

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

Thema

**Der Einfluss von Sexual- und Phytohormonen sowie
Ganz-Körper-Vibration auf die Wundheilung des osteoporotischen
Knochens der männlichen Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnmedizin

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Johannes Pál Szentmiklóssy von Primócz

aus

Hannover

Göttingen 2013

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

I. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. K. G. Wiese

II. Berichtstatter: PD Dr. med. M. Tezval

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	3
2.1	<i>Knochen</i>	3
2.2	<i>Osteoporose.....</i>	6
2.3	<i>Steroidhormone.....</i>	8
2.4	<i>Phytohormone.....</i>	9
3	Material und Methoden	12
3.1	<i>Versuchstiere und ihre Haltung.....</i>	12
3.2	<i>Versuchsablauf.....</i>	13
3.3	<i>Orchiektomie.....</i>	14
3.4	<i>Trepanation</i>	15
3.5	<i>Vibrationstherapie.....</i>	16
3.6	<i>Herstellung der histologischen Goldner-Präparate der Tibia</i>	16
3.7	<i>Herstellung der Bilder und ihre Auswertung.....</i>	17
3.8	<i>Statistische Methodik</i>	20
4	Ergebnisse	21
4.1	<i>Hormonwirkung auf die Morphologie der Kortikalis</i>	22
4.2	<i>Effekte auf die Spongiosa.....</i>	24
4.3	<i>Effekte auf die Epiphysenfuge.....</i>	29
4.4	<i>Effekte auf den tibialen Gelenkknorpel.....</i>	30
5	Diskussion	34
5.1	<i>Wirkung der GKV auf den Knochen der orx Ratte</i>	34
5.2	<i>Knochenentwicklung in der sojafreien Gruppe</i>	35
5.3	<i>Wirkung der Steroidhormone DHT und E2 auf den Knochen</i>	36
5.4	<i>Wirkung der Phytohormone GEN und EQ auf den Knochen</i>	42
5.5	<i>Wirkung der Hormone auf die Epiphysenfuge der orx Ratte.....</i>	48
5.6	<i>Wirkung der Hormone auf den tibialen Gelenkknorpel.....</i>	50
6	Zusammenfassung	52
7	Anhang	54
8	Literaturverzeichnis.....	61

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AR	Androgenrezeptor
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
BMD	<i>bone mineral density</i> , Knochendichte
BEST	<i>Bone Evaluation Study</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCD-Kamera	<i>charge coupled device</i> -Kamera
d	<i>day</i> , Tag
DHT	Dihydrotestosteron
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DVO	Dachverband Osteologie
E2	Östradiolbenzoat, 17 β -Östradiol
ER α	Östrogenrezeptor α
ER β	Östrogenrezeptor β
et al.	<i>et alii</i> , und andere
EQ	Equol
Fa.	Firma
GEN	Genistein
GH	<i>growth hormone</i> , Wachstumshormon
GKV	Ganz-Körper-Vibration
GnRH	gonadotropin releasing hormon
h	<i>hour</i> , Stunde
HRT	<i>hormon replacement therapy</i> , Hormonersatztherapie
Hz	Hertz
IE	Internationale Einheit
KG	Kontrollgruppe
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Mol
Min.	Minute
n	Anzahl, Stichprobenumfang
Orx bzw. orx	Orchiektomie bzw. orchiektomiert
Ovx bzw. ovx	Ovariektomie bzw. ovariektomiert
p	Signifikanzniveau
pQCT	periphere quantitative Computertomographie
25 % Pz	25 % Perzentil
75 % Pz	75 % Perzentil
QCT	quantitative Computertomographie
SD bzw. Std Dev	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SD-Ratte	Sprague-Dawley-Ratten

SEM	<i>standard error of the mean</i> , mittlere Standardabweichung
SERM	selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren
SF	sojafrei
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
vibr.	vibriert
vs.	<i>versus</i> , im Gegensatz zu
WHI	<i>women 's health initiative</i> , Frauengesundheitsinitiative
WHO	<i>world health organization</i> , Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

Osteoporose bedeutet „poröser Knochen“ und leitet sich aus dem Griechischen ab. Dabei steht „osteon“ für Knochen und „poros“ für Pore. Nach der *World Health Organization* (WHO) ist die Osteoporose eine der 10 wichtigsten Volkskrankheiten. Im Jahre 2009 waren laut der BEST-Studie 14 % der über 50-jährigen Deutschen an Osteoporose erkrankt. Zu diesem Zeitpunkt lag die Geschlechterverteilung bei 24 % Frauen und 6 % Männer. Die Zahl der Neuerkrankungen wird in Deutschland auf 885.000 Menschen jährlich geschätzt (Hadji et al. 2013).

Bisher galt die Osteoporose als eine Erkrankung der Frau. Für den Mann ist die Osteoporose deutlich weniger erforscht, sodass Diagnostik und Therapie im Wesentlichen von den evidenzbasierten Erkenntnissen der weiblichen Osteoporose übernommen wurden. Mit steigender Lebenserwartung rückt auch die Osteoporose des Mannes stärker in den Vordergrund (Luger 2007). Mögliche Folgen dieser Erkrankung stellen Radius-, Becken-, Wirbelkörper- und Schenkelhalsfrakturen dar. Insbesondere bei Männern geht die Schenkelhalsfraktur mit einer deutlich höheren Folgemortalität einher (Van der Klift 2002, Center et al. 1999).

Für den physiologischen Knochenstoffwechsel spielen die Sexualhormone Östradiol (E2) und Testosteron bzw. Dihydrotestosteron (DHT) eine entscheidende Rolle. Dabei geht DHT durch eine Reduzierung mittels 5 α -Reduktase aus Testosteron hervor. Der große Einfluss auf den Knochenstoffwechsel begründet den therapeutischen Einsatz der Sexualhormone. Allerdings wird die klassische Hormonersatztherapie der weiblichen Osteoporose mit Östradiol zunehmend kritisch hinterfragt. Denn als Nebenwirkungen treten Thrombosen, Herzinfarkte, Brust- und Gebärmutterkrebs auf (Carlson et al. 2008, Saunier et al. 2011). Ebenso stimuliert die exogene Gabe von Testosteron beim Mann die Proliferation der Prostata, welche mit einem Risiko der malignen Entartung einhergeht (Seidlová-Wuttke et al. 2005). Deshalb rücken pflanzliche Hormonersatzstoffe wie Genistein (GEN) und Equol (EQ) als alternative Therapiemaßnahmen für den Knochendichteverlust verstärkt in den Fokus (Sehmisch et al. 2010). Deren knochenprotektive Wirkungen wurden bereits in Studien an orchiektomierten (orx) und ovariectomierten (ovx) Tieren

sowie bei post- und prämenopausalen Frauen erforscht (Ishimi et al. 2002, Mathey et al. 2007, Marini et al. 2007, Kwak et al. 2009, Xu et al. 2009). Die Nebenwirkungen sollen für die Phytohormonapplikation geringer sein als für die der Sexualhormone (Travis et al. 2009, Xu et al. 2009).

Neben der Hormonwirkung spielt auch die mechanische Belastung für den Knochenstoffwechsel eine wesentliche Rolle. Diese kann in Form einer Ganz-Körper-Vibration (GKV) ausgeübt werden (Totosy de Zepetnek et al. 2009). In der Literatur konnte der GKV bereits eine Verbesserung der knöchernen Parameter bei Menschen und Nagern zugeschrieben werden (Prisby et al. 2008, Wenger et al. 2010). Ebenso führten die verwendeten Testsubstanzen in Kombination mit der GKV zu protektiven Wirkungen auf den osteoporotischen Knochen (Hertrampf et al. 2007, Papenberg 2011, Wu 2003).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Auswirkungen der Hormongabe von DHT, E2, GEN und EQ in Kombination mit der GKV auf die defekte Tibia der orx Ratte darzustellen, um daraus Erkenntnisse zur Therapiemöglichkeiten beim Mann zu gewinnen. Insbesondere soll die Auswirkung auf die Kortikalisdicke, die Qualität und Quantität der Spongiosastruktur, die Dicke der Epiphysenfuge und die Knorpeldicke geklärt werden.

2 Grundlagen

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit verschiedenen Ansätzen, um Therapiemöglichkeiten der Osteoporose beim Mann zu entwickeln. Hierzu sind Grundkenntnisse der Knochenhistologie sowie einiger Sexualhormone und Hormonersatzstoffe von Bedeutung, die im Folgenden kurz erläutert werden.

2.1 Knochen

Das menschliche Skelett besteht aus etwa 220 einzelnen Knochen und nimmt ungefähr 15 % des Körpergewichts ein. Es hat Stütz-, Fortbewegungs- und Mineraldepotfunktion, hämatopoetische Funktion und schützt die in ihm liegenden Organe.

Während des Wachstums entsteht Knochen durch Mineralisation von Knorpelgewebe. Dies kann in Form von enchondraler und perichondraler Ossifikation geschehen. Im Erwachsenenalter wird Knochen nur noch dort zusätzlich gebildet, wo er durch mechanische Beanspruchung gedehnt und deformiert wird.

Die Epiphysenfuge befindet sich zwischen der Epiphyse (Endstück) und der Diaphyse (Mittelstück) der Röhrenknochen. Sie besteht aus hyalinem Knorpel und ist der Ort des Längenwachstums der Röhrenknochen. Das Wachstum wird durch Proliferation von Chondroblasten in der Epiphysenfuge verursacht. Die Chondroblasten werden zusammen mit ihrer extrazellulären Matrix fortwährend von der Epiphyse und der Diaphyse aus durch Knochengewebe ersetzt (Zanner et al. 2002). Dieser Vorgang wird als enchondrale Ossifikation bezeichnet. Bis zum kompletten Verknöchern der Epiphysenfugen mit Hormonumstellung während der Pubertät befindet sich der Mensch im Wachstum.

Die Tibia, die in diesem Versuch untersucht wird, ist ein Röhrenknochen. Sie hat einen verdichteten Knochenmantel, die Kompakta, und im Inneren ein schwammartiges Knochenetz, die Spongiosa (Abb. 1). Zwischen den Spongiosatrabekeln befindet sich das Knochenmark, welches blutbildende Zellen beinhaltet. Die Spongiosatrabekel sind so ausgerichtet, dass sie in Abhängigkeit von der mechanischen Beanspruchung des Knochens Zug- und Drucktrajektorien ausbilden, welche zur Stabilität des Knochens beitragen

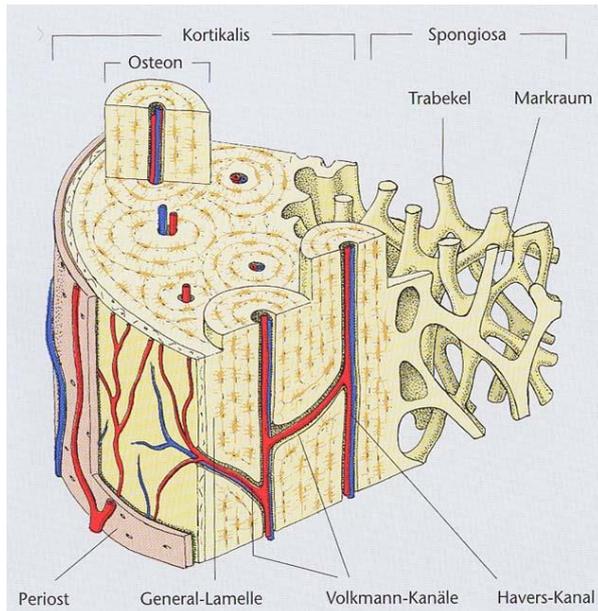


Abb. 1: Knochenaufbau eines Röhrenknochens schematisch dargestellt: Osteone und Schaltlamellen bilden die äußere Kortikalis, die von der Generallamelle und dem Periost umgeben wird. Im Inneren des Knochens befindet sich die Spongiosa, die aus Trabekeln aufgebaut ist (Quelle: www.biofachforum.ch, 2010).

(Niethard et al. 2009). Dabei ist die Kompakta im Bereich der Diaphyse am stärksten und läuft zur Epiphyse hin dünner aus. Die Knochenoberfläche ist von einer faserigen Bindegewebsschicht überzogen, die außen als Periost und innen als Endost bezeichnet wird. Diese Knochenhaut führt Fasern und Gefäße für die nervale und vaskuläre Versorgung des Knochens. Das Periost dient zusätzlich als Anheftungsstelle für Sehnen und Bänder. Auf den Epiphysen befindet sich Gelenkknorpel aus Faserknorpel. Zusammen mit der Synovia

verringert er die Scherkräfte bei Gelenkbewegung.

Während des Wachstums muss der Knochen ständig umgebaut werden, damit er seine definitive Form erhält (Lüllmann-Rauch 2009). Auch nach Abschluss des Wachstums findet ein ständiger Umbauprozess statt, um den durch Mineralverlust und Matrixalterung in seiner Festigkeit und Elastizität geschwächten Knochen zu ersetzen und Mikroschäden zu reparieren. Dieses *Remodelling* dient auch dazu, die Materialmenge der Kompakta und die Spongiosa-Architektur den Veränderungen der mechanischen Beanspruchung anzupassen. Zur Folge werden etwa 4 bis 10 % des Skelettknochens pro Jahr erneuert (Lüllmann-Rauch 2009). Dieser *Turnover* besteht aus Knochenab- und Knochenaufbau und wird als *Remodelling* bezeichnet. In den ersten drei Lebensdekaden überwiegt der Aufbau, danach der Abbau (Bartl 2008). Ein neuer Knochenanteil entsteht vorerst als Geflechtknochen, der dann in Lamellenknochen umgebaut wird. In der Kortikalis legen sich die Lamellen um einen Havers-Kanal, in dem ein Havers-Gefäß läuft. Diese Gefäße werden von anderen Gefäßen gespeist, die sich zentrifugal vom Markraum zum Periost hin erstrecken. Die Havers-Kanäle sind über Volkman-Kanäle miteinander querverbunden. 5 bis

20 der Knochenlamellen, die konzentrisch um einen Havers-Kanal geschichtet sind, ergeben ein Osteon. Die Osteone verlaufen annähernd longitudinal zur Kortikalis. Zwischen den Osteonen liegen Schaltlamellen, die Reste von abgebauten Osteonen darstellen. Im äußersten Bereich der Kompakta sind die Lamellen nicht in Osteone organisiert, sondern bilden eine äußere Generallamelle, die kontinuierlich die ganze Zirkumferenz des Knochens einnimmt. In der Spongiosa sind die Lamellen überwiegend parallel zur Trabekeloberfläche, also eher flächig angeordnet. Sie führen keine Gefäße, sondern werden von dem sie umgebenden Markraum durch Diffusion versorgt (Lüllmann-Rauch 2009).

An dem Knochenumbau sind zahlreiche Zellen beteiligt. Die Osteoklasten bauen die Knochensubstanz ab. Diese mehrkernigen Riesenzellen leiten sich von Monozyten des Knochenmarks ab und gehören somit zum mononukleären Phagozytosesystem (MPS). Ihre Rekrutierung, Differenzierung und Aktivierung wird durch zahlreiche Hormone (u.a. Östrogene) und Wachstumsfaktoren gesteuert. Östrogene unterdrücken vor allem die Rekrutierung der Osteoklasten, welche die Knochensubstanz abbauen. Osteoblasten sind mesenchymale, knochenaufbauende Zellen. Dabei synthetisieren sie zuerst den organischen Anteil der extrazellulären Matrix, das Osteoid, und steuern danach die Mineralisation der Matrix. Osteoblasten haben Östrogenrezeptoren. Sie werden von vielen weiteren Hormonen und Zytokinen gesteuert. Etwa jeder zehnte auf der Knochenoberfläche liegende Osteoblast wird in das neu gebildete Knochengewebe eingebaut und entwickelt sich somit zu einem Osteozyten. In Lakunen liegend sind sie über *Canaliculi* miteinander verbunden. Sie versorgen den Knochen mit organischen und anorganischen Stoffen und sind an der funktionellen Adaptation des Knochens als mechanosensorische Zellen beteiligt (Bartl 2008).

Im Alter verändert sich der Knochen dahingehend, dass durch endostale *Resorption* und periostale *Apposition* der Knochenquerschnitt zunimmt. Die Kortikalis wird dadurch dünner. Bei Männern ist die periostale *Apposition* größer als bei Frauen. Dies ist unter anderem ein Grund, warum Frauen im Alter schneller an Knochenmasse verlieren als Männer (Duan et al. 2001, Riggs et al. 2004).

2.2 Osteoporose

Gemäß Definition handelt es sich bei der Osteoporose um eine Skeletterkrankung mit Verminderung der Knochenmasse und -mikroarchitektur sowie erhöhter Frakturanfälligkeit (Pschyrembel 2007). Unterteilt wird sie in die primäre und die sekundäre Osteoporose. Dabei fallen 95 % des Krankheitsbildes auf die primäre Osteoporose zurück. Nach ihrer Ursache wird diese in die postmenopausale (Typ I), die senile (Typ II) und die idiopatische Osteoporose unterschieden. Die postmenopausale Osteoporose tritt zumeist bei Frauen im Lebensalter zwischen 50 und 75 Jahren auf Grund von Östrogenmangel auf (Bartl 2008). Besonders betroffen ist bei dieser Form der Knochenabbau der Spongiosa (4 bis 8 %/Jahr für ca. 5-8 Jahre nach Menopause), weniger der Abbau der Kortikalis (2 bis 3 %/Jahr) (Niethard et al. 2009). Hingegen zeichnet sich die senile Osteoporose durch einen Verlust des trabekulären und des kortikalen Knochens aus. Die senile Osteoporose tritt bei Frauen doppelt so häufig auf wie bei Männern (Herold 2011). Dieser pathologische Knochenverlust lagert sich dem natürlichen Knochenverlust eines jeden Menschen auf. Dieser sukzessive, altersabhängige Knochenabbau beginnt mit dem 40. Lebensjahr und beträgt bei der Frau 35 bis 40 % des kortikalen Knochens und 55 bis 60 % der Spongiosa. Beim Mann sind es nur etwa zwei Drittel dieser Mengen (Niethard et al. 2009).

Der sekundären Osteoporose liegt eine andere Erkrankung zu Grunde (Tab. 1). Ein der Menopause der Frau entsprechendes Syndrom mit einem

Tab. 1: Ursachen für die sekundäre Osteoporose beim Mann (Luger 2007)

1. **Endokrine Ursachen:** Hypogonadismus, Cushing-Syndrom, Hyperthyreose, Hyperparathyreoidismus
2. **Medikamentös verursacht:** Glukokortikoidtherapie, Androgendeprivation, Chemotherapie, Antikoagulantien, Antikonvulsiva
3. **Gastrointestinale Ursachen:** Malabsorptionssyndrom, Leberzirrhose
4. **Systemische Erkrankungen:** chronische Polyarthritits, multiples Myelom, Mastozytose

Androgendefizit konnte beim Mann bisher nicht schlüssig nachgewiesen werden. Dass aber ein Androgenmangel beim Mann, ebenso wie der Östrogenmangel bei der Frau, einen Knochenverlust induziert, ist bereits erforscht (Vanderschueren et al. 2004). Bei Männern spielt die Erkrankung

der sekundären Osteoporose eine wichtigere Rolle (45 %) als bei Frauen (10 %) (Bartl 2008, Kudlacek 2008).

Die Folgen der Osteoporose sind in erster Linie Frakturen. Sie sind vornehmlich in den Wirbelkörpern und dem Oberschenkelhals lokalisiert. Interessant ist an dieser Stelle, dass die Oberschenkelhalsfraktur bei Männern eine deutlich höhere Folgemortalität nach sich zieht als bei Frauen (Center et al. 1999, Van der Klift 2002). Zusätzlich brechen die Knochen bei Männern bereits bei höheren Knochendichtewerten als bei Frauen (Haney und Blizotes 2008).

Diagnostiziert wird die Osteoporose durch die Osteometrie (Knochendichtemessung). Als einheitlicher Messbefund wurde der *T-Score* eingeführt. Diese einheitslose Zahl gibt die Abweichung (*SD, standard deviation*) vom Mittelwert der Knochendichte (*BMD, bone mineral density*) eines Referenzkollektivs gesunder 30-jähriger Patienten. Eine manifeste Osteoporose liegt ab einer Standardabweichung von 2,5 unter dem durchschnittlichen BMD der gleichgeschlechtlichen Referenzgruppe vor (WHO 1994). Eine Abweichung von 1 bis 2,5 beschreibt hingegen eine Osteopenie. Niedrige BMD-Werte gehen bei beiden Geschlechtern mit einem erhöhten Frakturrisiko einher (Cummings et al. 2006).

