Y, Frenkel B (2011): Runx2 promotes both osteoblastogenesis and novel osteoclastogenic signals in ST2 mesenchymal progenitor cells. Osteoporos Int 23, 1399-1413

Bitto A, Burnett BP, Polito F, Marini H, Levy RM, Armbruster MA, Minutoli L, Di Stefano V, Irrera N, Antoci S et al. (2008): Effects of genistein aglycone in osteoporotic, ovariectomized rats: a comparison with alendronate, raloxifene and oestradiol. Br J Pharmacol 155, 896-905

Blake GM, Fogelman I (2007): The role of DXA bone density scans in the diagnosis and treatment of osteoporosis. Postgrad Med J 83, 509-517

Bliuc D, Nguyen ND, Milch VE, Nguyen TV, Eisman JA, Center JR (2009): Mortality risk associated with low-trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women. JAMA 301, 513-521

Bohnsack D: Der Effekt von Phyto- und Sexualhormonen auf den osteoporotischen Knochen der männlichen Rattentibia. Aus der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake) im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen 2010

Caufriez A (2007): Hormonal replacement therapy (HRT) in postmenopause: a reappraisal. Ann Endocrinol (Paris) 68, 241-250

Cawthon PM (2011): Gender differences in osteoporosis and fractures. Clin Orthop Relat Res 469, 1900-1905

Coxam V (2008): Phyto-oestrogens and bone health. Proc Nutr Soc 67, 184-195

Cummings SR, Cawthon PM, Ensrud KE, Cauley JA, Fink HA, Orwoll ES (2006): BMD and risk of hip and nonvertebral fractures in older men: a prospective study and comparison with older women. J Bone Miner Res 21, 1550-1556

Devareddy L, Khalil DA, Smith BJ, Lucas EA, Soung do Y, Marlow DD, Arjmandi BH (2006): Soy moderately improves microstructural properties without affecting bone mass in an ovariectomized rat model of osteoporosis. Bone 38, 686-693

Drenckhahn D, Kugler P: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. 1. Band: Anatomie; Urban und Fischer Verlag, München-Jena 2003, 133-149

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997): Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell 89, 747-754

DVO-Leitlinien DO (2009): Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen. www.dv-osteologie.org

Ebeling PR (1998): Osteoporosis in men. New insights into aetiology, pathogenesis, prevention and management. Drugs Aging 13, 421-434

Eghbali-Fatourechi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL (2003): Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. J Clin Invest 111, 1221-1230

Erben RG (2001): Skeletal effects of androgen withdrawal. J Musculoskelet Neuronal Interact 1, 225-233

Estai MA, Suhaimi F, Das S, Shuid AN, Mohamed Z, Soelaiman IN (2011): Expression of TGF-beta1 in the blood during fracture repair in an estrogen-deficient rat model. Clinics (Sao Paulo) 66, 2113-2119

Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, Malluche HH (1998): The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. Osteoporos Int 8, 274-281

Feldstein AC, Nichols G, Orwoll E, Elmer PJ, Smith DH, Herson M, Aickin M (2005): The near absence of osteoporosis treatment in older men with fractures. Osteoporos Int 16, 953-962

Filipovic B, Sosic-Jurjevic B, Ajdzanovic V, Brkic D, Manojlovic-Stojanoski M, Milosevic V, Sekulic M (2010): Daidzein administration positively affects thyroid C cells and bone structure in orchidectomized middle-aged rats. Osteoporos Int 21, 1609-1616

Forsen L, Sogaard AJ, Meyer HE, Edna T, Kopjar B (1999): Survival after hip fracture: short- and long-term excess mortality according to age and gender. Osteoporos Int 10, 73-78

Frankenfeld CL, Atkinson C, Thomas WK, Gonzalez A, Jokela T, Wahala K, Schwartz SM, Li SS, Lampe JW (2005): High concordance of daidzein-metabolizing phenotypes in individuals measured 1 to 3 years apart. Br J Nutr 94, 873-876

Frenkel B, Hong A, Baniwal SK, Coetzee GA, Ohlsson C, Khalid O, Gabet Y (2010): Regulation of adult bone turnover by sex steroids. J Cell Physiol 224, 305-310