Als generelle Therapie gilt der Muskelaufbau, Koordinationstraining und die Substitution von Vitamin D₃, Vitamin B₁₂ und Kalzium. Nach individueller Abwägung (Ausmaß der Knochendichterniedrigung, Geschlecht, Lebensalter und weitere Risikofaktoren) können noch andere Medikamente zum Einsatz kommen. Hierzu zählen osteoanabole Substanzen (z.B. Parathormon, Strontiumranelat) und antiresorptive Substanzen wie Östrogene und Bisphosphonate (Bartl 2008, DVO-Leitlinien 2009). Bei der Therapie mit Parathormon konnten in Abhängigkeit von Applikationsmodus, Anwendungsdauer und verabreichter Dosis entweder katabole oder anabole Wirkungen festgestellt werden, wodurch die Knochendichte zugenommen hat (Orwoll et al. 2003, Kurland et al. 2000).

Die Hormonersatztherapie (HRT) mit Östrogenen ist nur bei Frauen anerkannt. Die Östrogene senken bei Frauen zwar das Risiko von Frakturen, jedoch steigt das Risiko, an kardiovaskulären Erkrankungen und Brustkrebs zu erkranken (Rassouw et al. 2002). Unter der Behandlung mit Bisphosphonaten wurde ein signifikanter Anstieg der Knochendichte

beobachtet (Orwoll et al. 2000, Ringe et al. 2001). Bisphosphonate reduzieren den Knochenstoffwechsel, führen hierdurch allerdings auch häufig zu Nebenwirkungen wie zum Beispiel Kiefernekrosen (Brozoski et al. 2012).

2.3 Steroidhormone

Steroidhormone leiten sich vom Cholesterin ab und sind daher lipophil. Aus diesem Grund können sie die Zellmembran ohne *Second Messenger* passieren und direkt in die Zelle gelangen, wo sie, gebunden an einen Rezeptor, auf die DNA wirken können. In der Blutbahn sind Steroidhormone an Proteine gebunden. Ihre Biosynthese wird vom Hypothalamus-Hypophysen-System durch positive und negative Rückkopplung reguliert. In der Leber werden sie durch Glukuronidierung oder Sulfatierung inaktiviert und über die Niere und den Darm ausgeschieden (Cheng et al. 1998, Pschyrembel 2007).

Das Androgen Dihydrotestosteron stellt eine umgewandelte, aktivere Form des Testosterons dar. Testosteron wird bei Männern und Frauen in der Nebennierenrinde und den Gonaden synthetisiert. Das Gonadotropin luteinisierendes Hormon (LH) des Hypophysenvorderlappens ist für die Stimulation der Testosteronsekretion verantwortlich, welche beim Mann zu 95% in den Leydig-Zwischenzellen der Hoden geschieht. Die Sekretion des LH wiederum wird durch das *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) aus dem Hypothalamus und die negative Rückkopplung des Testosterons reguliert (Janssens und Vanderschueren 2000). In den Zielzellen wird Testosteron zum Großteil durch das Enzym 5 α -Reduktase zu dem biologisch aktiveren DHT umgewandelt. Beide Steroide aktivieren den Androgenrezeptor (AR), der ubiquitär im Organismus beider Geschlechter vorkommt. Testosteron kann im Gegensatz zu DHT durch die Aromatase in Östradiol umgewandelt werden. Um in Tierversuchen die reine Testosteronwirkung auf den Organismus untersuchen zu können, kann DHT als Futterzusatz verwendet werden. Androgene stimulieren die Entwicklung der Geschlechtsorgane und der akzessorischen Drüsen beim Mann. Testosteron bzw. DHT bewirkt die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale und des typischen männlichen Körperbaus. Zusammen mit Östrogenen regulieren

sie das Skelettwachstum (Rassow et al. 2008). DHT stimuliert das Längen- und Dickenwachstum des kortikalen Knochens und ist somit auch für das radiale Wachstum verantwortlich, was bis jetzt nur an Ratten festgestellt, aber auch für den Menschen vermutet wird. Bekannterweise induziert ein Androgenmangel beim Mann, ähnlich dem Östrogenmangel bei der Frau, einen Spongiosaverlust (Vanderschueren et al. 2004).

Östrogene sind die wichtigsten weiblichen Sexualhormone aus der Klasse der Steroidhormone. Sie werden hauptsächlich in den Follikeln und Gelbkörpern der Ovarien und zu einem geringeren Teil in der Nebennierenrinde produziert. Während der Schwangerschaft findet die Synthese der Östrogene zusätzlich in der Plazenta statt. Auch Männer produzieren in den Testes kleine Mengen an Östrogenen. Außerdem wird ein gewisser Teil des Testosterons in anderen Organen (Muskel, Fettgewebe und Nerven) durch die Aromatase in Östrogene umgewandelt. Bei der Frau beeinflusst es die Bildung und Entwicklung der Geschlechtsorgane und -merkmale. Zusammen mit Testosteron reguliert es bei beiden Geschlechtern das Skelettwachstum. Die wichtigsten Östrogene sind Östradiol, Östratriol und Östron. Alle entstehen durch die Aromatase-Reaktion aus Androgenen (Rassow et al. 2008). In diesem Versuch wird 17beta-Östradiol (E2) als Hormonsubstituent verwendet. Östrogene vermitteln ihre Wirkung über die Östrogenrezeptoren α (ER α) und β (ER β). Für den Knochenumbau bei Männern spielt im Gegensatz zu Frauen besonders der ER α eine Rolle (Sims et al. 2002). E2 wirkt physiologisch auf den Knochen, indem es den Epiphysenschluss fördert (Perry et al. 2008) und die Biosynthese von Osteoklasten aktivierender Interleukine hemmt und hierdurch der osteoklastären Knochenresorption entgegenwirkt. Eine Verminderung des Östrogenspiegels im Blut kann somit zu Osteoporose führen (Rassow et al. 2008).

2.4 Phytohormone

Chemisch betrachtet gehören Phytohormone zur Gruppe der Polyphenole und sind den Isoflavonen, den Lignanen und den Coumestanen zuzuordnen. Durch die dem Östradiol ähnliche Struktur aller drei Stoffklassen können sie mit den Östrogenrezeptoren interagieren. Je nach der individuellen Menge

zirkulierender endogener Östrogene sowie Anzahl und Typ der Östrogenrezeptoren können sie östrogene und antiöstrogene Wirkungen ausüben (Wolters und Hahn 2004). Ihre östrogene Wirkung ist allerdings um den Faktor 100 bis 10000 geringer als die des Östradiols selbst (Kulling und Watzl 2003, Otto 2000). Wichtig ist an dieser Stelle, dass die Phytohormone lokal unterschiedlich zu wirken scheinen. Aus diesem Grund werden sie weiter erforscht, in der Hoffnung, dass sie die positiven Eigenschaften der Östrogene ausüben, ohne kanzerogene Nebenwirkungen wie Brustkrebs zu vermitteln (Shu et al. 2001, Wolters und Hahn 2004). Hauptnahrungsquelle für Isoflavone ist die Sojabohne, die zwischen 30 und 92 mg GEN und 20 bis 52 mg Daidzein pro 100 g Sojabohne aufweist (Kulling und Watzl 2003). Die geringere Erkrankungsinzidenz von beispielsweise Brust-, Darm- und Prostatakrebs und Osteoporose in den asiatischen Ländern auf Grund der stärkeren Ernährung mit Sojaprodukten wird vielfach diskutiert (Adlercreutz und Mazur 1997, Bingham et al. 1998). Gleichzeitig sind die positiven und negativen Eigenschaften der Isoflavone noch umstritten (Wuttke et al. 2003), wobei ihnen aber in zahlreichen Publikationen eine knochenprotektive Wirkung zugeschrieben wird (Lee et al. 2004, Khalil et al. 2005, Seidlová-Wuttke et al. 2008, Sugiyama et al. 2006, Wuttke et al. 2003, 2007).

Für Genistein konnte eine östrogene Wirkung auf den menschlichen und tierischen Organismus festgestellt werden (Sargeant et al. 1993). In einigen Studien wurde eine Beeinflussung des Knochenstoffwechsels durch GEN gezeigt (Ishimi et al. 2002, Piekarczyk und Ward 2007, Sehmisch et al. 2010). Bei postmenopausalen Frauen konnte nach zweijähriger GEN-Gabe eine positive Auswirkung auf die Knochendichte und ein erhöhter Knochenstoffwechsel beobachtet werden (Marini et al. 2007). In weiteren Studien konnte durch GEN-Zuführung bei ovx Ratten eine Reduzierung der Abnahme von trabekulärem und kompaktem Knochen und eine Zunahme der Osteoblastenzahl hervorgerufen werden (Fanti et al. 1998, Pan et al. 2005). Die knochenprotektive Wirkung von GEN manifestiert sich neben weiblichen Ratten auch an männlichen Nagern. Der Knochendichterückgang von orx Mäusen konnte durch die Behandlung sowohl mit GEN als auch mit E2 in erheblichem Maße verhindert werden (Ishimi et al. 2002). Daneben werden positive Effekte von GEN besonders im Zusammenhang mit körperlicher

Bewegung beschrieben (Wu et al. 2003). Genistein hat eine 20-fach höhere Bindungsaffinität zu ER β als zu ER α (Kuiper et al. 1998). Verglichen mit 17 β -Estradiol entspricht das einer Bindungsaffinität von 4 % zum ER α und 87 % zu dem ER β .

Equol (EQ) ist das Endprodukt der Biotransformation des Isoflavons Daidzein. Nicht jeder Mensch besitzt die nötigen intestinalen Bakterien für diese Metabolisierung (Jackson et al. 2011, Jin et al. 2008, Maruo et al. 2008, Setchell et al. 2002). Es wird angenommen, dass nur 30 bis 50 % der Menschen die entsprechende Darmflora besitzen (Decroos et al. 2005, Lampe 2009). Es gibt zwei Enantiomere von Equol: S-equol und R-equol. S-equol hat, vergleichbar mit GEN, eine hohe Bindungsaffinität, vor allem zum ER β . Die Bindungsaffinität von R-equol ist schwach und bevorzugt am ER α zu finden (Muthyala et al. 2004). Die Bindungsaffinität ist insgesamt höher als die seines Vorläufers Daidzein (Weaver und Legette 2010). In diesem Versuch wurde das S-equol verwendet. In der Literatur sind die vergleichbaren Studien bevorzugt mit Daidzein als Testsubstanz zu finden. Ishimi (2010) beschreibt in seiner Arbeit die hemmende Wirkung von EQ auf Knochenschwund und Fetteinlagerung bei weiblichen, osteoporotischen Mäusen (Ishimi 2010). Auch bei ovx Ratten wurde bereits die knochenprotektive Wirkung von EQ beschrieben (Sehmisch et al. 2010). Dementgegen stellte die Forschungsgruppe um Rachoń (2007) keine knochenschonenden Effekte von EQ bei der ovx Ratte fest (Rachoń et al. 2007). Die Frakturheilung des osteoporotischen Knochens von zuvor ovx Ratten konnte bei EQ-Gabe wie auch bei Östrogengabe verbessert werden. Die Nebenwirkungen von EQ schienen zudem geringer als bei Östrogenen zu sein (Kolios et al. 2009).

3 Material und Methoden

Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Tierversuche waren Teil eines umfangreichen Forschungsprojektes zur männlichen Osteoporose, das durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert wurde (3A398/10-1). Der Versuch sollte Auskunft über die mögliche Beeinflussung des Knochens durch die verabreichten Hormone und die GKV auf die defekte Tibia geben. Als Untersuchungsgegenstand des Knochens und Knorpels dienten die Kortikalisdicke, die Fläche und die Kompaktheit der Spongiosastrabekel, die prozentuale Trabekelfläche, die Dicke der Epiphysenfuge und des Gelenkknorpels. Hierzu wurden die histologischen Präparate mit einem Lichtmikroskop fotografiert. Anschließend wurden die Bilder mit einem Imageanalyse-System vermessen und statistisch ausgewertet.

3.1 Versuchstiere und ihre Haltung

Der Tierversuch wurde nach Genehmigung des Niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit Oldenburg (LAVES; AZ: G 43.09) an 180 männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt (Züchter der Tiere: Winkelmann, Borchen, Deutschland).

Unter Standardbedingungen bei einer Raumtemperatur von 23 ° Celsius, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 % und einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Zyklus (Beleuchtung des Stalles zwischen 6 und 18 Uhr) wurden jeweils 4 Tiere in einem Makrolonkäfig Typ IV der Fa. Techniplast Deutschland GmbH aus Hohenpeißenberg gehalten.

Um eine Verwechslung der Ratten auszuschließen, bekam jedes Tier subkutan in der Nackenregion einen Transponder (Transponder-UNO MIKRO-ID-System, ISO-Transponder 12 mm Uno-Roesvastaal BV, Zevenaar, Holland) implantiert. Mit Hilfe eines tragbaren Lesegerätes (Gesreader II Ge S008: ISO kompatibler Taschenleser) konnte die zweifelsfreie Identifikation einer jeden Ratte mittels Zahlencode sichergestellt werden. Bei Ankunft der Tiere waren diese 3 Monate alt. Futter und frisches Trinkwasser standen den Tieren zur freien Verfügung. Bei Tierversuchen mit östrogen- und östrogenähnlichen Substanzen ist das Füttern der Tiere in der Eingewöhnungsphase (4 Wochen) mit sojafreiem

Futter (V 1354-000, ssniff R-Z, 10mm, phytoöstrogenarm, Maus/Ratte, Fa. Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) als Standardverfahren angesehen (Seidlová-Wuttke et al. 2008).

3.2 Versuchsablauf

Die 180 Versuchstiere kamen im Alter von 3 Monaten ins Göttinger Klinikum. Die Tiere wurden in 3 Serien mit jeweils 5 bzw. 6 Futtergruppen eingeteilt (Tab. 2). Während ihrer Eingewöhnungsphase von 4 Wochen (Abb. 2) bekamen die Ratten soja- und testsubstanzenfreies Pelletfutter. Im Anschluss wurden die Ratten orchiektomiert, um eine Androgenmangel-induzierte Osteoporose einzuleiten. Ab diesem Zeitpunkt wurden, mit Ausnahme einer Kontrollgruppe (KG) von 8 Ratten, alle Tiere 5 Tage in der

Tab. 2: Übersicht der 3 Serien, die nach 2, 3 und 8 Wochen untersucht wurden. Jede Serie umfasst eine SF-, DHT-, E2-, GEN- und EQ-Gruppe. Das X markiert die durchgeführte Orchiektomie, Trepanation bzw. Vibration.

Gruppe	SF	DHT	E2	GEN	EQ	KG
Serie I: Untersuchung nach 2 Wochen						
Anzahl der Tiere	12	11	11	11	11	8
Orchiektomie	X	X	X	X	X	X
Trepanation	X	X	X	X	X	-
1. Vibration	X	X	X	X	X	-
2. Vibration	-	-	-	-	-	-
Serie II: Untersuchung nach 3 Wochen						
Anzahl der Tiere	12	10	12	12	11	
Orchiektomie	X	X	X	X	X	
Trepanation	X	X	X	X	X	
1. Vibration	X	X	X	X	X	
2. Vibration	-	-	-	-	-	
Serie III: Untersuchung nach 8 Wochen						
Anzahl der Tiere	12	12	12	11	12	
Orchiektomie	X	X	X	X	X	
Trepanation	X	X	X	X	X	
1. Vibration	X	X	X	X	X	
2. Vibration	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	

Woche einer 15-minütigen, ersten GKV über einen Zeitraum von 4 Wochen ausgesetzt. Anschließend sind, mit Ausnahme der Kontrollgruppe, die Tibiae jeder Ratte trepaniert worden. Zum gleichen Zeitpunkt (t_0) wurde das Futter durch einen Zusatzstoff (DHT, E2, GEN oder EQ) ergänzt. Eine Gruppe (SF)

ist weiterhin mit sojafreien Pellets versorgt worden. Die jeweiligen Konzentrationen der Zusatzstoffe sind in Tab. 3 aufgeführt. Diese Futtermischungen, die auf dem Haltungsfutter „R-Z“ basieren, wurden von der Fa. Ssniff Spezialdiäten GmbH bezogen. Die Konzentrationen der Futterzusätze wurden nach evidenzbasierten Erkenntnissen ausgewählt (Rachoń et al. 2007, Mathey et al. 2007, Sehmisch et al. 2008, Sehmisch et al. 2010). Für die spätere, mikroskopische Fluoreszenz-Auswertung durch

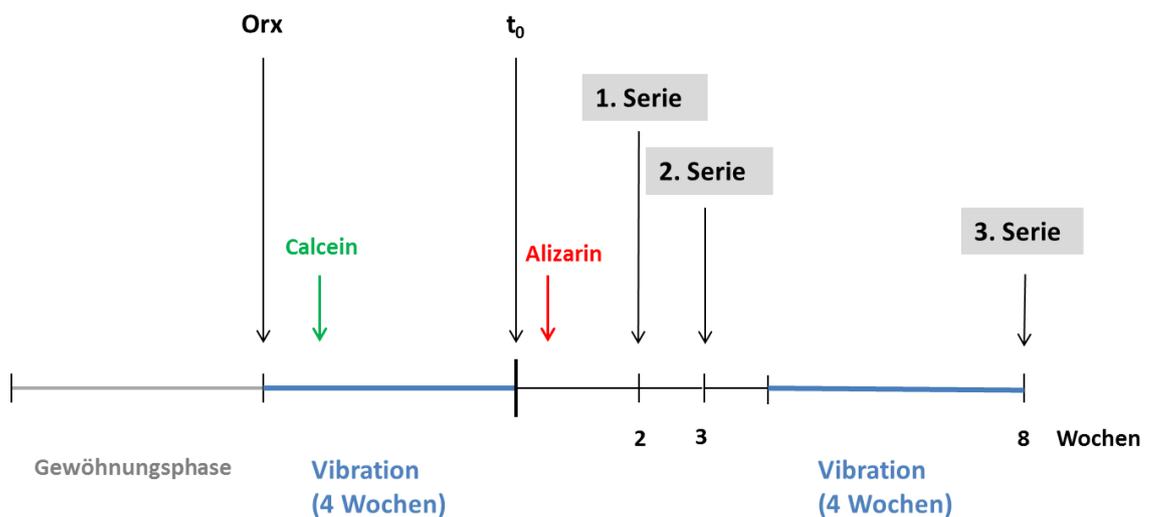


Abb. 2: Skizzierter Versuchsablauf. Am Zeitpunkt 0 (t_0) ist die Trepanation durchgeführt worden und die Futterzusätze wurden beigemischt. Vom Zeitpunkt 0 aus werden die Wochen bis zu den drei Serien gezählt. Bis auf die Tiere der Kontrollgruppe wurden alle Ratten in der 1. Vibrationsphase vibriert. Der 2. Vibration wurden nur die Hälfte der Ratten der 3. Serie ausgesetzt.

Frau S. Thole wurde den Versuchstieren Calcein und Alizarin subkutan injiziert. Zwischen der 4. und 8. Woche nach Futterumtausch ist die Hälfte der Ratten der 3. Serie einer zweiten, vierwöchigen GKV unterzogen worden. Zur Probenentnahme erfolgte die Opferung der Tiere in drei Serien 2, 3 und 8 Wochen nach Futterumtausch.

3.3 Orchiectomie

Eine Androgenmangel-induzierte Osteoporose konnte durch die Orx hervorgerufen werden. Diese fand in Inhalationsnarkose mit Isofluran statt. Die Skrotalhaut der Tiere wurde desinfiziert (Braunol®, Wirkstoff: Providon-Iod, B. Braun AG, Melsungen) und direkt über den Testes medial inzidiert.

Das darunter liegende viszerale Peritoneum konnte durchtrennt werden. Nachfolgend wurde der Hoden freipräpariert, der Ductus Epididymidis und die zugehörigen Gefäße ligiert, um nach ihrer Unterbindung abgetrennt zu werden. Das gleiche Vorgehen wurde auf der kontralateralen Seite wiederholt. Die eröffneten Strukturen konnten nach Blutstillung mit sterilem Nahtmaterial (Vicryl™ 3-0, resorbierbares Nahtmaterial, Ethicon GmbH, Norderstedt) verschlossen werden. Zur postoperativen Schmerzstillung und Entzündungshemmung wurde den Tieren 0,1 mg Metacam® (Wirkstoff: Meloxicam, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim/Rhein) appliziert. Während der Aufwachphase standen die Ratten unter Beobachtung.

3.4 Trepanation

Auf die Orx erfolgte nach 4 Wochen die Trepanation beider Tibiae jeder Ratte. Diese Behandlung wurde in Vollnarkose mit Isofluran vorgenommen. Zur Analgesie erhielten die Tiere zusätzlich 0,1 ml Metacam (Fa. Boehringer) pro 500 g Körpergewicht subkutan verabreicht. Während der Trepanationsvorbereitung wurde den Tieren zur Infektionsprophylaxe 0,1 ml Hostamox® (Wirkstoff: Amoxicillin-Trihydrat, Fa. Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim) pro kg Körpergewicht intramuskulär appliziert. Zur Übersicht wurde im Bereich der hinteren Extremitäten das Fell mit einem Elektrorasierer (Arco, Fa. Moser GmbH, Unterkirnach) entfernt. Anschließend konnte unterhalb des Kniegelenks mit Hilfe eines 15er Skalpell auf der Vorderseite der Tibia eine 8 bis 10 mm lange Haut- und Periostinzision angelegt werden. Um ein Trepanationsloch ($\varnothing=1,5$ mm) mit einem Knochenbohrer in der metaphysären Kortikalis anlegen zu können, wurde das Periost mit einem Raspatorium nach Partsch abpräpariert. Das Bohrloch wurde danach so angelegt, dass nur eine Kortikalis penetriert und die Spongiosa möglichst geschont wurde. Das Vorgehen erfolgte unter ständiger Spülung und Kühlung mit isotoner Kochsalzlösung. Abschließend wurde die Hautwunde einschichtig mit einem 4-0 monophilen Kunststofffaden (Ethilon II™ 4-0, Fa. ETHICON GmbH, Norderstedt) verschlossen und nochmals mit Braunol® desinfiziert. Zur postoperativen

Schmerzprophylaxe bekamen die Tiere in den ersten zwei Tagen nach der Operation subkutan 0,2 ml Metacam®.

3.5 Vibrationstherapie

Die Vibrationstherapie erfolgte während des Versuches zweimal über einen Zeitraum von vier Wochen. Der ersten GKV wurden alle Tiere, mit Ausnahme der Kontrollgruppe, ausgesetzt. Die zweite GKV wurde nur bei 50 % der Versuchstiere der 3. Serie durchgeführt (Tab. 2). Die Vibration fand an 5 Tagen in der Woche für jeweils 15 Min. etwa zur gleichen Zeit statt, dabei wurde die Reihenfolge der Versuchstiere mehrfach gewechselt. Die Frequenz wurde für 5 Min. bei 25 Hz und anschließend für 10 Min. bei 30 Hz festgelegt. Um die Vibration möglichst direkt auf die Tiere übertragen zu können, wurde der Käfig auf der Rüttelplatte des Ganzkörper-Vibrationsgerätes „SwingVibe“ mit Spanngurten befestigt. Die Vibration lief unter dem Modus „Monoswing“ ab. Die Schwingungen verlaufen in diesem Modus in der vertikalen Ebene mit einer Amplitude von 4 Millimetern.

3.6 Herstellung der histologischen Goldner-Präparate der Tibia

Die Tiere wurden 2, 3 und 8 Wochen nach der Trepanation in drei Serien unter CO₂-Narkose dekapitiert. Um Messfehler durch Schwankungen der zirkadianen Rhythmik der Tiere zu vermeiden, fanden die Obduktionen immer zum gleichen Tageszeitpunkt statt. Anschließend wurde den Ratten die für diesen Versuch benötigte rechte Tibia als Probe entnommen.

Die Aufbereitung des Gewebes für die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte in 4 Schritten: Fixieren, Einbetten, Schneiden und Färben. Zur Fixierung wurde das Gewebe für etwa eine Woche in 4%iger, neutraler und gepufferter Formalinlösung (0,1 M Phosphat- oder 0,02 M Phosphatpuffer) fixiert. Einmal täglich wurde im Exsikkator ein Vakuum erzeugt. Zur anschließenden Dehydratation wurde das Formalin ca. 30 Min. unter fließendem Wasser ausgewaschen, um das Gewebe anschließend bei Raumtemperatur durch eine prozentual aufsteigende Alkoholreihe (70 bis 100 %) zu dehydrieren. Eine Entfettung der Gewebeproben konnte durch die Behandlung mit Xylol erreicht werden.

Die Einbettform wurde zu $\frac{3}{4}$ mit einem Kunststoff-Kitt (Technovit 9100®, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim) gefüllt und das Präparat in dieser eingelegt und ausgerichtet. Unter luftdichtem Verschluss wurden die Formen zur Polymerisation bei -8 °C in den Tiefkühlschrank gestellt. Nach 2 bis 3 Tagen waren die Blöcke ausgehärtet und wurden nach Entnahme aus den Formen für einige Stunden im Kühlschrank platziert.

Die $5\text{ }\mu\text{m}$ dicken Längsschnitte wurden mittels Rotationstischmikrotoms (Leica RM 2165, Leica Biosystems GmbH, Nussloch) hergestellt. Als Schneidflüssigkeit diente 40%iges Ethanol. Die Schnittpräparate wurden mit Hilfe von Streckflüssigkeit (96%iges Ethanol) auf Objektträger aufgebracht und mit PVC-Folie (Kieselfolie) abgedeckt. Zum Trocknen wurden die Objektträger gestapelt und in einer Schnittpresse unter Druck bei $+50\text{ °C}$ getrocknet.

Zur Färbung wurde die Trichrom-Färbung nach Goldner angewendet. Die kollagenhaltige Knochensubstanz hebt sich in dieser Färbung gut ab. Für das Färben mussten zunächst die in Technovit eingebetteten Schnitte entplastet werden, indem sie mehrere Flüssigkeiten durchliefen. Zuerst wurden sie für 1 h in Xylol, dann zweimal für 15 Min. in 2-Methoxyethylacetat, danach zweimal für 5 Min. in Aceton und zuletzt zweimal für 2 Min. in destilliertem Wasser gelagert. Das eigentliche Färben erfolgte durch Einstellen der Objektträger in die mit verschiedenen Chemikalien gefüllten Gefäße (Tab. A-1).

Abschließend wurde unter Verwendung eines Tropfens Eukitt das Präparat auf dem Objektträger eingedeckt.

3.7 Herstellung der Bilder und ihre Auswertung

Von jeder Ratte wurden zwei histologische Präparate in Goldner-Färbung angefertigt. Die Präparate stellen Längsschnitte etwa der Hälfte der Tibia, des gesamten Kniegelenks und kleiner Anteile des Femurs dar (Übersichtsfoto Abb. 3). Zur Erstellung digitaler Fotos wurde ein Mikroskop (Axioskop 2 plus, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) sowie eine Kamera (Axio Cam MRc5, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) der Fa. Zeiss verwendet. Als Software diente Axio Version Vernon 4.8 (Fa. Zeiss, Carl

Zeiss Microlmaging GmbH, Jena). Von jedem Präparat wurden 6 Bilder angefertigt (Abb. 3).

Das mittige Übersichtsfoto in Abb. 3 (1,25-fache Vergrößerung) dient zur Orientierung. Für die späteren Auswertungen der Epiphysenfugenbreite und

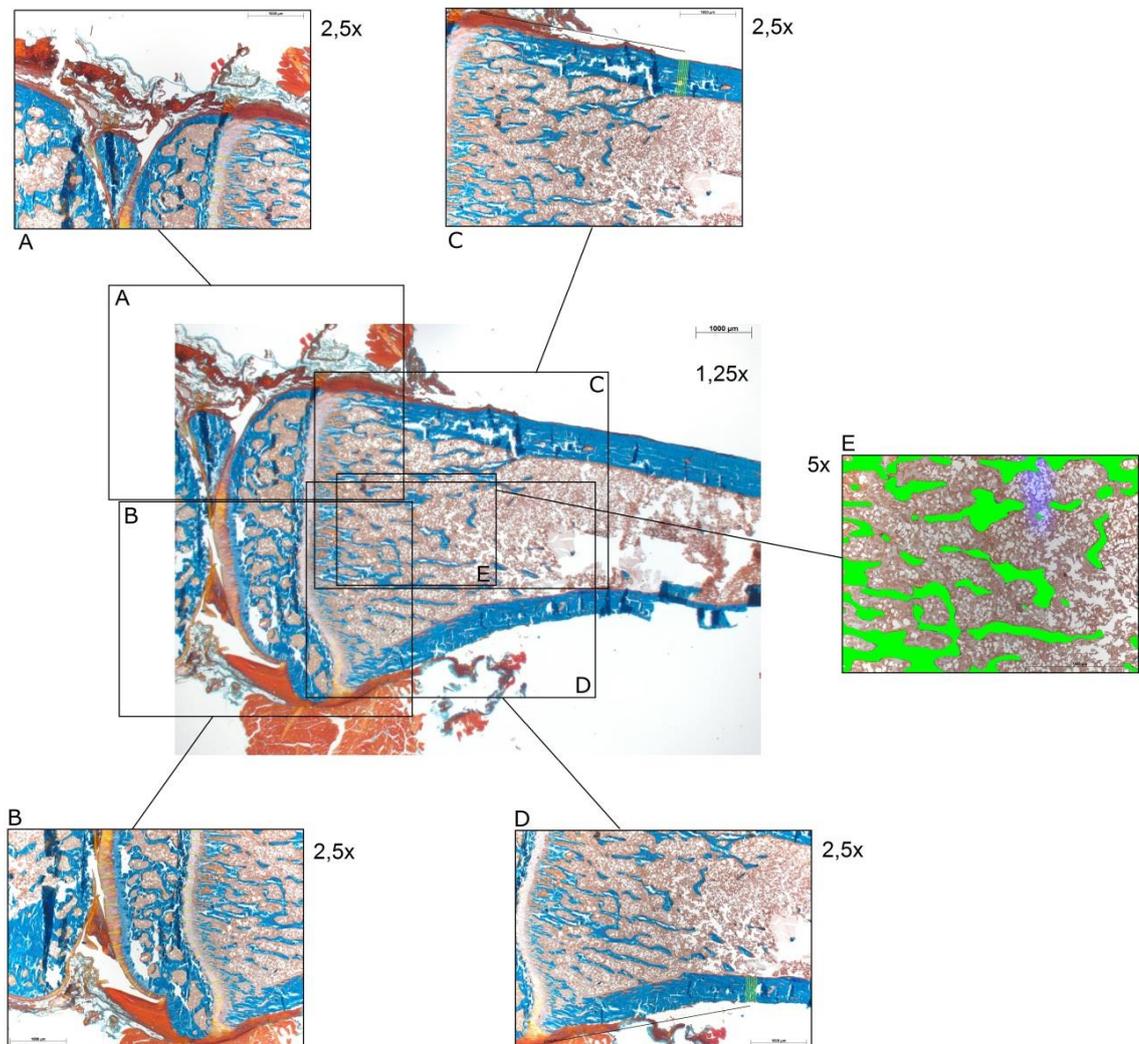


Abb. 3: Übersicht der zu vermessenden Bildausschnitte der proximalen Tibia. In der Mitte ist eine Übersichtsaufnahme zu sehen. Die Bilder A und B werden zur Auswertung der Epiphysenfuge und der Knorpeldicke verwendet. Die Bilder C und D bilden die Grundlage der Messung der Kortikalisdicke. Das Bild E dient zur Auswertung der Spongiosa.

der Gelenknorpeldicke der Tibia wurden zwei Fotos (A und B in Abb. 3) mit 2,5-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Beispielbilder A und B (Abb. 3) sind so ausgewählt worden, dass die Epiphysenfuge möglichst vollständig und ohne Überschneidungen abgebildet wurde. Um die Kortikalisdicke auszuwerten, wurden ebenfalls zwei Bilder in 2,5-facher Vergrößerung angefertigt (C und D in Abb. 3). Dabei wurden beide Kortikalisseiten

abgebildet. Zur Spongiosaauswertung wurde das Foto E (Abb. 3) so ausgewählt, dass bei 5-facher Vergrößerung nur Spongiosa, aber keine Kortikalis abgebildet wurde. Es wurde darauf geachtet, dass ein Abstand von 500 µm zur Epiphysenfuge nicht unterschritten wurde. So konnte vermieden werden, dass die zur Wachstumsfuge hin angrenzende, erhöhte Spongiosadichte vom Bild erfasst wurde. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms SigmaScan Pro (Sigma Scan Pro 5.0, SPSS Inc., Chicago).

Die Dicke der Epiphysenfuge ist durchgehend in Abständen von ca. 250 µm gemessen worden. Die Messungen schlossen alle vier Zonen der Epiphysenfuge (Reservezone, Proliferationszone, Hypertrophe Zone, Eröffnungszone) mit ein. Die Dicke des tibialen Gelenkknorpels wurde analog zur Epiphysenfuge gemessen.

Für die Erfassung der Kortikalisdicke wurden pro Kortikalisseite 7 Messungen vorgenommen. Diese liegen in der Diaphyse, knapp distal der proximalen Metaphyse. Die mittlere Messung wurde in einem Abstand von 3750 µm zur Epiphysenfuge gewählt. Die sechs weiteren Messungen erfolgten beidseitig der ersten Messung und in jeweils 50 µm-Abständen zueinander.

Für die Spongiosaberechnung mussten zuerst die einzelnen Trabekelanteile manuell im Programm umzeichnet und anschließend mit einer Farbe gefüllt werden (Bild E in Abb. 3). Mit Hilfe des Programms war es möglich, die Fläche (*area*) und die Kompaktheit (*compactness*) der einzelnen Trabekelanschnitte automatisch zu messen. So ließ sich die Form der Trabekel charakterisieren.

Die Kompaktheit (K) ist eine dimensionslose Zahl und definiert als Quadrat des Umfangs (U) eines Objektes, dividiert durch dessen Fläche (A). Die Formel dazu lautet: $K=U^2/A$. Je weniger Verzweigungen ein Trabekel bei gleicher Fläche hat, desto kleiner ist seine Kompaktheit. Der kleinstmögliche Fall wäre somit ein Trabekel in Kreisform. Der Umfang eines Kreises ist definiert als $2\pi r$ und seine Fläche als πr^2 . Daraus ergibt sich:

$$K = \frac{U^2}{A} = \frac{(2\pi r)^2}{\pi r^2} = \frac{4\pi^2 r^2}{\pi r^2} = 4\pi = 12,57$$

Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil der Summe der Trabekelflächen zum Gesamtbild (5,79 mm² bei 5-facher Vergrößerung) rechnerisch ermittelt.

3.8 Statistische Methodik

Die zahlreichen Messwerte wurden mit Hilfe des Computerprogrammes Excel (Microsoft Office 2010) katalogisiert. Unter Verwendung der Computersoftware SigmaSTAT und SigmaPLOT (SPSS Inc., Chicago) konnte die statistische Auswertung und deren Visualisierung durchgeführt werden. Normalverteilungen wurden als Mittelwerte (Mean) \pm Standardabweichung (SD) bzw. Standardfehler (SEM) wiedergegeben. Die Signifikanztestung wurde hierbei mit der Varianzanalyse und dem Holm-Sidak-Test durchgeführt. Die nicht normalverteilten Messwerte wurden als Medianwert mit 25 % und 75 % Perzentilen dargestellt. Diese nicht parametrischen Daten wurden mit der ANOVA der Ränge und dem Test nach Kruskal-Wallis bzw. nach Dunn zum Gruppenvergleich ausgewertet. Die Signifikanz wurde in beiden Fällen auf $\alpha \leq 0,05$ festgelegt. Die Abbildungen und Tabellen zeigen die Mittelwerte und Standardfehler oder die Medianwerte und die 25 % und 75 % Perzentile.

4 Ergebnisse

Nicht alle Tiere erreichten den Endpunkt des Versuches, sodass in einigen Gruppen ein bis zwei Versuchstiere nicht in die Auswertung eingehen konnten (Tab. 2).

Die folgende Abbildung (Abb. 4A) zeigt ein histologisches Präparat vom Kniegelenk mit Teilen des Femurkopfes und der Tibia, wie es typischerweise

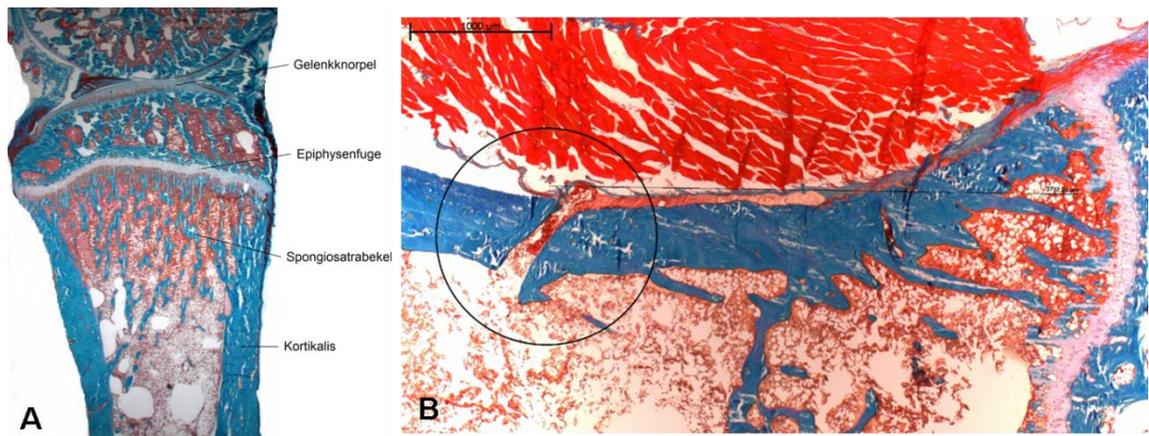


Abb. 4: Ausschnitt der histologischen Präparate einer Tibia der Ratte 18 (**A**) nach 2 Wochen aus der GEN-Gruppe (1,25-fache Vergrößerung) und der Ratte 151 (**B**) nach 8 Wochen der EQ-Gruppe (2,5-fach vergrößert) in der Färbung nach Goldner. Innerhalb des Kreises ist das Trepanationsloch in der Kortikalis im Abstand von 3750 µm von der Epiphysenfuge zu erkennen.

der Auswertung der morphologischen Befunde zu Grunde lag. In der Abb. 4B ist die Trepanationsbohrung in der Kortikalis dargestellt. Es wird deutlich, dass die Bohrung nur die Kortikalis und nicht die Spongiosa betrifft.

Tab. 3: Durchschnittliche Futteraufnahme (E2, DHT, GEN und EQ) der Versuchstiere in g/Tag; zusätzlich sind sowohl der Futterzusatz in mg/kg als auch die tatsächliche Futterzusatzaufnahme in mg/Tag angegeben.

Zusätze	Durchschnittliche Futteraufnahme in g/Tag	Futterzusatz in mg/kg	Tatsächliche Futterzusatzaufnahme in mg/Tag
E2	17,2	10	0,17
DHT	21,2	1000	21,2
GEN	20,7	1000	20,7
EQ	20,5	400	8,2

Die durchschnittlich aufgenommene Futter- und Substanzmenge der Tiere während des Versuches gibt Tab. 3 wieder.