Frost HM, Jee WS (1992): On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. Bone Miner 18, 227-236

Fujioka M, Uehara M, Wu J, Adlercreutz H, Suzuki K, Kanazawa K, Takeda K, Yamada K, Ishimi Y (2004): Equol, a metabolite of daidzein, inhibits bone loss in ovariectomized mice. J Nutr 134, 2623-2627

Genazzani AR, Gambacciani M (2006): Effect of climacteric transition and hormone replacement therapy on body weight and body fat distribution. Gynecol Endocrinol 22, 145-150

Gentry RT, Wade GN (1976): Androgenic control of food intake and body weight in male rats. J Comp Physiol Psychol 90, 18-25

Geoffroy V, Kneissel M, Fournier B, Boyde A, Matthias P (2002): High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage. Mol Cell Biol 22, 6222-6233

Gratzel M: Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO Histologie. Berlin Heidelberg New York 2002

Haussler B, Gothe H, Gol D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D (2007): Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. Osteoporos Int 18, 77-84

Hertrampf T, Degen GH, Kaid AA, Laudenbach-Leschowsky U, Seibel J, Di Virgilio AL, Diel P (2006): Combined effects of physical activity, dietary isoflavones and 17beta-estradiol on movement drive, body weight and bone mineral density in ovariectomized female rats. Planta Med 72, 484-487

Hou NN, Zhu YM, Huang HF (2006): [The expression of estrogen receptor alpha and beta in the intervention of different estrogens in rat bone metabolism]. Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao 39, 289-296

Ishimi Y, Yoshida M, Wakimoto S, Wu J, Chiba H, Wang X, Takeda K, Miyaura C (2002): Genistein, a soybean isoflavone, affects bone marrow lymphopoiesis and prevents bone loss in castrated male mice. Bone 31, 180-185

Johnell O, Kanis JA (2006): An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. Osteoporos Int 17, 1726-1733

Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner 15, 175-191

Kalu DN, Salerno E, Liu CC, Echon R, Ray M, Garza-Zapata M, Hollis BW (1991): A comparative study of the actions of tamoxifen, estrogen and progesterone in the ovariectomized rat. Bone Miner 15, 109-123

Khosla S, Riggs BL (2003): Androgens, estrogens, and bone turnover in men. J Clin Endocrinol Metab 88, 2352; author reply 2352-2353

Khosla S, Riggs BL, Atkinson EJ, Oberg AL, McDaniel LJ, Holets M, Peterson JM, Melton LJ, 3rd (2006): Effects of sex and age on bone microstructure at the ultradistal radius: a population-based noninvasive in vivo assessment. J Bone Miner Res 21, 124-131

Kolios L, Sehmisch S, Daub F, Rack T, Tezval M, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Equol but not genistein improves early metaphyseal fracture healing in osteoporotic rats. Planta Med 75, 459-465

Kolios L, Hoerster AK, Sehmisch S, Malcherek MC, Rack T, Tezval M, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2010): Do estrogen and alendronate improve metaphyseal fracture healing when applied as osteoporosis prophylaxis? Calcif Tissue Int 86, 23-32

Kostelac D, Rechkemmer G, Briviba K (2003): Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. J Agric Food Chem 51, 7632-7635

Krum SA, Miranda-Carboni GA, Hauschka PV, Carroll JS, Lane TF, Freedman LP, Brown M (2008): Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival. EMBO J 27, 535-545

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA (1998): Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. Endocrinology 139, 4252-4263

Lambert JK, Zaidi M, Mechanick JI (2011): Male Osteoporosis: Epidemiology and the Pathogenesis of Aging Bones. Curr Osteoporos Rep 9, 229-236

Liu B, Qin L, Wang P (2010): [Research development on relation between equol and soy foods health effect]. Wei Sheng Yan Jiu 39, 784-786

Lydeking-Olsen E, Beck-Jensen JE, Setchell KD, Holm-Jensen T (2004): Soymilk or progesterone for prevention of bone loss--a 2 year randomized, placebo-controlled trial. Eur J Nutr 43, 246-257