4.1 Hormonwirkung auf die Morphologie der Kortikalis

Zur Untersuchung der Hormonwirkung auf die Kortikalis wurde diese im Längsschnitt der Tibia beidseits angeschnitten und vermessen. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 5 aufgeführt. Zwei Wochen nach der Futterumstellung hat die Kortikalis in allen Versuchsgruppen (SF, DHT, E2,

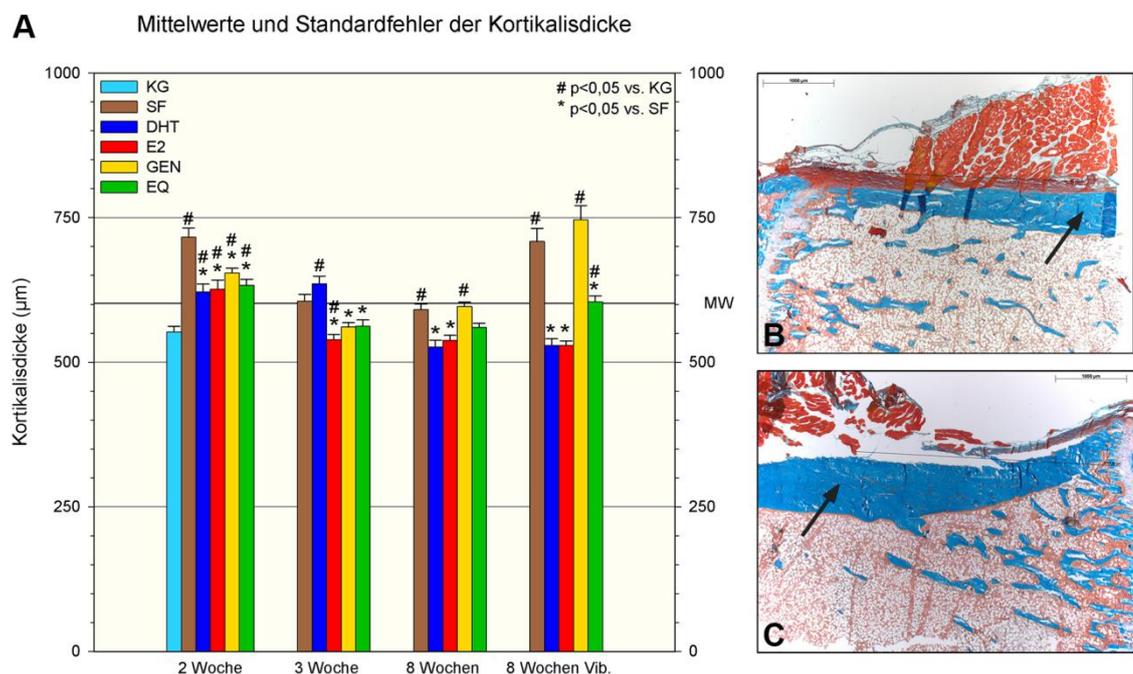


Abb. 5: Mittelwerte und Standardfehler der Kortikalisdicke (**A**) der Versuchsgruppen (SF-, DHT-, E2-, GEN-, EQ-Gruppe) nach 2-, 3- und 8-wöchiger Substanzapplikation. Die zusätzlich vibrierten Tiere der 3. Serie sind mit Vib. gekennzeichnet (# $p \leq 0,05$ vs. KG, * $p \leq 0,05$ vs. SF des betreffenden Zeitfensters, $63 \leq n \leq 161$, ANOVA und multipler Vergleich nach Holm-Sidak). Rechts sind in 2,5-facher Vergrößerung 2 Bilder dargestellt, wie sie der Kortikalisauswertung zu Grunde lagen. Die Bilder zeigen histologische Präparate aus der zusätzlich vibrierten (**B**) und der nicht zusätzlich vibrierten (**C**) SF-Gruppe nach 8 Wochen. Die Pfeile zeigen die Kortikalis.

GEN und EQ) signifikant an Dicke gegenüber der Kontrollgruppe zugenommen (Tab. 4). Gleichzeitig weisen die Ratten mit SF-Futter eine signifikant dickere Kortikalis im Vergleich zu den Tieren mit hormonellen Zusätzen auf. Im zeitlichen Verlauf fällt eine kontinuierliche Abnahme der Kortikalisdicke von der 2. bis zur 8. Woche auf. Allerdings unterscheiden

sich die zusätzlich vibrierten von den nicht zusätzlich vibrierten Tieren der SF-Gruppe nach 8 Woche durch eine starke Zunahme der Kortikalisdicke.

Im Vergleich zur 2. Woche zeigt sich nach 3 Wochen für die Futtergruppen mit Ausnahme der DHT-Gruppe eine Abnahme der Kortikalisdicke. Die DHT-Gruppe weist dagegen mit 635,4 μm die stärkste Kortikalis zu diesem

Tab. 4: Mittlere Kortikalisdicke in % vom Basiswert der Kontrollgruppe ($552,2 \pm 9,6 \mu\text{m} = 100\%$). Die dazugehörigen absoluten Werte sind in Tabelle A-2 und die Signifikanzen in Abbildung 5 zu finden.

Zeit	SF	DHT	E2	GEN	EQ
2 Wochen	129,77	112,56	113,46	118,53	114,61
3 Wochen	109,67	115,07	97,64	101,58	101,81
8 Wocheb	107,05	95,30	97,35	107,99	101,45
8 Wochen Vib.	128,36	95,80	95,81	135,14	109,48

Zeitpunkt auf. Diese ist signifikant dicker als die der Kontrollgruppe und der SF-Futtergruppe. Der kleinste Wert der Kortikalisdicke ist für die Tiere mit E2-Futter ermittelt worden. Dieser ist signifikant schmäler als der der Kontrollgruppe. Die Kortikali der E2-, GEN- und EQ-Gruppe sind nach 3 Wochen signifikant dünner als die der SF-Gruppe.

Die Tiere der 3. Serie sind nach 8 Wochen geopfert worden. Dabei ist die Hälfte der Ratten einer zusätzlichen Vibration unterzogen worden, sodass die Auswirkungen auf die Kortikalis mit und ohne zusätzlicher Vibration unterschieden werden müssen. Für die nicht zusätzlich vibrierten Ratten fallen die Messwerte der Kortikalisdicken für die Futtergruppen mit Ausnahme der GEN-Gruppe zwischen der 3. und 8. Woche ab. Nur die Ratten mit GEN-Futter haben an Kortikalisdicke zugelegt und weisen mit 35,4 μm die dickste Kortikalis der 8. Woche unter den nicht zusätzlich vibrierten Ratten auf. Nach 8 Wochen sind die Kortikalisdicken der mit DHT, E2 und EQ substituierten Ratten schmäler als die Kortikalis der SF-Gruppe, wobei die Ergebnisse für die mit E2 und DHT versorgten Tiere gleichzeitig signifikant kleiner gegenüber der SF-Gruppe sind. Dies gilt sowohl für die zusätzlich vibrierten als auch für die nicht zusätzlich vibrierten Gruppen.

Die zusätzlich vibrierten Ratten der SF-, GEN- und EQ-Gruppe weisen gegenüber der Kontrollgruppe und den nicht vibrierten Tiere der gleichen Gruppe eine dickere Kortikalis auf. Gleichzeitig ist die Kortikalis dieser zusätzlich vibrierten Tiere nach 8 Wochen dicker als die Kortikalis der

jeweils gleichen Futtergruppe nach 3 Wochen. Die GEN-Gruppe erreicht mit 746,3 μm den höchsten Wert im gesamten zeitlichen Verlauf. Dagegen ist für die Mittelwerte der mit DHT und E2 substituierten Tiere keine auffällige Veränderung zwischen den vibrierten und nicht zusätzlich vibrierten Ratten zu erkennen.

Im zeitlichen Verlauf nimmt die Kortikalisdicke der Gruppen von der 2. bis zur 3. Woche nach Futterumtausch ab. Die Ausnahme bildet die DHT-Futtergruppe, die in diesem Zeitraum an Kortikalisdicke zulegt. Dagegen zeigt sich eine Abnahme der Kortikalisdicke zwischen der 3. und 8. Woche sowohl für die vibrierten als auch für die nicht zusätzlich vibrierten Versuchstiere der DHT-Gruppe.

4.2 Effekte auf die Spongiosa

Für die Spongiosa konnte neben der Kompaktheit die **Trabekelfläche** ermittelt werden (Abb. 6). Die ersten Werte wurden nach 2 Wochen erhoben. Die Trabekelfläche der Kontrollgruppe hat zu diesem Zeitpunkt

Tab. 5: Relative Größe der Trabekelfläche (in %) . Basiswert (100%) stellt der Medianwert der Kontrollgruppe dar (=6554,41 μm^2). Die dazugehörigen absoluten Werte sind in Tabelle A-2 und die Signifikanzen in Abbildung 6 zu finden.

Gruppe	2 Wochen	3 Wochen	8 Wochen	8 Wochen Vib.
SF	125,36	76,36	96,77	88,72
DHT	111,70	109,35	156,65	157,11
E2	80,06	83,52	142,58	121,78
GEN	107,02	113,47	141,17	100,23
EQ	121,28	97,34	115,68	155,15

einen Mittelwert von 6554 μm^2 (100 %, Tab. 5). Im Vergleich dazu zeigen die Ratten mit SF-Futter eine Trabekelfläche von 125,36 % (Tab. 5) auf. Dies entspricht der größten Fläche in der Spongiosa, die für alle Futtergruppen nach 2 Wochen gemessen werden konnte. Im weiteren Versuchszeitraum sinken die Trabekelflächen der Tiere mit SF-Futter, sodass die Werte sowohl nach 3 als auch nach 8 Wochen immer die kleinsten Trabekelflächen im Vergleich zu den übrigen Futtergruppen darstellen. Dies steht insbesondere im Gegensatz zu den Tieren, die einen Zusatz an Sexualhormonen erhielten. Sowohl für die DHT- als auch die E2-Gruppe kann bis zur 8. Woche eine Zunahme der Trabekelfläche verzeichnet

werden. Mit und ohne zusätzliche Vibration haben die Tiere mit DHT-Zusatz nach 8 Wochen die größten Trabekelflächen ($10285 \mu\text{m}^2$) des gesamten Versuches. Die Werte der 3. Woche sowie der 8. Woche mit und ohne zusätzlicher Vibration sind signifikant größer gegenüber der SF-Gruppe. Dagegen haben die Tiere der E2-Gruppe mit $5247 \mu\text{m}^2$ die geringste Trabekelfläche nach 2 Wochen. Diese ist signifikant kleiner gegenüber der SF-Gruppe. Bis zur 8. Woche kann eine Zunahme der

A Mediane und Perzentilen der Trabekelfläche

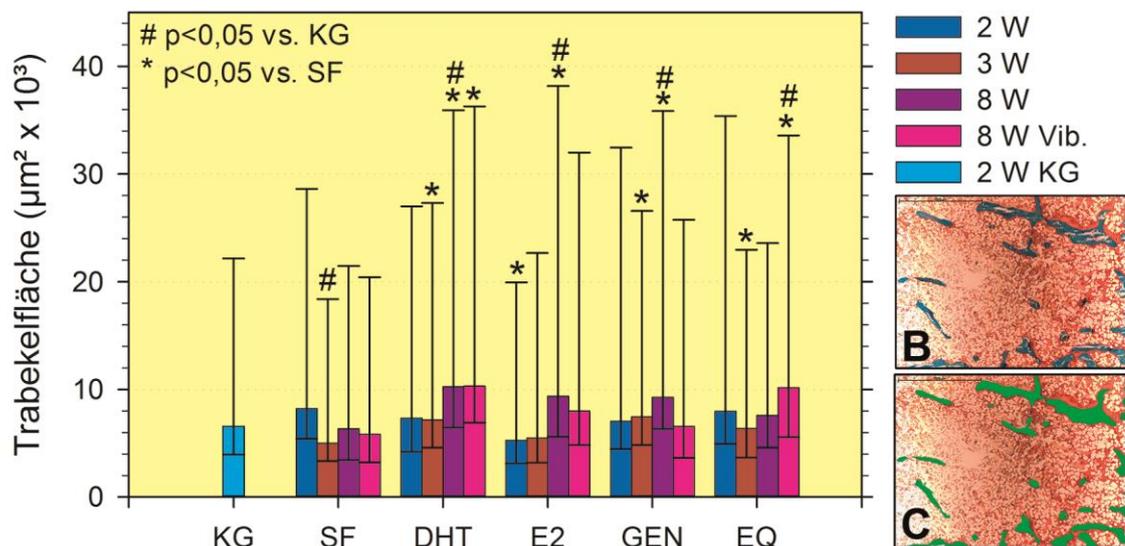


Abb. 6: Medianwerte und 25 % und 75 % Perzentilen der Trabekelfläche (**A**) der Versuchsgruppen (SF-, DHT-, E2-, GEN-, EQ-Gruppe) nach 2-, 3- und 8-wöchiger Substanzapplikation. Die zusätzlich vibrierten Tiere der 3. Serie sind mit Vib. gekennzeichnet (# $p \leq 0,05$ vs. KG, * $p \leq 0,05$ vs. SF des betreffenden Zeitfensters, $98 \leq n \leq 435$, ANOVA der Ränge und Dunn-Test gegen KG bzw. SF). **B** zeigt ein zur Auswertung der Trabekel in 5-facher Vergrößerung aufgenommenes Bild. **C** ist das mit einem grünen Overlay versehene Bild B.

Trabekelflächen sowohl für die E2-Tiere mit als auch ohne zusätzliche Vibration festgehalten werden, wobei die Flächen ohne zusätzliche Vibration größer ausfallen und signifikant größer gegenüber der SF-Gruppe und der Kontrollgruppe sind. Auch die Ratten mit GEN-Zusatz zeigen unter Vibration in der 8. Woche eine kleinere Trabekelfläche als die Tiere der gleichen Woche ohne zusätzliche Vibration. Mit $9253 \mu\text{m}^2$ ist die Trabekelfläche der nicht zusätzlich vibrierten Ratten der 8. Woche ebenfalls signifikant größer gegenüber den Messwerten der Tiere mit SF-Futter und denen der

Kontrollgruppe. Erwähnenswert ist die kontinuierliche Zunahme der Trabekelfläche der mit GEN versorgten Tiere von der 2. bis zur 8. Woche ohne zusätzliche Vibration. Nach einer Reduzierung der Trabekelfläche in der 3. Woche zeigen die Ratten mit EQ-Futter eine Zunahme der Fläche insbesondere unter der zusätzlichen Vibration der 8. Woche. Mit $10169 \mu\text{m}^2$ ist dieser Wert sowohl signifikant größer gegenüber den Tieren der SF-Gruppe als auch gegenüber denen der Kontrollgruppe. Zusätzlich liegt diese Trabekelfläche nur $129 \mu\text{m}^2$ unterhalb des Wertes, der in der gleichen Woche für die Tiere mit DHT-Zusatz erhoben werden konnte und gleichzeitig den größten Wert dieser Versuchsreihe darstellt.

Grundsätzlich ist eine Zunahme der medianen Trabekelfläche bei den Ratten aller Gruppen von der 3. zur 8. Woche unabhängig von der zusätzlichen Vibration auffällig. Eine Ausnahme bildet die Therapiegruppe mit GEN-Zusatz, denn die Ratten der 8. Woche mit zusätzlicher Vibration zeigen eine deutliche Reduzierung der Trabekelfläche gegenüber den übrigen Wochen. Zwischen der 2. und 3. Woche ist eine solche Gleichmäßigkeit nicht zu erkennen.

In der Abbildung 7 ist die **prozentuale Trabekelfläche** in Relation zur Fläche des Bildausschnittes dargestellt. Bei der Kontrollgruppe sind nach 2 Wochen durchschnittlich 10,5 % des Markraumes mit Trabekeln gefüllt. Dagegen haben die Ratten der SF-Gruppe nach 2 Wochen eine prozentuale Trabekelfläche von 11,86 %. Im weiteren Versuchszeitraum nimmt der Trabekelanteil in dieser Gruppe kontinuierlich bis zur 8. Woche ab. Verglichen mit den übrigen Therapiegruppen zeigen die Ratten der SF-Gruppe die kleinste, prozentuale Fläche der Trabekel in der 8. Woche sowohl mit als auch ohne zusätzliche Vibration. In den beiden Gruppen mit Sexualhormon-Zusatz nimmt der Trabekelanteil von der 2. zur 3. Woche zu. Im Gegensatz zu den mit DHT-Zusatz ernährten Ratten vergrößert sich in der E2-Gruppe der Trabekelanteil ebenfalls von der 3. zur 8. Woche. Nach 8 Wochen ohne zusätzliche Vibration weisen diese Tiere mit 15,34 % die größte prozentuale Trabekelfläche auf, wobei in der 2. Woche noch die geringste prozentuale Trabekelfläche (9,5 %) erfasst wurde.

Für die Ratten mit Phytohormon-Zusatz zeichnet sich ein anderes Bild ab. Der Trabekelanteil der mit GEN substituierten Versuchstiere fällt von der 2. zur 3. Woche ab, sodass dieser nach 3 Wochen den geringsten

Wert (8,73 %) darstellt. Zur 8. Woche hin nimmt der Trabekelanteil in dieser Gruppe sowohl für die zusätzlich als auch die nicht zusätzlich vibrierten Ratten wieder zu. Die Versuchstiere aus der EQ-Gruppe haben nach 2 Wochen die größte, prozentuale Trabekelfläche der gesamten

Relation gesamte Trabekelfläche zur Messfläche

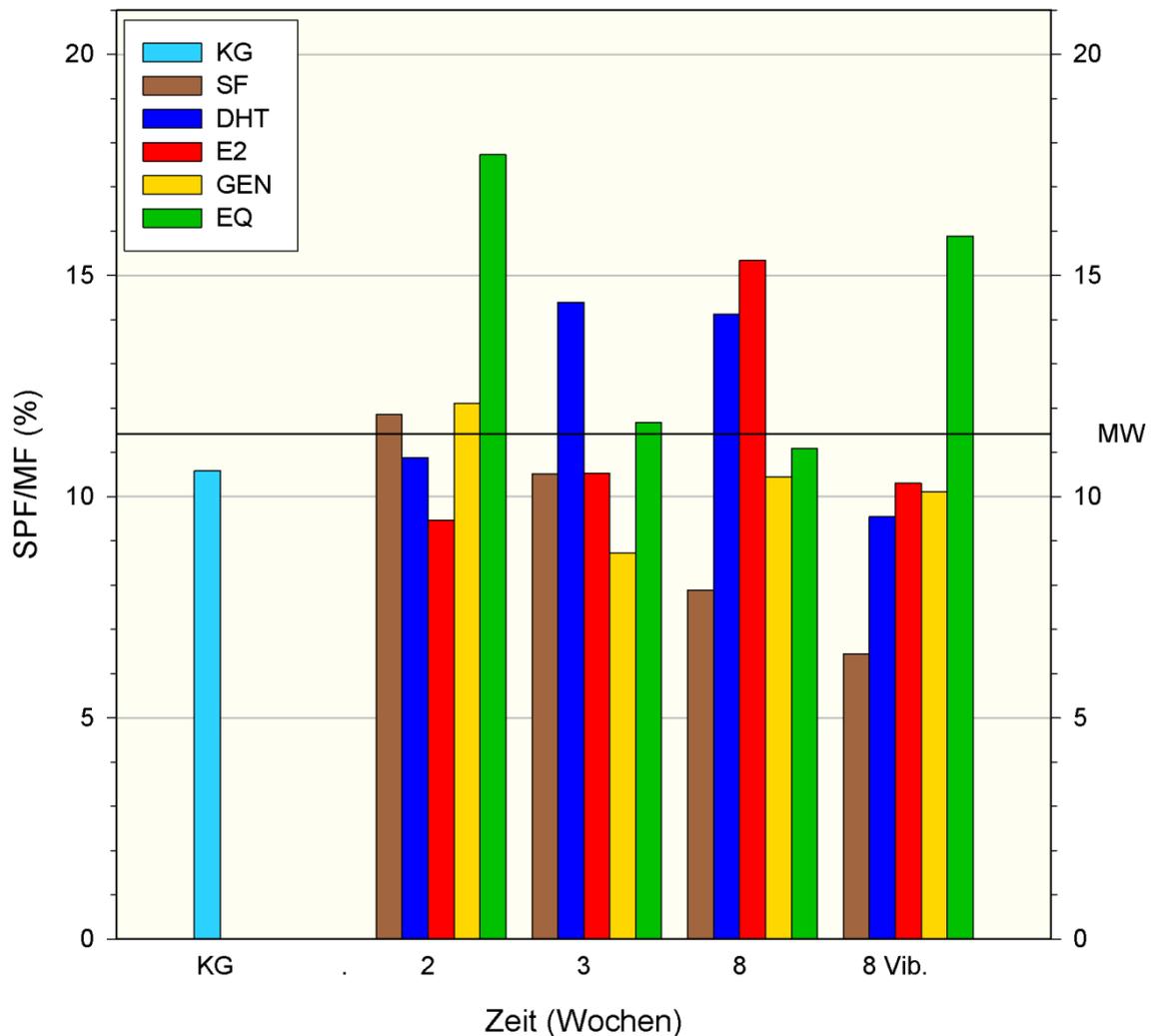


Abb. 7: Diese Graphik beschreibt die mittlere prozentuale Relation der gesamten Trabekelfläche zur Messfläche eines Bildausschnittes der Versuchsgruppen (SF-, DHT-, E2-, GEN-, EQ-Gruppe) nach 2-, 3- und 8-wöchiger Substanzapplikation. Die zusätzlich vibrierten Tiere der 3. Serie sind mit Vib. gekennzeichnet. Die gesamte Trabekelfläche setzt sich dabei aus der Summe der einzelnen Trabekelflächen zusammen. Die Messfläche bezieht sich auf das gesamte Bild ($99 \leq n \leq 405$).

Versuchsreihe (17,73 %). In dieser Gruppe kann bis zur 8. Woche bei den nicht zusätzlich vibrierten Tieren eine Reduzierung der prozentualen Trabekelfläche verzeichnet werden. Auffällig ist insbesondere ein starker Abfall der Trabekelfläche von der 2. zur 3. Woche (-6 %). Nach der

8. Woche haben alle zusätzlich vibrierten Tiere der Therapiegruppen mit Ausnahme der EQ-Gruppe (15,89 %) einen geringeren Trabekelanteil als die nicht zusätzlich vibrierten Tiere.

Die **Kompaktheit** (Abb. 8) ist ein dimensionsloses numerisches Maß für die Form eines Objektes und wird hier als ein Maß für die Verzweigung der Trabekel verwendet. Je verzweigter ein Objekt ist, desto größer wird der Wert. Die Tiere der Kontrollgruppe haben nach 2 Wochen eine mediane Kompaktheit von 22,3. Für die Ratten mit SF-Futter konnte die größte Kompaktheit im Vergleich zu den übrigen Futtergruppen in der 2. und 3. Woche ermittelt werden. Diese fällt nach 3 Wochen (24) sogar noch größer aus als nach 2 Wochen (23,1). Dagegen haben sowohl die einmal als

A Kompaktheit der Trabekel

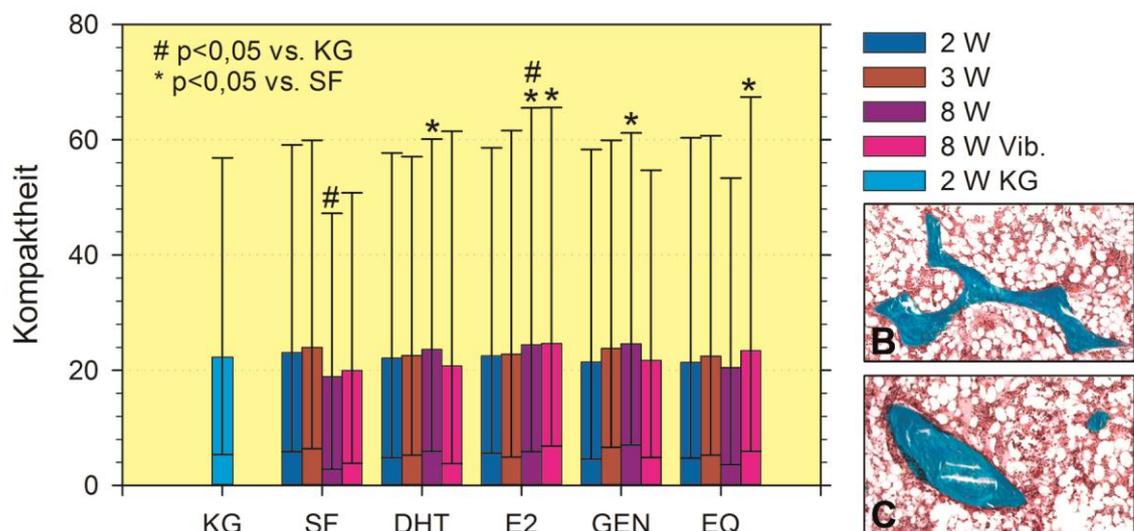


Abb. 8: Medianwerte und 25% und 75% Perzentilen der Kompaktheit (A) der Versuchsgruppen (SF-, DHT-, E2-, GEN-, EQ-Gruppe) nach 2-, 3- und 8-wöchiger Substanzapplikation. Die zusätzlich vibrierten Tiere der 3. Serie sind mit Vib. gekennzeichnet (# $p \leq 0,05$ vs. KG, * $p \leq 0,05$ vs. SF des betreffenden Zeitfensters, $98 \leq n \leq 435$, ANOVA der Ränge und Dunn-Test gegen KG bzw. SF). B zeigt einen Trabekel mit großer Kompaktheit. C stellt einen Trabekel mit kleiner Kompaktheit dar.

auch die zweimal vibrierten Ratten der SF-Gruppe nach der 8. Woche die kleinste Kompaktheit, verglichen mit den Ratten der übrigen Futtergruppen. Signifikant kleiner gegenüber der Kontrollgruppe ist nur die Kompaktheit (18,7) der mit SF-Futter gefütterten und nur einmal vibrierten Tiere der 8. Woche. Im Gegensatz dazu nimmt die Kompaktheit der Tiere mit DHT-,

E2- und GEN-Zusatz kontinuierlich von der 2. bis zur 8. Woche (1x vibr.) zu. Die Werte der Kompaktheit (23,6; 24,4; 24,6) dieser drei Futtergruppen für die 8. Woche ohne zusätzliche Vibration sind signifikant größer gegenüber der Kompaktheit der SF-Gruppe (18,7). Mit 24,6 zeigt die GEN-Gruppe die größte Kompaktheit verglichen mit den nicht zusätzlich vibrierten Ratten nach 8 Wochen. Unterschiedliche Reaktionen werden allerdings durch die zusätzliche Vibration hervorgerufen. Während sich die Kompaktheit nach 8 Wochen mit zusätzlicher Vibration unter DHT- und GEN-Gabe (20,8; 21,7) verkleinert, kann in der E2-Gruppe eine Zunahme verzeichnet werden. Diese Kompaktheit (24,7) ist signifikant größer gegenüber der SF-Gruppe und hat den höchsten Wert, der unter der zusätzlichen Vibration ermittelt wurde. Die durchschnittlich größten Kompaktheiten des Versuches werden in der E2-Gruppe ersichtlich. Die mit EQ versorgten Ratten weisen nach 2 und 3 Wochen die kleinste Kompaktheit im Vergleich zu den übrigen Therapiegruppen auf. Eine Zunahme der Kompaktheit kann in dieser Gruppe unter der zusätzlichen Vibration der 8. Woche (23,4) verzeichnet werden. Diese ist signifikant größer gegenüber der SF-Gruppe. Die Kompaktheit der nicht zusätzlich vibrierten Tiere der 8. Woche zeigt dagegen eine Abnahme im Vergleich zur 3. Woche der gleichen Futtergruppe.

4.3 Effekte auf die Epiphysenfuge

Neben der Kortikalisdicke und den Trabekelparametern wurde die Dicke der Epiphysenfuge ermittelt. Nach 2 Wochen haben die Ratten der Kontrollgruppe mit 197 μm den höchsten Wert der Epiphysenfugendicke im Vergleich mit den übrigen Versuchstieren (Abb. 9). Dabei sind die Epiphysenfugen der Gruppen mit DHT-, E2-, GEN- und EQ-Zusatz nach der 2. Woche sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch der SF-Gruppe signifikant schmäler. Grundsätzlich nimmt die Epiphysenfuge in allen Gruppen kontinuierlich von der 2. bis zur 8. Woche ab, wobei die Tiere der E2-Gruppe zu jedem Zeitpunkt die schmalste Epiphysenfuge zeigen. Dagegen weisen im weiteren Versuchsverlauf die Ratten der SF-Gruppe nach 3 und 8 Wochen mit zusätzlicher Vibration die breiteste Epiphysenfuge auf. Mit Ausnahme der DHT-Gruppe ist die Epiphysenfuge nach 3 Wochen in

allen Therapiegruppen signifikant dünner als die der SF-Gruppe. Unter der zusätzlichen Vibration zeigen die Ratten der Gruppen SF und E2 eine um etwa 3 μm dickere Epiphysenfuge im Vergleich zu den Tieren der gleichen Hormongruppe der 8. Woche, welche nicht zusätzlich vibriert wurden. Dagegen weisen die Gruppen DHT und GEN eine geringfügig schmalere

A Mittelwerte und Standardfehler der Dicke der Epiphysenfuge

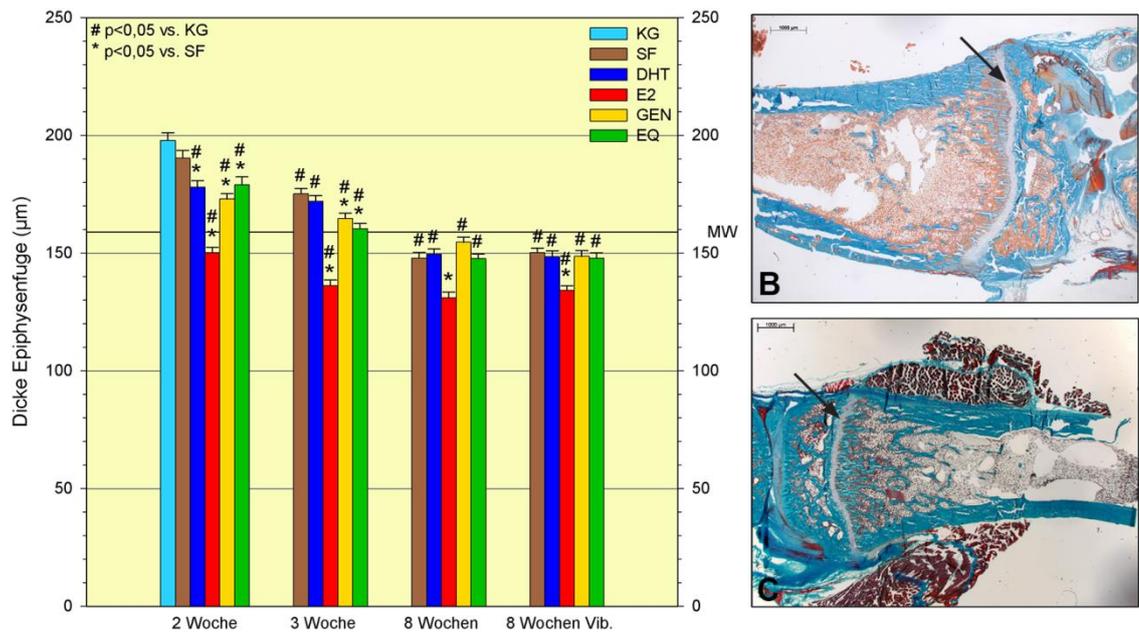


Abb. 9: Mittelwerte und Standardfehler der Dicke der Epiphysenfuge (**A**) der Versuchsgruppen (SF-, DHT-, E2-, GEN-, EQ-Gruppe) nach 2-, 3- und 8-wöchiger Substanzapplikation. Die zusätzlich vibrierten Tiere der 3. Serie sind mit Vib. gekennzeichnet. MW stellt den Mittelwert aller Gruppen dar (# $p \leq 0,05$ vs. KG, * $p \leq 0,05$ vs. SF des betreffenden Zeitfensters, $110 \leq n \leq 262$, ANOVA und multipler Vergleich gegen die Kontrollgruppe nach Holm-Sidak). Die Bilder auf der rechten Seite zeigen die Epiphysenfuge (schwarzer Pfeil) der nicht zusätzlich vibrierten Ratten der E2-Gruppe nach 8 Wochen (**B**) und nach 2 Wochen (**C**). Die stärkste Wirkung im Sinne einer Verschmälerung der Epiphysenfuge besitzt E2.

Epiphysenfuge als ihre nur einmal vibrierte Vergleichsgruppe auf. Durch die zusätzliche Vibration konnte für die mit EQ behandelten Tiere keine Reaktion hervorgerufen werden.

4.4 Effekte auf den tibialen Gelenkknorpel

Als letzter Parameter wurde der proximale tibiale Gelenkknorpel untersucht. Die Tiere der Kontrollgruppe haben nach 2 Wochen eine mediane Knorpeldicke von 107,2 μm (Abb. 10). Mit Ausnahme der 3. Woche haben

die Tiere der SF-Gruppe immer einen dickeren Gelenkknorpel als die Kontrollgruppe. Die zusätzlich vibrierten Ratten der SF-Gruppe weisen nach 8 Wochen einen um 3,9 μm dickeren Knorpel als die nicht zusätzlich vibrierten Tiere auf. Diese Knorpeldicke (150,8 μm) ist der dickste Knorpel

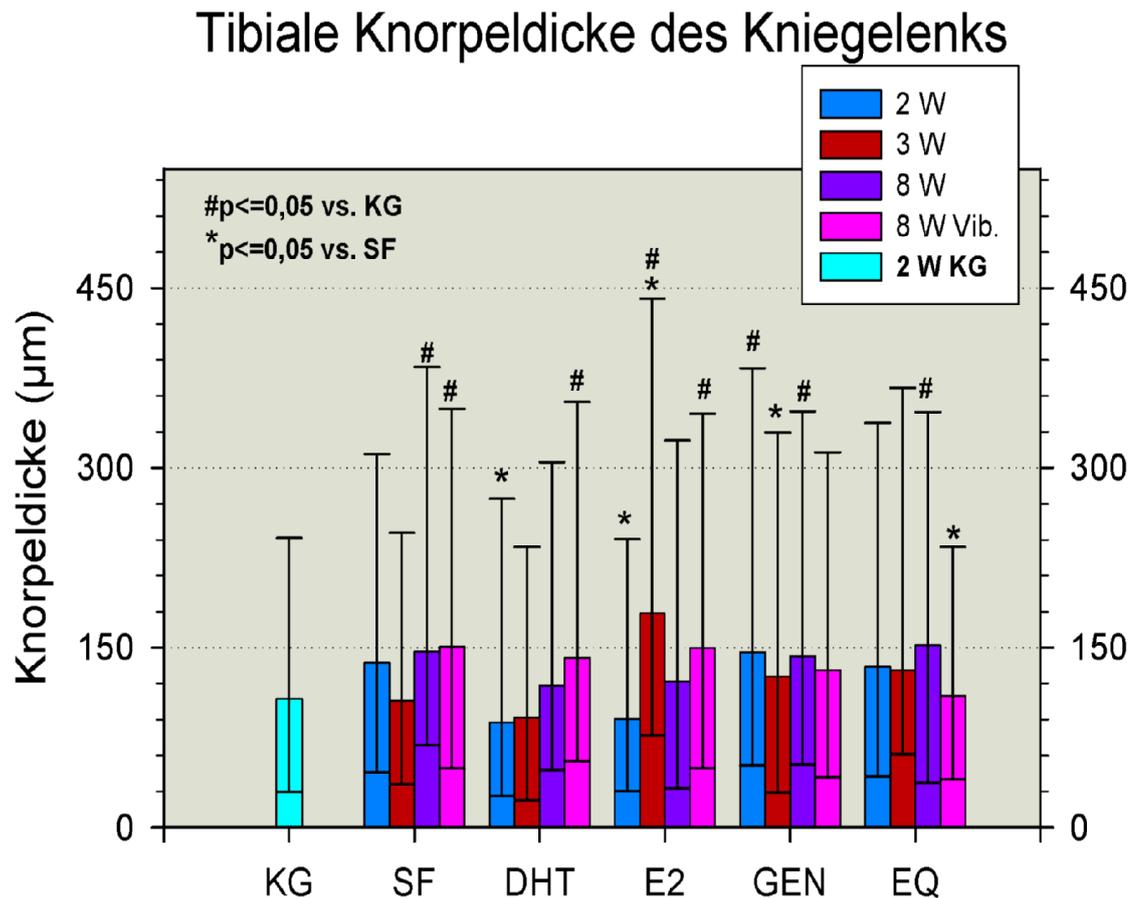


Abb. 10: Medianwerte und 25% und 75% Perzentilen der tibialen Knorpeldicke des Kniegelenks der Versuchsgruppen (SF-, DHT-, E2-, GEN-, EQ-Gruppe) nach 2-, 3- und 8-wöchiger Substanzapplikation. Die zusätzlich vibrierten Tiere der 3. Serie sind mit Vib. gekennzeichnet. (# $p \leq 0,05$ vs. KG, * $p \leq 0,05$ vs. SF des betreffenden Zeitfensters, $45 \leq n \leq 156$, ANOVA der Ränge und Dunn-Test gegen KG bzw. SF).

aller zusätzlich vibrierten Versuchstiere nach 8 Wochen. Die Werte der mit SF-Futter ernährten Tiere sind nach 8 Wochen signifikant größer als die der Kontrollgruppe.

Bei den Ratten der DHT-Gruppe kann eine kontinuierliche Zunahme von der 2. zur 8. Woche verzeichnet werden, wobei die Werte zu jedem Zeitpunkt die geringsten Knorpeldicken im Vergleich mit den übrigen Versuchsgruppen einnehmen. Die zusätzlich vibrierten und mit DHT substituierten Ratten der 8. Woche haben mit 141,7 μm einen dickeren Knorpel als die nicht

zusätzlich vibrierten Tiere der gleichen Futtergruppe. Der Knorpel der zusätzlich vibrierten Tiere ist signifikant dicker als der der Kontrollgruppe. Gegenüber der SF-Gruppe ist die Knorpeldicke nach 2 Wochen signifikant kleiner.

Die mit E2 gefütterten Ratten haben nach 2 Wochen einen signifikant dünneren Gelenkknorpel als die mit SF-Futter ernährten Versuchstiere. Mit $90,6 \mu\text{m}$ ist der Knorpel wesentlich dünner als in den meisten anderen Gruppen. Der dickste Knorpel aller Gruppen ist mit $178,7 \mu\text{m}$ nach 3 Wochen bei den mit E2 zugefütterten Tieren zu finden. Dieser Wert ist sowohl gegenüber der SF-Gruppe als auch gegenüber der Kontrollgruppe signifikant größer. In der 8. Woche ist der Knorpel der zusätzlich vibrierten Ratten ($149,8 \mu\text{m}$) der E2-Gruppe annähernd so dick wie der Knorpel der Ratten aus der SF-Gruppe. Er ist signifikant dicker als der der Kontrollgruppe. Die nicht zusätzlich vibrierten und mit E2 zugefütterten Tiere haben nach 8 Wochen im Vergleich mit den anderen Gruppen und der zusätzlich vibrierten E2-Gruppe eine dünnere Knorpelschicht.

Der dickste Gelenkknorpel der GEN-Gruppe findet sich bereits nach 2 Wochen. Zugleich ist es zu diesem Zeitpunkt der dickste Knorpel aller Gruppen. Signifikant größer ist dieser Wert ($146,4 \mu\text{m}$) allerdings nur gegenüber der Kontrollgruppe. Sowohl nach 2 als auch nach 8 Wochen (nicht zusätzlich vibriert) haben die Ratten der GEN-Gruppe einen signifikant dickeren Gelenkknorpel als die Kontrollgruppe. Nach 3 Wochen ist die Knorpeldicke der GEN-Gruppe signifikant größer als die der SF-Gruppe. Die zusätzlich vibrierten Ratten der GEN-Gruppe haben nach 8 Wochen einen um $11,5 \mu\text{m}$ dünneren Knorpel als die nur einmal vibrierten Tiere.

Nach 2 und 3 Wochen zeigen die Tiere der EQ-Gruppe eine kaum veränderte Knorpeldicke, die sich nicht von den anderen Versuchsgruppen abhebt. Der Gelenkknorpel der nicht zusätzlich vibrierten und mit EQ gefütterten Tiere steigt nach der 8. Woche auf $151,8 \mu\text{m}$ an. Dies entspricht dem höchsten Wert aller nicht zusätzlich vibrierten Ratten nach 8 Wochen. Signifikant dicker ist der Gelenkknorpel zu diesem Zeitpunkt nur gegenüber der Kontrollgruppe. Der Gelenkknorpel der zusätzlich vibrierten Tiere ist mit $109,8 \mu\text{m}$ hingegen der dünnste Knorpel aller Gruppen nach 8 Wochen. Er ist signifikant dünner als der der SF-Gruppe.

Von der 3. zur 8. Woche (nicht zusätzlich vibriert) ist mit Ausnahme der Tiere aus der E2-Gruppe in allen Gruppen eine Gelenkknorpeldickenzunahme zu verzeichnen. Eine solche Zunahme ist in den Gruppen SF, DHT und GEN auch bei den zusätzlich vibrierten Tieren zu erkennen.