MacGillivray MH, Morishima A, Conte F, Grumbach M, Smith EP (1998): Pediatric endocrinology update: an overview. The essential roles of estrogens in pubertal growth, epiphyseal fusion and bone turnover: lessons from mutations in the genes for aromatase and the estrogen receptor. Horm Res 49 Suppl 1, 2-8

Mathey J, Mardon J, Fokialakis N, Puel C, Kati-Coulibaly S, Mitakou S, Bennetau-Pelissero C, Lamothe V, Davicco MJ, Lebecque P et al. (2007): Modulation of soy isoflavones bioavailability and subsequent effects on bone health in ovariectomized rats: the case for equol. Osteoporos Int 18, 671-679

Nilsson O, Baron J (2005): Impact of growth plate senescence on catch-up growth and epiphyseal fusion. Pediatr Nephrol 20, 319-322

Olszynski WP, Shawn Davison K, Adachi JD, Brown JP, Cummings SR, Hanley DA, Harris SP, Hodsman AB, Kendler D, McClung MR et al. (2004): Osteoporosis in men: epidemiology, diagnosis, prevention, and treatment. Clin Ther 26, 15-28

Pfeilstifter J: Übersicht über die Epidemiologie, Diagnostik und Therapie der Osteoporose; in Osteoporose Kompakt; Schattauer Verlag, Stuttgart 2008, 1-19

Pietschmann P, Kudalacek S, Peterlik M (2004): Pathogenese und Therapie der Osteoporose beim Mann. Journal für Mineralstoffwechsel 11, 12-14

Rachon D, Seidlova-Wuttke D, Vortherms T, Wuttke W (2007): Effects of dietary equol administration on ovariectomy induced bone loss in Sprague-Dawley rats. Maturitas 58, 308-315

Rickard DJ, Monroe DG, Ruesink TJ, Khosla S, Riggs BL, Spelsberg TC (2003): Phytoestrogen genistein acts as an estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptors alpha and beta. J Cell Biochem 89, 633-646

Riesco E, Choquette S, Audet M, Tessier D, Dionne IJ (2011): Effect of exercise combined with phytoestrogens on quality of life in postmenopausal women. Climacteric 14, 573-580

Roudebush RE, Magee DE, Benslay DN, Bendele AM, Bryant HU (1993): Effect of weight manipulation on bone loss due to ovariectomy and the protective effects of estrogen in the rat. Calcif Tissue Int 53, 61-64

Santollo J, Eckel LA (2008): Estradiol decreases the orexigenic effect of neuropeptide Y, but not agouti-related protein, in ovariectomized rats. Behav Brain Res 191, 173-177

Seeman E (2001): Unresolved issues in osteoporosis in men. Rev Endocr Metab Disord 2, 45-64

Seeman E (2002): Pathogenesis of bone fragility in women and men. Lancet 359, 1841-1850

Seeman E (2003): Invited Review: Pathogenesis of osteoporosis. J Appl Physiol 95, 2142-2151

Seeman E (2004): Estrogen, androgen, and the pathogenesis of bone fragility in women and men. Curr Osteoporos Rep 2, 90-96

Sehmisch S, Erren M, Kolios L, Tezval M, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2010a): Effects of isoflavones equol and genistein on bone quality in a rat osteopenia model. Phytother Res 24 Suppl 2, 168-174

Sehmisch S, Uffenorde J, Maehlmeyer S, Tezval M, Jarry H, Stuermer KM, Stuermer EK (2010b): Evaluation of bone quality and quantity in osteoporotic mice--the effects of genistein and equol. Phytomedicine 17, 424-430

Solimeo SL (2011): Living with a `women's disease': risk appraisal and management among men with osteoporosis. J Mens health 8, 185-191

Stuermer EK, Sehmisch S, Tezval M, Tezval H, Rack T, Boekhoff J, Wuttke W, Herrmann TR, Seidlova-Wuttke D, Stuermer KM (2009): Effect of testosterone, raloxifene and estrogen replacement on the microstructure and biomechanics of metaphyseal osteoporotic bones in orchiectomized male rats. World J Urol 27, 547-555