5 Diskussion

Der vorliegende, durch die DFG geförderte Tierversuch, konzentriert sich auf die Erforschung der männlichen Osteoporose. Dabei dient die orx Ratte als Modell (Frost und Jee 1992, Inada et al. 2011, Juma et al. 2012), denn die Orx führt zu einem Ausbleiben der Sexualhormonsynthese. Dies induziert einen künstlichen Knochensubstanzverlust in Form einer Osteoporose (Erben et al. 2000, Inada et al. 2011, Juma et al. 2012, Schot und Schuurs 1990, Soung et al. 2006, Wink und Felts 1980).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Knochen durch 3 Parameter beeinflusst. Hierzu zählen die Trepanation der Tibiae, die Ganz-Körper-Vibration und die Substitution eines Sexualhormons (DHT bzw. E2) oder Hormonersatzstoffes (GEN bzw. EQ). Die GKV führt bei Menschen mit niedriger Knochenmineraldichte (BMD) zur Erhaltung und Verbesserung der Knochenmasse (Totosy de Zepetnek et al. 2009). Dies konnte auch am Modell der orx Ratte gezeigt werden (Papenberg 2011).

Zum Vergleich kann die Kontrollgruppe (KG) herangezogen werden. Die Tiere dieser Gruppe wurden ebenfalls orx. Allerdings erhielten die Kontrolltiere keine Futterzusätze, keine GKV und ihre Tibiae wurden nicht trepaniert. Als weitere Vergleichsgruppe dienten die Tiere der SF-Gruppe. Ihnen wurden ebenfalls keine Phyto- oder Sexualhormone zugefüttert, sie wurden dagegen einer Trepanation und GKV unterzogen.

5.1 Wirkung der GKV auf den Knochen der orx Ratte

Der Knochen orx Tiere dient in vielen Studien zur Beleuchtung des therapeutischen Effekts von Futterzusatzstoffen auf die Osteoporose/ Osteopenie (Bohnsack 2010, Stuermer et al. 2009, Vandenput et al. 2002, Tuukkanen et al. 1994). Als Besonderheit wurde in diesem Versuch zwischen der Orx und dem Futterumtausch eine zusätzliche, vierwöchige Vibration integriert. Diese verhindert die Ausbildung eines osteoporotischen Knochens bei den orx Ratten (Papenberg 2011). Papenberg (2011) führte Dichtemessungen der Spongiosa mittels quantitativer Computertomographie (QCT) an denselben Ratten durch. Die orx, vibrierten Ratten bildeten in seinem Versuch 4 Wochen nach Orx durch die GKV keine

osteoporotische Spongiosa aus. Die Vibration war in dem Versuch von Papenberg (2011) präventiv wirksam und verhinderte die Ausbildung eines osteoporotischen Knochens (Papenberg 2011). Gemäß dieser Erkenntnis weisen die Ratten im vorliegenden Versuch zum Zeitpunkt des Futterumtausches (Zeitpunkt 0) auf Grund der zuvor durchgeführten GKV keine manifeste Osteoporose auf. Die Medikamentengabe muss also auf ihre präventive und nicht, wie in den meisten Studien, auf ihre therapeutische Wirksamkeit untersucht werden.

5.2 Knochenentwicklung in der sojafreien Gruppe

Der Knochen der Tiere mit SF-Futter zeichnet sich durch eine alleinige Beeinflussung durch die Trepanation und Vibration aus.

Die Osteoporose manifestiert sich in Form von Knochenschwund in der Kortikalis und insbesondere im Bereich der Spongiosa (Riggs et al. 2004). Während der 8-wöchigen Versuchsauswertung konnte ein Knochenverlust sowohl an der Kortikalis als auch an der Spongiosa bestätigt werden, denn die Kortikalisdicke und die prozentuale Trabekelfläche nehmen in der SF-Gruppe von der 2. zur 8. Woche kontinuierlich ab. Ebenso fallen nach 8 Wochen die Messwerte der einzelnen Trabekelflächen und der Kompaktheit im Vergleich zur 2. Woche geringer aus. Unsere Ergebnisse stimmen mit den Studien von Vandenput et al. (2002), Tuukkanen et al. (1994) und Wakley et al. (1991) überein. In diesen Studien konnte ebenfalls eine Abnahme der Spongiosaqualität bei orx Ratten festgestellt werden.

Gleichzeitig muss der Einfluss der körperlichen Aktivität auf die SF-Gruppe beleuchtet werden. Bewegung kann vor Knochenschwund schützen (Sehmisch et al 2009). Deshalb

wurde die tägliche GKV über einen Zeitraum von 4 Wochen als Simulation des körperlichen Trainings in diesen Versuch integriert. Studien haben bereits

Tab. 6: Wirkung von GKV und Trepanation auf den Knochen:

- GKV induziert Zunahme der Kortikalisdicke
- GKV führt zu dünneren Trabekeln
- Trepanation ruft größere, verzweigtere Trabekel hervor

gezeigt, dass die GKV der Ratten als Modell für körperliche Bewegung beim Menschen dienen kann (Wenger et al. 2010, Flieger et al. 1998). Bekannt ist auch, dass die Vibrationstherapie einer Atrophie von Muskelmasse

entgegenwirkt (Blottner 2006). Muskelmasse wiederum ist wichtig für den Erhalt von Knochendichte (Kressing und Proust 1998). An dem osteopenetischen Oberschenkelknochen weiblicher Ratten wurde bereits ein schützender Effekt durch die Vibration nachgewiesen (Tezval 2011). Auch Rubinacci et al. (2008) zeigten knochenprotektive Effekte der Vibration. Sie vibrierten 8 Wochen lang, 5 Tage/Woche, 20 Min./Tag sowohl intakte als auch ovx Ratten mit einer Frequenz von 30 Hz. Anschließend werteten sie die Tibiae der Ratten histologisch und mittels peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT) aus. Sie stellten eine Steigerung sowohl der Kortikalis- als auch der Spongiosafläche fest (Rubinacci et al. 2008). Im vorliegenden Versuch weisen die mit SF-Futter ernährten Ratten nach 2 Wochen grundsätzlich bessere Kortikalis- und Spongiosawerte auf als die der unvibrierten Kontrollgruppe. Die Zunahme dieser Parameter der SF-Gruppe kann durch die Vibration oder die Trepanation hervorgerufen worden sein. Betrachtet man die Ergebnisse nach 8 Wochen mit und ohne zusätzlicher GKV, so wird deutlich, dass die GKV eine dickere Kortikalis und dünnere Trabekel induziert. Somit ist nach 2 Wochen die GKV für die dickere Kortikalis und die Trepanation für die größeren, verzweigteren Trabekel gegenüber der Kontrollgruppe verantwortlich. Ähnliches beobachtete auch die Arbeitsgruppe um Monfoulet et al. (2010), die die Knochenheilung des Femurs nach Anlegen eines Bohrloches untersuchte. Zwei Wochen nach der Operation trat eine Zunahme der Spongiosamasse durch primäre Knochenbildung ein. Nach 4 Wochen war die Spongiosamasse durch Abnahme der Trabekelanzahl und -dicke reduziert (Monfoulet et al. 2010). Dieses Ergebnis kann mit den vorliegenden Resultaten in Einklang gebracht werden, denn 2 Wochen nach Trepanation sind die absolute Trabekelfläche und die prozentuale Trabekelfläche größer als die der Kontrollgruppe. Ebenfalls nehmen diese Werte über den Zeitraum von 8 Wochen ab.

5.3 Wirkung der Steroidhormone DHT und E2 auf den Knochen

Den Sexualhormonen wird eine besondere Relevanz auf den Knochenstoffwechsel zugesprochen. Aus diesem Grund wird ihr Mangel auch als Hauptursache der Osteoporose diskutiert (Frenkel et al. 2010, Gennari et al.

2008). Dem weiblichen Sexualhormon Östrogen kommt dabei eine große Bedeutung im Knochenstoffwechsel beider Geschlechter zu (Khosla et al. 2001, Mellström 2008, Vandenput und Ohlsson 2010). So konnte eine prospektiv kontrollierte Studie an Patienten mit fortgeschrittenen Prostatakarzinomen zeigen, dass die Knochendichte bei orchiectomierten Männern abnimmt. Bei gleichzeitiger Östrogengabe blieb diese unverändert (Kudlacek et al. 1999). DHT ist im Gegensatz zu Testosteron nicht weiter zu Östrogenen metabolisierbar (Wang und Swerdloff 2002), sodass durch dessen Einsatz die isolierte Wirkung des männlichen Sexualhormons nachvollzogen werden kann. Am **kortikalen Knochen** stimulieren Testosteron und **DHT** das Längenwachstum (Compston 2001). Ebenso wurde an Ratten bereits festgestellt und für den Menschen vermutet, dass Testosteron auch für das radiale Wachstum verantwortlich ist (Riggs et al. 2002, Vanderschueren et al. 2004). Eine knochenprotektive Wirkung von DHT und Testosteron stellten auch Venken et al. (2006) an orx Mäusen fest (Venken et al. 2006). Entgegen der aufgeführten Literatur zeigt die DHT-Gruppe des vorliegenden Versuches nach 2 Wochen eine dünnere Kortikalis als die Ratten der SF-Gruppe. Dabei ist der Knochen der SF-Gruppe ausschließlich von der GKV und der Trepanation beeinflusst. Ein Vergleich mit dieser Gruppe ermöglicht die Klärung des zusätzlichen DHT-Einflusses. Dennoch haben die Tiere mit DHT-Futterzusatz nach 2 Wochen eine dickere Kortikalis als die der nicht trepanierten und nicht vibrierten Kontrollgruppe. Der grundsätzlich positive Effekt der GKV auf die Kortikalis, wie es bei den Tieren der SF-Gruppe zu erkennen ist, wird durch die DHT-Gabe unterdrückt. Die Auswirkung der Vibration ist nach 2-wöchiger DHT-Substitution dennoch messbar, denn die Ratten standen während der 1. GKV noch nicht unter DHT-Einfluss. Zum Zeitpunkt der 2. GKV wurden die Ratten bereits 8 Wochen mit DHT substituiert. Nach 8 Wochen konnte kein Effekt der zusätzlichen Vibration mehr gemessen werden, weil die DHT-Substitution den positiven Effekt der Vibration auf die Kortikalis unterdrückte. Zum Vergleich kann eine Studie von Vanderschueren et al. (1992) herangezogen werden. Sie untersuchten die Kortikalisdicke orx

Tab. 7: Wirkung von DHT und E2 auf den kortikalen Knochen:

- DHT und E2 unterdrücken die GKV-induzierte kortikale Knochenzunahme

Ratten unter DHT-Applikation. Dabei stellte sich 4 Monate nach Orx eine dickere Kortikalis bei den DHT-zugefütterten Tieren, als bei den ausschließlich orx Vergleichstieren heraus (Vanderschueren et al. 1992). Dies steht im Gegensatz zum vorliegenden Versuch. In diesem Versuch ist die Kortikalis der DHT-Gruppe nach 8 Wochen (13 Wochen nach Orx) gegenüber der SF-Gruppe signifikant dünner. Die Versuche unterscheiden sich durch den Parameter der GKV, sodass die dünnere Kortikalis in der vorliegenden Arbeit auf die DHT-Gabe in Kombination mit der GKV zurückzuführen sein muss.

Des Weiteren spielt das Sexualhormon Östradiol eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel des Menschen. Östrogenmangel kann bei Frauen zu Osteoporose führen, die sich insbesondere postmenopausal äußert (Rassow et al. 2008). Auch im männlichen Stoffwechsel werden geringe Mengen Östrogene produziert. Die Synthese findet vornehmlich in den Testes statt. Jedoch kann Testosteron auch in anderen Geweben mittels der enzymatischen Aromatase zu Östrogenen umgewandelt werden. Bereits vor 20 Jahren konnte durch die Östrogentherapie eine Verringerung des Knochenverlustes bei Männern festgestellt werden, die auf Grund von Prostatakrebs orchietomiert wurden (Eriksson et al. 1995). Gleiches wurde auch von Reutrakul et al. (1998) bei Männern mit Geschlechtsumwandlungen gezeigt (Reutrakul et al. 1998). Barrett-Conno et al. (2000) untersuchten Wirbelkörperfrakturen bei Männern und führten diese unter anderem auf Östrogenmangel zurück (Barrett-Connor et al. 2000). Es existieren zahlreiche weitere Studien, die geringe Östrogenspiegel und Osteoporose beim Mann miteinander in Verbindung bringen (Carlsen et al. 2000, Gillberg et al. 1999, Ohlsson und Vandenput 2009, Pernow et al. 2009, Szulc et al. 2001, Vandenput und Ohlsson 2009).

Sehmisch et al. (2010) beschreiben positive Auswirkungen von E2 auf den kortikalen Knochen. Ihre Versuchstiere waren weibliche Ratten, die nach Ovx innerhalb von 2 Monaten eine Osteopenie entwickelten. Anschließend wurden ihnen für 35 Tage verschiedene Testsubstanzen (E2, GEN, EQ) zugefüttert. Im Gegensatz zu Sehmisch et al. (2010) ist die **Kortikalis** der **E2**-Gruppe im vorliegenden Versuch zu jedem Zeitpunkt dünner als die der SF-Gruppe. Der unterschiedliche Effekt der E2-Gabe könnte am andersartigen Geschlecht liegen. Eine andere Ursache könnte in der GKV

liegen, der die Tiere des vorliegenden Versuches ausgesetzt wurden. Denn ähnlich den mit DHT versorgten Tieren haben die Ratten der E2-Gruppe nach 2 Wochen zwar einen dickeren kortikalen Knochen als die unvibrierte Kontrollgruppe, jedoch ist die Kortikalisdicke signifikant dünner als die der mit SF-Futter ernährten Tiere. Der grundsätzlich positive Effekt der GKV auf die Kortikalis, wie in der SF-Gruppe ersichtlich, wird durch die E2-Gabe unterdrückt. Nach 8-wöchiger E2-Gabe ist bei den zusätzlich vibrierten Tieren keine Auswirkung der zusätzlichen GKV auf die Kortikalis mehr zu erkennen. Der Einfluss der GKV wird nach 8-wöchiger E2-Substitution unterdrückt.

Der Messort der Kortikalisdicke könnte zusätzlich Einfluss nehmen. Bohnsack (2010) erarbeitete eine unterschiedliche Entwicklung der Kortikalisdicke unter E2-Gabe in der Meta- und Diaphyse. Der Versuchsaufbau unterscheidet sich nur durch die fehlende Trepanation und GKV. Im Versuch von Bohnsack (2010) hat die Kortikalis im Bereich der Diaphyse an Dicke zugenommen. Im Bereich der Metaphyse gab es keinen Dickenzuwachs (Bohnsack 2010). Vermutlich verläuft der Übergang der positiven bzw. negativen Kortikalisentwicklung zwischen Metaphyse und Diaphyse fließend. Die Messungen dieses Versuches lagen in der proximalen Diaphyse und somit sehr dicht an der Metaphyse. Es ist also vorstellbar, dass die Messungen noch zu nah an der Metaphyse lagen, um die Dickenzunahme im Bereich der Diaphyse, wie von Bohnsack (2010) beobachtet, feststellen zu können. Weder für E2 noch für DHT können positive Auswirkungen auf die Dicke der Kortikalis bestätigt werden.

Interessant ist ebenfalls die Auswirkung der **E2**-Gabe auf die **Spongiosa**. Im Jahre 2002 konnten Lindberg et al. (2002) unter E2-Gabe einen Erhalt der trabekulären BMD an orx Mäusen feststellen (Lindberg et al. 2002). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Lindberg et al. (2002) wurden die Spongiosaparameter im vorliegenden Versuch von den mit E2-versorgten Ratten in Kombination mit der GKV negativ beeinflusst. Bereits 2 Wochen nach Futterumtausch bzw. nach Ende der 1. Vibrationsphase liegen die Trabekelfläche und der prozentuale Trabekelanteil der E2-Gruppe sowohl unter den ermittelten Werten der Kontrollgruppe als auch unter denen der SF-Gruppe. Die Kompaktheiten sind dagegen bei allen Gruppen annähernd gleich groß. Dies führt insgesamt zu einer Ausdünnung der Trabekel. Diese

Ausdünnung der Trabekel konnte zuvor schon für die SF-Gruppe festgehalten werden. Als Ursache ist die GKV benannt worden. Fraglich ist an dieser Stelle, ob die GKV ebenfalls für die E2-Gruppe diesen Effekt hervorruft. Dafür müssen die Ratten nach 8 Wochen betrachtet werden. Auch unter E2-Substitution führt die zusätzliche Vibration sowohl bei der medianen Trabekelfläche als auch bei der prozentualen Trabekelfläche zur Flächenabnahme (Abb. 6 und 7), verglichen mit den nicht zusätzlich vibrierten Tieren. Diese Ergebnisse zusammen mit der geringen Zunahme der Kompaktheit bei den zweimal vibrierten Tieren (Abb. 8) deuten ebenfalls auf schmalere Trabekel hin. E2-Substitution in Kombination mit Vibration führt zur Ausdünnung der Trabekel. Die männliche Osteoporose wird durch die Ausdünnung der Spongiosa (Abb. 11) charakterisiert (Khosla et al. 2006, Seeman 2003). Gerade die Therapie bzw. Prävention dieser schmalen Trabekel spielen eine große Bedeutung. Doch ein Schutz dieser ausdünnenden Trabekel kann durch die Kombination von E2-Gabe und GKV nicht erreicht werden.

Die Trepanation hat sich dagegen bei den Tieren der SF-Gruppe nach 2 Wochen durch eine Massenzunahme der Trabekel gegenüber den Kontrolltieren geäußert. Der negative Einfluss der E2-Gabe in Kombination mit GKV auf die Spongiosa ist so groß, dass selbst die Trepanation die Spongiosa nach 2 Wochen nicht erhalten konnte. Dieses Ergebnis widerspricht zahlreichen Studien, die eine protektive Wirkung von E2 auf die Spongiosa beschreiben (Ashida 2010, Bohnsack 2010, Vanderschueren et al. 2004, Vandenput et al. 2002, Vanderschueren et al. 1992, Yarrow et al. 2008). Nach 8 Wochen hingegen haben die nicht zusätzlich vibrierten Ratten der E2-Gruppe sowohl eine signifikant größere Trabekelfläche als auch Kompaktheit und eine höhere prozentuale Trabekelfläche als die mit SF-Futter ernährten Tiere. Die E2-Gabe hat nach 8 Wochen zu größeren,

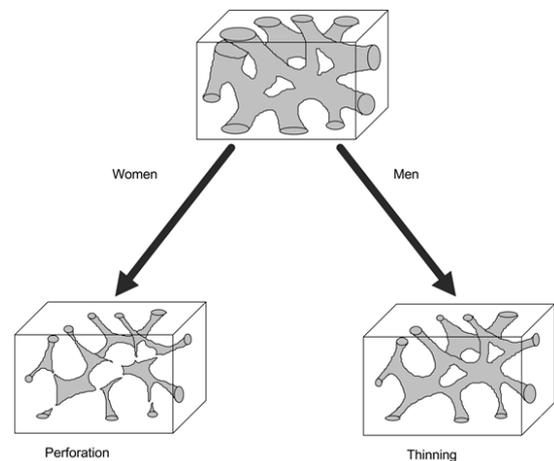


Abb. 11: Der Verlust des trabekulären Knochens in Folge der Osteoporose beim Mann und bei der Frau. Bei Frauen nimmt die Vernetzung der Trabekel ab, bei Männern dünne die Trabekel aus. Quelle: Seeman 2003, S. 2147

verzweigteren Trabekeln gegenüber den Trabekeln der mit SF-Futter versorgten Tiere geführt. Der negative Einfluss der Vibration macht sich zu diesem Zeitpunkt nicht mehr bemerkbar. Wie in zahlreichen Studien beschrieben (Ashida 2010, Bohnsack 2010, Lindberg et al. 2002, Sehmisch et al. 2008, 2010, Vanderschueren et al. 2004, Vandenput et al. 2002, Vanderschueren et al. 1992, Yarrow et al. 2008), würde die alleinige E2-Gabe die Spongiosa voraussichtlich positiv beeinflussen. Auch Bohnsack (2010) stellte an orx, nicht trepanierten und nicht vibrierten Ratten eine Zunahme der Trabekelfläche unter E2-Substitution nach 9 Wochen fest (Bohnsack 2010). Anders als bei der Kortikalis unterdrückt bei der Spongiosa nicht die E2-Gabe die positiven Effekte der GKV sondern die GKV die positiven Einflüsse der E2-Substitution.

Orwoll (2003) und Lindberg et al. (2002) sind zu dem Schluss gekommen, dass sowohl Östrogen als auch die nicht aromatisierten Androgene ähnliche Effekte auf den spongiösen Knochen des Mannes ausüben (Orwoll 2003, Lindberg et al. 2002). In dem vorliegenden Versuch verhalten sich die **Spongiosaparameter** unter **DHT**-Gabe ebenfalls ähnlich denen unter E2-Gabe. Wie auch unter E2-Gabe deuten die Ergebnisse auf größere, versponnenere Trabekel hin. Vergleichbar der E2-Gruppe ist grundsätzlich ein positiver Einfluss durch die DHT-Gabe auf die Spongiosa zu erkennen. Demnach kann ein osteogener Effekt ähnlich wie bei Orwoll (2003) und Lindberg et al. (2002) sowohl von E2 als auch DHT auf den spongiösen Knochen bestätigt werden (Orwoll 2003, Lindberg et al. 2002). Unter DHT-Gabe konnte die zusätzliche Vibration die Spongiosaparameter nicht verbessern. Die Kompaktheit und die prozentuale Trabekelfläche fallen nach 8 Wochen sogar geringer bei den zusätzlich vibrierten Ratten aus als bei den nicht zusätzlich vibrierten Tieren. Durch die gleichzeitig unveränderte mediane Fläche der Trabekel der zusätzlich vibrierten Ratten kann davon ausgegangen werden, dass unter DHT-Substitution die Vibration die Anzahl der Trabekel reduziert. Die Abnahme der Trabekelanzahl hat größere Auswirkungen auf das Frakturrisiko als die Abnahme der Trabekeldicke (Khosla et al. 2006). Diese Erkenntnis sei auch der Grund, warum Männer im Alter seltener unter Frakturen leiden als Frauen. Männer haben schon im jungen Erwachsenenalter wesentlich dickere Trabekel aufgebaut als Frauen. Nach Khosla et al. (2006) verlieren die Männer im Alter vornehmlich an

Trabekeldicke, wohingegen Frauen eher an Trabekelanzahl verlieren (Khosla et al. 2006). Gerade diese Abnahme der Trabekelanzahl neben der Abnahme der Vernetzung (Konnektivität) charakterisieren eigentlich die weibliche Osteoporose (Abb. 11). Durch die DHT-Gabe in Kombination mit der GKV wird ein spongiöser Knochen hervorgerufen, der dem osteoporotischen Zustand der Frau ähnelt (Seeman 2003). Die Abnahme der Konnektivität stellt auch beim Mann einen zusätzlichen Risikofaktor für eine Fraktur des osteoporotischen Knochens dar (Legrand et al. 2000, Oleksik et al. 2000). Die Kompaktheit ist hierbei ähnlich zu bewerten wie die Konnektivität. Deshalb wird durch die Abnahme der Kompaktheit unter DHT-Gabe in Kombination mit Vibration das Risiko einer Fraktur gesteigert. Eine Abnahme der Trabekelanzahl führt zu weniger Elastizität des Knochens (Stuermer et al. 2009). Weniger Elastizität wiederum führt unter anderem zu schnellerem Auftreten von Mikrofrakturen, die besonders beim Krankheitsbild der Osteoporose Vorstufen von Knochenfrakturen sind (Stuermer et al. 2009). Die Vibration wirkt sich in Kombination mit DHT-Substitution negativ auf die Spongiosa aus.

Tab. 8: Wirkung von DHT und E2 auf den spongiösen Knochen:

- DHT und E2 induzieren größere, verzweigtere Trabekel
- DHT in Kombination mit GKV führt zur Abnahme der Trabekelanzahl
- E2 in Kombination mit GKV ruft dünnere Trabekel hervor

5.4 Wirkung der Phytohormone GEN und EQ auf den Knochen

GEN und EQ gehören den Isoflavonen an, die zu den Phytoöstrogenen zählen. Therapeutisch werden sie als Alternative der Östrogentherapie bei Osteoporose diskutiert (Xu et al. 2009). Ein Vergleich der Phytohormone mit der klassischen Osteoporosetherapie an 780 weiblichen Patienten zeigte ähnlich gute Ergebnisse in den Lenden-, Oberschenkel-, oder Unterarm-BMD-Werten. Dagegen fielen die Nebenwirkungen signifikant niedriger aus. Als Nebenwirkungen sind beispielsweise die Erhöhung des Brust- sowie Gebärmutterkrebsrisikos, Thrombosen oder Herzinfarkte zu nennen (Carlson et al. 2008, Saunier et al. 2011). Aus diesem Grund wurde ihre Wirkung in

diesem Versuch auch auf den männlichen Knochen im Zusammenhang mit GKV und Trepanation untersucht.

Die Phytohormone wirken sich in der 2. und 3. Woche ähnlich auf die Kortikalis aus wie die Sexualhormone. Zusammen mit der GKV und Trepanation haben die Tiere der **GEN**-Gruppe nach 2 Wochen dickere **Kortikali** als die Kontrollgruppe. Jedoch ist ihre Kortikalisdicke nach 2 und 3 Wochen signifikant dünner als die der mit SF-Futter ernährten Tiere. Demnach äußert sich die erste Vibrationsphase, die vor dem Futterumtausch stattgefunden hat, unter GEN-Gabe weniger positiv auf die Kortikalis, wie es bei den mit SF-Futter ernährten Tieren der Fall ist. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Hertrampf et al. (2007), die GEN ohne gleichzeitige mechanische Belastung der Knochen keine knochenschützenden Effekte bescheinigen (Hertrampf et al. 2007).

Auffälligerweise tritt nach 8 Wochen bei den nicht zusätzlich vibrierten Tieren der GEN-Gruppe eine signifikante Zunahme der Kortikalis auf. Zu diesem Zeitpunkt ist es die dickste Kortikalis verglichen mit den anderen Versuchsgruppen. Es wurde bereits von einigen Autoren diskutiert, ob ein Verzehr von Phytohormonen über einen längeren Zeitraum notwendig ist, damit sie entsprechende Wirkungen auf den Körper hervorrufen können (Piekarz und Ward 2007, Shu et al. 2001, Ward und Piekarz 2007). Unter diesem Aspekt wäre es möglich, dass die dicke Kortikalis der nicht zusätzlich vibrierten Ratten der 8. Woche auf den längeren Zeitraum der GEN-Einwirkung zurückzuführen ist. Auch Bohnsack (2010) stellte erst nach 8 Wochen GEN-Applikation eine signifikant dickere Kortikalis in der Metaphyse gegenüber den mit SF-Futter ernährten Versuchstieren fest. In der Diaphyse lagen die Kortikalisdicken der mit GEN substituierten Tiere hingegen kontinuierlich unter denen der SF-Gruppe (Bohnsack 2010). In dem vorliegenden Versuch wurde die Dicke der Kortikalis in der proximalen Diaphyse gemessen. Vermutlich äußert sich die von Bohnsack (2010) festgestellte positive Wirkung von GEN auf die Kortikalis im Bereich der Metaphyse nach 8 Wochen auch noch in der proximale Diaphyse.

GEN in Kombination mit Bewegung können bisher keine einheitlichen Ergebnisse zugeschrieben werden. In Kombination mit Training im Laufrad werden GEN protektive Effekte auf die Knochenmineraldichte und die Dicke der tibialen Kortikalis der ovx Ratte zugeschrieben (Hertrampf et al. 2007).

In einer Studie von Wu et al. (2003) hingegen wird der GEN-Gabe zusammen mit Laufbandtraining (30 Min./d, 12 m/Min.) kein schützender Effekt auf die Kortikalis bescheinigt (Wu et al. 2003). Im vorliegenden Versuch ist die mittlere Kortikalisdicke der zusätzlich vibrierten Tiere der 8. Woche besonders auffällig. Diese Tiere haben die dickste Kortikalis zu diesem Zeitpunkt, verglichen mit allen anderen Versuchsgruppen (Abb. 5, Tab. A-1). Wenn man diese Kortikalisdicke mit der wesentlich dünneren Kortikalis der nicht zusätzlich vibrierten GEN-Gruppe zum gleichen Zeitpunkt (Tab. A-1) vergleicht, sehen wir einen besonders großen Einfluss der gleichzeitigen GKV bei den mit GEN gefütterten Tieren. GEN-Applikation bei gleichzeitiger GKV

Tab. 9: Wirkung von GEN und EQ auf die Kortikalis:

- GEN und gleichzeitige GKV äußern sich in einer starken Zunahme der Kortikalisdicke
- EQ führt in Kombination mit GKV zu dickeren Kortikali als ohne GKV
- EQ erhält den kortikalen Knochen nicht ohne GKV
- GEN und EQ induzieren dickere Kortikali als die Sexualhormone

äußert sich bei der orx Ratte in besonderer Zunahme der Kortikalisdicke. Es scheint ein entscheidender Unterschied darin zu bestehen, ob GEN zum gleichen Zeitpunkt wie die GKV verabreicht wird. Die Kortikalis der GEN-Gruppe zeigt nach der 1. GKV nur eine wesentlich geringere Kortikalisdickenzunahme als nach der 2. GKV, denn die Vibration wurde vor der GEN-Applikation beendet. Daraus lässt sich schließen, dass nur die gleichzeitige Gabe von GEN und GKV zu einer deutlichen Kortikaliszunahme führt.

Des Weiteren wurde die Gabe von EQ auf den Knochenstoffwechsel untersucht. Durch Bakterien kann EQ erst im Darm aus Daidzein metabolisiert werden. Diese Darmbakterien besitzen nur 30 bis 50 % der Menschen (Lampe 2009). EQ wird eine höhere östrogene Aktivität nachgesagt als den anderen Isoflavonen (Fonseca und Ward 2004). Wie bei den mit GEN versorgten Ratten ist auch die **Kortikalis** der mit **EQ** zugefütterten Tiere nach der 2. Woche dicker als die der Kontrollgruppe. Hingegen haben sie von der 2. bis zur 8. Woche eine dünnere Kortikalis als die Tiere der SF-Gruppe. Im Verlauf der 8 Wochen nimmt die Kortikalisdicke innerhalb der EQ-Gruppe stetig ab. EQ erhält ohne GKV nicht den kortikalen Knochen. Dies deckt sich teilweise mit einer Studie an ovx Ratten von Sehmisch et al (2010). Die Substitution von EQ ohne gleichzeitige Vibration

hatte in ihrem Versuch nur äußerst geringe Auswirkung auf die Kortikalis. Sie stellten nur 0,9 % mehr Knochenvolumen der Kortikalis bei den mit EQ gefütterten Ratten ohne mechanische Belastung gegenüber einer Kontrollgruppe fest. Allerdings lagen die Werte der mit EQ gefütterten Tiere der Arbeitsgruppe von Sehmisch et al. (2010) weit unter denen der mit E2 behandelten Ratten (-5,9 %) (Sehmisch et al. 2010). Die vorliegenden Ergebnisse hingegen zeigen, dass die Tiere der EQ-Gruppe ebenso wie die der GEN-Gruppe zu jedem Zeitpunkt dickere Kortikali haben, als die mit Sexualhormonen substituierten Ratten. Die zusätzliche GKV der 8. Woche führt unter EQ-Gabe zu dickeren Kortikali als ohne zusätzliche GKV (Abb. 5). Der Effekt der GKV auf die Kortikalis ist jedoch geringer als unter GEN-Gabe und ohne hormonelle Zusätze.

Des Weiteren ist die Auswirkung der Phytohormone auf die Spongiosa interessant. Durch die Gabe von **GEN** konnte bereits an ovx Ratten das Schwinden von **trabekulärem Knochen** reduziert werden (Fanti et al. 1998). Auch an orx Mäusen wurden ein knochenerhaltender Effekt durch GEN bestätigt (Ishimi et al. 2002). Die Arbeitsgruppe um Fanti (1998) hat unter anderem das anteilige Trabekelvolumen am Gewebevolumen des distalen Femurs vorgenommen. Sie ermittelten ohne tägliche subkutane GEN-Gabe 3,3 % anteiliges Trabekelvolumen und für die Ratten mit GEN-Gabe 5,2 % Trabekelvolumen. Die Verzweigung und die Dicke der Trabekel haben bei den mit GEN substituierten Tieren zugenommen. Auch in dem vorliegenden Versuch haben die Tiere der GEN-Gruppe im Vergleich mit der SF-Gruppe nach 8 Wochen größere, verzweigtere Trabekel und einen prozentual größeren Trabekelanteil. Die Trabekel sind gegenüber denen in der SF-Gruppe größer und stärker verzweigt. GEN hat knochenprotektive Eigenschaften auf den spongiösen Knochen der orx Ratte. Auch Bohnsack (2010) beschreibt größere und verzweigtere Trabekel unter GEN-Gabe verglichen mit SF-ernährten und orx Ratten (Bohnsack 2010). Einen knochenerhaltenden Effekt durch GEN nach Orx stellten ebenfalls Ishimi et al. (2002) fest. Verglichen mit den E2- und DHT-substituierten Ratten haben die Tiere der GEN-Gruppe nach 8 Wochen gleich große und gleichermaßen kompakte Trabekel. Die prozentuale Trabekelfläche ist jedoch geringer. Daraus ergibt sich eine geringere Trabekelanzahl als bei den Tieren der DHT- und E2-Gruppe. Innerhalb der GEN-Gruppe ist über

den Versuchszeitraum hinweg bei steigender Fläche und Kompaktheit der Trabekel ebenfalls eine Abnahme der prozentualen Trabekelfläche zu verzeichnen. Demnach werden unter GEN-Applikation die Trabekel vernetzter, ihre Anzahl nimmt hingegen ab. Eine geringere Trabekelanzahl erhöht das Frakturrisiko (Khosla et al. 2006). Der protektive Effekt von GEN auf die Spongiosa ist geringer als der von DHT und E2. Sehmisch et al. (2010) belegten an der ovx Ratte unter EQ- und E2-Gabe eine erhöhte Anzahl an Knotenpunkten in der Spongiosa gegenüber den mit GEN gefütterten Ratten (Sehmisch et al. 2010). Im vorliegenden Versuch wurden nicht die Knotenpunkte gezählt, sondern die Kompaktheit der einzelnen angeschnittenen Trabekel ermittelt. Sowohl die Kompaktheit als auch die Anzahl der Knotenpunkte geben einen Wert für die räumliche Vernetzung der Spongiosa wider und können somit verglichen werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Sehmisch et al. (2010) hat die Kompaktheit in diesem Versuch unter GEN-Gabe nach 8 Wochen genauso gute Ergebnisse erbracht wie die unter E2- und EQ-Gabe und signifikant größere als SF.

Interessant ist auch den Einfluss von der GEN-Gabe in Kombination mit GKV zu klären. Die zusätzlich vibrierten Ratten der GEN-Gruppe haben nach 8 Wochen eine geringere Trabekelfläche, eine niedrigere Kompaktheit und eine fast gleiche prozentuale Gesamtfläche verglichen mit den nicht zusätzlich vibrierten Tieren. Die Vibration hat zur Abnahme der Trabekelgröße und Zunahme der Trabekelanzahl geführt. Wu et al. (2003) stellten eine Dickenzunahme der Trabekel, eine Abnahme der Trabekel-separation und eine Zunahme des Trabekelvolumens der Mäuse mit GEN-Applikation und Bewegung gegenüber denen mit GEN-Gabe ohne Bewegung fest (Wu et al. 2003). Diese Ergebnisse stehen nicht eindeutig im Einklang

Tab. 10: Wirkung von GEN und EQ auf den spongiösen Knochen:

- GEN schützt den spongiösen Knochen
- GEN führt zu größeren, vernetzteren Trabekeln
- GEN wirkt auf Spongiosa weniger protektiv als die Sexualhormone
- GEN + Vibration induziert kleinere Trabekel und die Trabekelanzahl nimmt zu
- EQ ruft größere, vernetztere Trabekel hervor
- EQ + gleichzeitige Vibration induziert wesentlich größere und vernetztere Trabekel als ohne Vibration
- EQ + gleichzeitige Vibration hat protektivere Effekte auf die Spongiosa als alle anderen getesteten Hormone

mit denen aus diesem Versuch. Die Messungen von Wu et al. (2003) fanden am Femur der 7 Wochen alten orx Maus statt (Wu et al. 2003). Die Abnahme der Trabekelseparation und die Dickenzunahme der Trabekel können nur dann mit unseren Ergebnissen übereinstimmen, wenn das größer werdende Knochenvolumen im Versuch von Wu et al. (2003) durch eine stärkere Zunahme der Trabekelanzahl als in diesem Versuch zustande gekommen ist.

Als weiteres Phytohormon wurde EQ verabreicht. Die prozentuale Trabekelfläche der **Spongiosa** ist bei den Ratten der **EQ**-Gruppe nach 2 Wochen um mehr als die Hälfte größer als in der Kontrollgruppe. Gleichzeitig ist die mediale Trabekelfläche größer und die Kompaktheit kleiner. Die Tiere der EQ-Gruppe haben nach 2 Wochen dickere Trabekel als die Ratten der Kontrollgruppe. Die starke Massenzunahme der Spongiosa lässt sich auf die vorhergegangene GKV zurückführen. Dies kann durch den Vergleich der zusätzlich und nicht zusätzlich vibrierten Ratten nach 8 Wochen abgeleitet werden. Die zusätzlich vibrierten Tiere haben eine um 43 % größere prozentuale Trabekelfläche. Zusätzlich ist die mediane Trabekelfläche um 19,5 % und die Kompaktheit um 9,6 % größer als ihre nur einmal vibrierte Vergleichsgruppe nach 8 Wochen. Diese Parameter der zusätzlich vibrierten Tiere der EQ-Gruppe sind ebenfalls signifikant größer als die der zweimal vibrierten und mit SF-Futter gefütterten Tiere der gleichen Serie. Diese Ergebnisse zeigen, dass GKV unter EQ-Gabe größere und verzweigtere Trabekel induziert. Auch nach 8 Wochen ohne zusätzliche Vibration ist die prozentuale Trabekelfläche der Ratten unter EQ-Gabe (11,01 %) um 4 % größer als die der mit SF-Futter ernährten Tiere (7,89 %). Der Medianwert der Trabekelfläche und die Kompaktheit sind auch größer. Die Trabekel haben sich durch die alleinige EQ-Gabe gegenüber den SF-Tieren vergrößert und an Vernetzung zugenommen. Dieser knochenprotektive Effekt ist bei gleichzeitiger GKV wesentlich größer. Sehmisch et al. (2010) führten einen ähnlichen Versuch an ovx Ratten ohne körperliches Training durch. Nachdem die Tiere eine Osteopenie ausgebildet hatten, stellten sie das Futter auf die Testsubstanzen um. Fünf Wochen nach Futterumtausch wiesen die mit EQ und E2 behandelten Tiere wesentlich mehr Knotenpunkte in der Spongiosa auf als die Tiere der GEN- und der mit SF-Futter ernährten Referenzgruppe (Sehmisch et al. 2010).

Wir vergleichen an dieser Stelle die Knotenpunkte der Trabekel aus dem Versuch von Sehmisch et al. (2010) mit der Kompaktheit aus dem vorliegenden Versuch. Hierbei stimmen die Ergebnisse bezüglich der EQ-Gruppe nur teilweise mit denen von Sehmisch et al. (2010) überein. In dem vorliegenden Versuch ist die Kompaktheit der mit EQ-zugefütterten Ratten nach 3 Wochen kleiner und nach 8 Wochen ohne zusätzliche Vibration größer als die der mit SF-Futter ernährten Tiere. Verglichen mit den Ratten unter GEN-Gabe ist die Kompaktheit nach 3 Wochen und 8 Wochen ohne zusätzliche Vibration kleiner. Mit zusätzlicher Vibration ist die Kompaktheit in der EQ-Gruppe größer als in allen anderen Versuchsgruppen außer der E2-Gruppe. Entweder haben sich diese Unterschiede aufgrund der verschiedenen Geschlechter ergeben oder der Ausgangspunkt der Knochenschädigung ist ursächlich. In dem vorliegenden Versuch wurde im Gegensatz zu dem Versuch von Sehmisch et al. (2010) mit dem Futterumtausch begonnen, als die Ratten noch keine Osteopenie ausgebildet hatten. Es wären weitere Versuchsreihen nötig, um den Einfluss der Knochenschädigung zum Zeitpunkt der Hormongabe auf die Spongiosa zu klären.

5.5 Wirkung der Hormone auf die Epiphysenfuge der orx Ratte

Die Epiphysenfuge ist ein Bereich zwischen Metaphyse und Epiphyse des Röhrenknochens, der den Ort des Längenwachstums darstellt (Milz et al. 2002). In der Kieferorthopädie stellt die Epiphyse ein diagnostisches Mittel zur Ermittlung des knöchernen Entwicklungsstands von Kindern dar. Das anatomische Alter kann anhand von Röntgenaufnahmen der linken Hand bestimmt werden (Methode nach Greulich und Pyle). Mit dem Ende der Pubertät verknöchert die Epiphysenfuge beim Menschen vollständig. Dieser Prozess wird in beiden Geschlechtern vor allem durch Östrogene reguliert (Compston 2001, Mohnike und Richter-Unruh 2013, Perry 2008). Das Knochenwachstum der Ratte ist mit dem des Menschen vergleichbar (Hughes und Tanner 1970, Van der Eerden 2002). Allerdings schließt sich die Epiphysenfuge bei der Ratte nicht mit dem Ende ihrer sexuellen Reifung, sondern erst viel später im Leben (Hughes und Tanner 1970, Van der Eerden 2002). Obwohl die Epiphysenfuge der Ratte erst sehr spät

geschlossen wird, nimmt ihr Wachstum mit dem Alter stetig ab (Van der Eerden 2002).

Alle getesteten Hormone wirken auf die Epiphysenfuge durch eine kontinuierliche Abnahme ihrer Breite. Durch die Orx wird die Abnahme der Epiphysenfugenbreite verzögert. Dieses Ergebnis stimmt mit einer Studie an ovx Mäusen überein, an denen die Dickenabnahme der Epiphysenfuge gegenüber den intakten Mäusen langsamer voranschreitet (Yao et al 2006). Unter Östrogenzufuhr nimmt hingegen die Proliferation der Chondrozyten ab, was beim Menschen zur schnelleren Verknöcherung der Epiphysenfuge führt (Weise et al. 2001). Aus diesem Grund haben die Tiere der E2-Gruppe zu jedem Zeitpunkt die schmalste Epiphyse. Sie nimmt ebenfalls von der 2. bis zur 8. Woche kontinuierlich ab. Diese zunehmend schmaler werdende Epiphysenfuge deckt sich mit zahlreichen Studien (Compston 2001, Kapur et al 2010, Milz et al. 2002). Compston (2002) stellten an Nagern und Kaninchen sogar fest, dass durch einen E2-Mangel die Epiphysenfuge gegenüber einer Kontrollgruppe nicht im gleichen Maße geschlossen wurde. Bei ovx Ratten konnte hingegen durch E2-Substitution die Reduktion der gesamten Wachstumsplatte induziert werden (Compston 2002).

Die Phytohormone GEN und EQ besitzen die strukturellen Eigenschaften der Östrogene. Deshalb können sie sowohl östrogene als auch antiöstrogene Eigenschaften haben (Sargeant et al. 1993, Wolters und Hahn 2004). Unter diesem Gesichtspunkt läge es nahe, dass diese Phytohormone in gleicher Art und Weise auf die Epiphysenfuge wirken wie E2. Auch in den GEN- und EQ-Gruppen ist eine kontinuierlich schmaler werdende Epiphyse über die 8 Wochen anhaltende Gabe zu erkennen. Sie ist allerdings zu jedem Zeitpunkt zwischen 20 und 30 µm dicker als die der mit E2 versorgten Tiere. Die Phytohormone haben auf die Epiphysenfuge eine geringere östrogene Wirkung als E2.

Tab. 11: Wirkung der Hormone auf die Epiphysenfuge:

- Orx verzögert die Abnahme der Epiphysenfugenbreite
- Unabhängig von der Hormongabe nimmt die Epiphysenfuge im Zeitverlauf an Dicke ab
- E2 induziert die stärkste Abnahme der Epiphysenfugendicke
- GKV hat keinen Einfluss auf die Dicke der Epiphysenfuge

Die zusätzlich vibrierten Gruppen unterscheiden sich in der Dicke der Epiphysenfuge kaum von ihren nicht zusätzlich vibrierten Vergleichsgruppen. Die Vibration hat offensichtlich keinen Einfluss auf die Verknöcherung der Epiphysenfuge. Dennoch haben nach 2 Wochen die Ratten der Kontrollgruppe eine nicht signifikant dickere Epiphysenfuge als die Tiere der SF-Gruppe. Diese beiden Gruppen unterscheiden sich nur durch die Trepanation und die GKV in der SF-Gruppe. Da durch die Ergebnisse der 8. Woche ein Einfluss der GKV ausgeschlossen werden kann, muss die Trepanation zu einer schnelleren Abnahme der Epiphysenfugenbreite geführt haben.

5.6 Wirkung der Hormone auf den tibialen Gelenkknorpel

Die Auswertung der Gelenkknorpel gestaltete sich schwieriger, denn in den histologischen Präparaten war der Knorpel meistens vom Knochen abgelöst und zerstört. Die Messungen beruhen fast immer nur auf Anteilen des Knorpels. Demnach können die Ergebnisse der Gelenkknorpeldicke lediglich als Tendenzen angesehen werden.

Der tibiale Gelenkknorpel ist bisher bei der Erforschung der Osteoporose nur wenig berücksichtigt worden. Allerdings wird der Osteoporose bei der Frau ein Östrogenmangel auf Grund des zunehmenden Alters und der Menopause zu Grunde gelegt (Bartl 2008). Einem solchen Östrogenmangel wird ebenfalls eine höhere Inzidenz für Osteoarthritis zugesprochen (Sniekers et al. 2008). Es liegt nahe, dass Osteoporose und eine Gelenkknorpeldegeneration miteinander einhergehen (Multanen et al. 2013). Auch an Tiermodellen führte die Ovx zu Knorpeldegenerationen (Sniekers et al. 2008). Durch Östrogentherapie konnte der Gelenkknorpel von ovx Ratten hingegen geschützt werden (Oestergaard et al. 2006).

In dem vorliegenden Versuch haben die Ratten der SF-Gruppe einen tendenziell dickeren Gelenkknorpel als die Tiere der Kontrollgruppe. Schlussfolgernd hat die vorherige GKV einen dickeren Gelenkknorpel induziert. Ein positiver Einfluss von moderatem Laufbandtraining konnte auch auf die Arthrose im Knie der männlichen Ratte festgestellt werden (Fallah Mohammadi et al. 2013).

Unter E2- und DHT-Gabe nimmt die Gelenkknorpeldicke über den Versuchszeitraum zu. In Kombination mit der GKV führen diese beiden Hormone nochmals zu einem Gelenkknorpelzuwachs. Dennoch schützen E2- und DHT-Substitution den Gelenkknorpel nicht besser als die alleinige SF-Ernährung.

Auch die Phytohormone GEN und EQ üben keine protektiveren Einflüsse auf den Gelenkknorpel aus als die SF-Medikation. Gegenüber den Sexualhormonen wirkt sich die GKV in Kombination mit den Phytohormonen nicht positiv auf den Gelenkknorpel aus.

Die alleinige GKV scheint den Gelenkknorpel am effektivsten gegen dessen Degeneration bei der orx Ratte zu schützen.

6 Zusammenfassung

Auf Grund der zunehmenden Lebenserwartung nimmt das Erkrankungsbild der Osteoporose nicht nur bei der Frau, sondern auch beim Mann zu. Therapeutische und präventive Ansätze wie zum Beispiel die Substitution der Sexualhormone DHT und E2 sowie der Phytohormone GEN und EQ sind bislang vorwiegend im Rahmen der weiblichen Osteoporose erforscht. **Ziel der vorliegenden Arbeit** war es daher zu untersuchen, ob die Gabe der oben genannten Hormone bzw. Hormonersatzstoffe die Osteoporose der orx Ratte positiv beeinflussen. Zusätzlich sollte der Einfluss einer Ganz-Körper-Vibration und der Wundheilung des Knochens auf das Knochenremodelling abgeklärt werden. Für die Auswertung wurden histologisch die Kortikalis, die Spongiosa, die Epiphysenfuge und der Gelenkknorpel der Tibia untersucht. Als Modell diente der Knochen der orx SD-Ratte. 180 Versuchstiere wurden in drei zeitlich gestaffelte Serien unterteilt und einer 4-wöchigen Vibration unterzogen. Die Hälfte der Versuchstiere der 3. Serie wurde zusätzlich ein 2. Mal über einen Zeitraum von 4 Wochen vibriert. Neben einer orx Gruppe ohne Vibration und Trepanation diente in jeder Serie eine weitere mit sojafreiem Futter versorgte, vibrierte und trepanierte Gruppe als Kontrolle.

Die Hormongabe führt zu unterschiedlichen Effekten auf die Kortikalis, die Spongiosa, die Epiphysenfuge und den Gelenkknorpel des tibialen Knochens. Durch die **Trepanation** werden die Trabekel der orx Ratte größer und verzweigter. Die **GKV** hingegen hat bei diesen Ratten eine Zunahme der Kortikalisdicke und eine Ausdünnung der Trabekel zur Folge.

Die durch die GKV induzierte Dickenzunahme der **Kortikalis** wird sowohl durch DHT- als auch E2-Gabe unterdrückt. Anders als bei den Sexualhormonen bewirkt die Gabe von EQ und besonders von GEN in Kombination mit der GKV bei der orx Ratte eine starke Zunahme der Kortikalisdicke. Im Gegensatz zu GEN scheint EQ den kortikalen Knochen der orx Ratte ohne GKV nicht auf dem Niveau der SF-Kontrollgruppe zu erhalten.

Auf die **Spongiosa** bewirkt die Kombination von E2 und GKV eine Rarifizierung der Trabekel, während DHT zusammen mit GKV die Anzahl der Trabekel reduziert. Die alleinige Substitution der Sexualhormone scheint

verzweigtere und größere Trabekel bei der orx Ratte hervorzurufen als bei reiner SF-Ernährung. Die ausschließliche Gabe der Phytohormone induziert ebenfalls größere Trabekelflächen und höher verzweigte Trabekel bei der orx Ratte. In Kombination mit der GKV werden die Trabekel unter GEN-Gabe hingegen kleiner, aber ihre Anzahl nimmt zu. Zusammen mit der GKV nehmen die Trabekel unter EQ-Gabe stark an Größe und Verzweigung zu. In dieser Kombination wirkt nur die Gabe von EQ positiv auf die Spongiosa.

Unabhängig von der Gabe der verschiedenen Hormone bzw. Hormonersatzstoffe nimmt die Dicke der **Epiphysenfuge** in allen Versuchsgruppen ab. Die E2-Substitution induziert eindeutig die stärkste Abnahme der Epiphysenfugendicke. Die GKV hat keinen Einfluss auf die Dicke der Epiphysenfuge genommen.

Alle getesteten Hormone bzw. Hormonersatzstoffe haben im Gesamtverlauf des Versuches keine eindeutig protektive Eigenschaft auf den tibialen **Gelenknorpel** im Vergleich zur SF-Gruppe. Die GKV scheint den Gelenknorpel am effektivsten zu schützen.

Im Gesamtkontext der Untersuchung scheint insbesondere die Gabe von EQ in Kombination mit der Ganz-Körper-Vibration den verlässlichsten therapeutischen bzw. präventiven Ansatz zur Behandlung der männlichen Osteoporose darzustellen.

7 Anhang

Tabellen

Tab. A-1: Übersicht über die Anfertigung der **Goldner-Färbung**. Angegeben sind die einzelnen Bearbeitungsschritte, die Dauer der Anwendung und die Zusammensetzung der Lösungen.

Arbeitsschritt	Dauer (Min)
1. Hämatoxylin nach Weigert	10
2. „Bläuen“ in Leitungswasser	10
3. Ponceau de Xylidine (2 g) + Säurefuchsin (1 g) + Essigsäure (0,4 ml, 1%) + Wasser (200 ml dest.)	45
4. Spülen in Essigsäure (1 %)	1
5. Abspülen mit Wasser (dest.)	
6. Wolframatophosphorsäure (2 g) + Orange G (1 g) + Wasser (200 ml dest.)	7
7. Spülen in Essigsäure (1 %)	1
8. Lichtgrün (0,4 g) + Essigsäure (0,4 ml) + Wasser (200 ml dest.)	10
9. Auswaschen mit Essigsäure (1 %)	
10. Entwässern in Ethanol (96 % und 100 %)	je 5
11. Einlegen in Xylol	5

Tab. A-2: Deskriptive Statistik der Meßwerte der **Kortikalisdicke** der Tibia bei der Kontrollgruppe (KG = Tiere, die sojafrei ernährt wurden, Orx erhielten und nicht trepaniert und gerüttelt wurden) und den Gruppen SF, DHT, E2, GEN und EQ (ANOVA mit Holm-Sidak-Test gegen eine Kontrollgruppe); N (Anzahl der Messungen), Mean (Mittelwert), Std Dev (Standardabweichung), SEM (Standardfehler vom Mittelwert) Signifikanz: ja= $p < 0,001$

<i>Group Name</i>	<i>N</i>	<i>Mean</i> (μm)	<i>Std Dev</i> (μm)	<i>SEM</i> (μm)	<i>Signifikanz</i> SF vs. Gruppen	<i>Signifikanz</i> KG vs. Gruppen
KG	157	552,200	120,394	9,6		--
SF 2W	162	716,585	192,105	15,1	--	ja
DHT 2W	149	621,561	170,482	14,014	ja	Ja
E2 2W	120	626,516	169,900	15,575	ja	ja
GEN 2W	135	654,533	89,323	7,716	ja	ja
EQ 2W	161	632,855	135,052	10,677	ja	ja
SF 3W	125	605,604	131,086	11,772	--	ja
DHT 3W	141	635,398	158,548	13,400	nein	ja
E2 3W	134	539,174	103,362	8,963	ja	nein
GEN 3W	99	560,918	72,768	7,351	p=0,007	nein
EQ 3W	126	562,206	122,870	10,990	p=0,006	nein
SF 8W	92	591,141	90,003	9,435	--	p=0,036
DHT 8W	125	526,275	131,402	11,800	ja	nein
E2 8W	92	537,554	83,596	8,763	ja	nein
GEN 8W	128	596,323	85,205	7,561	nein	ja
EQ 8W	91	560,204	69,255	7,300	nein	nein
SF 8W vib.	65	708,8	179,0	22,4	--	ja
DHT 8W vib.	68	529,0	94,5	11,5	ja	nein
E2 8W vib.	92	529,0	72,2	7,6	ja	nein
GEN 8W vib.	64	746,3	193,9	24,4	nein	ja
EQ 8W vib.	63	604,5	78,5	10,0	ja	p<0,006

Tab. A-3: Deskriptive Statistik der Meßwerte der **Trabekelfläche** der Tibia bei der Kontrollgruppe (KG = Tiere, die sojafrei ernährt wurden, Orx erhielten und nicht trepaniert und gerüttelt wurden) und den Gruppen SF, DHT, E2, GEN und EQ (Kruskal-Wallis Anova der Ränge und multipler Vergleich nach Dunn); Mean (Mittelwert), Std Dev (Standardabweichung), SEM (Standardfehler vom Mittelwert), Signifikanz: ja=p<0,05

<i>Group Name</i>	<i>N</i>	<i>Mean</i> (μm^2)	<i>Std Dev</i> (μm^2)	<i>SEM</i> (μm^2)	<i>Signifikanz</i> SF vs. Gruppen	<i>Signifikanz</i> KG vs. Gruppen
KG	435	6554,4	2594,4	15584,9		--
SF 2W	406	8216,4	2816,3	20399,7	--	nein
DHT 2W	381	7321,6	3111,5	19691,9	nein	nein
E2 2W	344	5247,3	2133,8	14688,9	ja	nein
GEN 2W	332	7014,7	2563,0	25440,8	nein	nein
EQ 2W	352	7949,4	3018,9	27431,3	nein	ja
SF 3W	386	5004,8	1643,3	13393,7	--	ja
DHT 3W	389	7167,6	2577,4	20134,1	ja	nein
E2 3W	342	5474,5	2277,2	17193,3	nein	nein
GEN 3W	190	7437,5	2582,1	19138,5	ja	nein
EQ 3W	388	6379,9	2705,9	16596,0	ja	nein
SF 8W	244	6342,4	2903,6	15120,4	--	nein
DHT 8W	298	10267,3	3809,8	25649,5	ja	ja
E2 8W	230	9345,5	3738,1	28816,9	ja	ja
GEN 8W	215	9253,0	2914,1	26595,9	ja	ja
EQ 8W	149	7582,2	3007,2	15991,3	nein	nein
SF 8W vib.	207	5815,3	2581,5	14598,7	--	nein
DHT 8W vib	100	10297,8	3400,5	25978,4	ja	nein
E2 8W vib.	140	7982,2	3148,1	24018,8	nein	nein
GEN 8W vib	155	6569,6	2931,7	19170,1	nein	nein
EQ 8W vib.	239	10168,9	4593,7	23411,3	ja	ja

Tab. A-4: Deskriptive Statistik der **Summe der Trabekelflächen** im Verhältnis zur Messfläche bei der Kontrollgruppe (KG = Tiere, die sojafrei ernährt wurden, Orx erhielten und nicht trepaniert und gerüttelt wurden) und den Gruppen SF, DHT, E2, Gen und EQ; Σ Trb-FI (Summe der Trabekelanschnitte), Bilder (Anzahl der ausgewerteten Bilder), Σ Bild-FI (Summe der Bildflächen, ein Bild=5785510,627 μm^2 =5,79 mm^2), prozentuale Trb-FI (Anteil der Trabekelfläche an der Messfläche)

<i>Gruppe</i>	Σ Trb-FI (μm^2)	Bilder (N)	Σ Bild-FI (μm^2)	prozentuale Trb-FI (%)
<i>KG</i>	6129628,85	10	57855106,27	10,59
<i>SF 2W</i>	8232610,86	12	69426127,52	11,86
<i>DHT 2W</i>	7555425,54	12	69426127,52	10,88
<i>E2 2W</i>	6577738,19	12	69426127,52	9,47
<i>GEN 2W</i>	8408268,36	12	69426127,52	12,11
<i>EQ 2W</i>	12307181	12	69426127,52	17,73
<i>SF 3W</i>	5473576,21	9	52069595,6	10,51
<i>DHT 3W</i>	8325007,96	10	57855106,3	14,39
<i>E2 3W</i>	6089856,36	10	57855106,3	10,53
<i>GEN 3W</i>	4038650,65	8	46284085	8,73
<i>EQ 3W</i>	6756492,74	10	57855106,3	11,68
<i>SF 8W</i>	3650662,2	8	46284085	7,89
<i>DHT 8W</i>	8171363,5	10	57855106,3	14,12
<i>E2 8W</i>	7099363,16	8	46284085	15,34
<i>GEN 8W</i>	5443094,8	9	52069595,6	10,45
<i>EQ 8W</i>	3851277,83	6	34713063,8	11,09
<i>SF 8W vib.</i>	2985564,7	8	46284085	6,45
<i>DHT 8W vib.</i>	3316283,19	6	34713063,8	9,55
<i>E2 8W vib.</i>	3580005,7	6	34713063,8	10,31
<i>GEN 8W vib.</i>	2924260	5	28927553,1	10,11
<i>EQ 8W vib.</i>	7352415,22	8	46284085	15,89

Tab. A-5: Deskriptive Statistik der Meßwerte der **Kompaktheit** der Trabekel bei der Kontrollgruppe (KG = Tiere, die sojafrei ernährt wurden, Orx erhielten und nicht trepaniert und gerüttelt wurden) und den Gruppen SF, DHT, E2, Gen und EQ (Kruskal-Wallis Anova der Ränge und multipler Vergleich nach Dunn); N (Anzahl der Messungen), Mean (Mittelwert), Std Dev (Standardabweichung), SEM (Standardfehler vom Mittelwert), Signifikanz: ja= $p < 0,05$

<i>Gruppe</i>	<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>Std Dev</i>	<i>SEM</i>	<i>Signifikanz</i> SF vs. Gruppen	<i>Signifikanz</i> KG vs. Gruppen
KG	436	22,3	16,9	34,562		--
SF 2W	406	23,1	17,175	36,015	--	nein
DHT 2W	381	22,1	17,259	35,6	nein	nein
E2 2W	344	22,5	16,845	36,101	nein	nein
GEN 2W	332	21,5	16,877	36,838	nein	nein
EQ 2W	352	21,4	16,605	38,983	nein	nein
SF 3W	386	23,997	17,578	35,939	--	nein
DHT 3W	389	22,581	17,297	34,512	nein	nein
E2 3W	342	22,798	17,832	38,844	nein	nein
GEN 3W	190	23,796	17,184	36,137	nein	nein
EQ 3W	388	22,481	17,204	38,216	nein	nein
SF 8W	244	18,866	15,994	28,38	--	ja
DHT 8W	298	23,636	17,699	36,508	