Stuermer EK, Sehmisch S, Rack T, Wenda E, Seidlova-Wuttke D, Tezval M, Wuttke W, Frosch KH, Stuermer KM (2010): Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in the early phase of osteoporosis. A new fracture-healing model at the tibia in rat. Langenbecks Arch Surg 395, 163-172

Takano-Yamamoto T, Rodan GA (1990): Direct effects of 17 beta-estradiol on trabecular bone in ovariectomized rats. Proc Natl Acad Sci U S A 87, 2172-2176

Tousen Y, Abe F, Ishida T, Uehara M, Ishimi Y (2011): Resistant starch promotes equol production and inhibits tibial bone loss in ovariectomized mice treated with daidzein. Metabolism 60, 1425-1432

Tramontana J, Benghuzzi H, Tucci M, Tsao A, Hughes J (2001): Morphometric analysis of cortical bone upon the exposure to sustained delivery of anabolic promoting agents using adult male rats as a model. Biomed Sci Instrum 37, 293-298

Vandenput L, Boonen S, Van Herck E, Swinnen JV, Bouillon R, Vanderschueren D (2002): Evidence from the aged orchidectomized male rat model that 17beta-estradiol is a more effective bone-sparing and anabolic agent than 5alpha-dihydrotestosterone. J Bone Miner Res 17, 2080-2086

Vanderschueren D, Van Herck E, Suiker AM, Visser WJ, Schot LP, Bouillon R (1992): Bone and mineral metabolism in aged male rats: short and long term effects of androgen deficiency. Endocrinology 130, 2906-2916

Vidal O, Lindberg MK, Hollberg K, Baylink DJ, Andersson G, Lubahn DB, Mohan S, Gustafsson JA, Ohlsson C (2000): Estrogen receptor specificity in the regulation of skeletal growth and maturation in male mice. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 5474-5479

Wakley GK, Schutte HD, Jr., Hannon KS, Turner RT (1991): Androgen treatment prevents loss of cancellous bone in the orchidectomized rat. J Bone Miner Res 6, 325-330

Wang C, Swerdloff RS (2002): Should the nonaromatizable androgen dihydrotestosterone be considered as an alternative to testosterone in the treatment of the andropause? J Clin Endocrinol Metab 87, 1462-1466

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

Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA (1985): Skeletal alterations in ovariectomized rats. Calcif Tissue Int 37, 324-328

Wu J, Oka J, Ezaki J, Ohtomo T, Ueno T, Uchiyama S, Toda T, Uehara M, Ishimi Y (2007): Possible role of equol status in the effects of isoflavone on bone and fat mass in postmenopausal Japanese women: a double-blind, randomized, controlled trial. Menopause 14, 866-874

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Wiese möchte ich mich für die Überlassung des Themas der Arbeit, für die Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft bedanken. Bei Frau A. Ahrbecker und Frau C. Schäfer für die technische Hilfe bei der Anfertigung der histologischen Präparate sowie deren Färbung. Ebenfalls danke ich Frau PD Dr. Dana Seidlová-Wuttke für Ihre Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.

Lebenslauf

Am 24.05.1982 wurde ich, Philipp Kauffmann, in Hünfeld geboren. Nach dem Besuch der Grundschule Paul-Gerhard in Hünfeld von 1989 bis 1993 wechselte ich an das Wigbert-Gymnasium Hünfeld, wo ich im Jahr 2002 die Allgemeine Hochschulreife erlangte. Zum Wintersemester 2002 immatrikulierte ich mich für das Fach Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Nach der Ärztlichen Vorprüfung im Jahr 2004 und dem Klinischen Abschnitt des Studiums war ich im Praktischen Jahr in Göttingen und Alicante (Spanien) tätig. Am 16. Dezember 2008 legte ich das Staatsexamen ab. Im Jahr 2009 folgte die Verteidigung meiner medizinischen Dissertation mit dem Thema „Digitale Mammografie in Speicherfolientechnik unter Berücksichtigung großer Mammae“ und die Erlangung des Doktorgrades der Medizin im September 2009. Im April 2009 begann ich die Facharztausbildung im Fach Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie an der Universitätsklinik Göttingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Schliephake. Ich immatrikulierte mich im August 2009 für das Fach Zahnmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen.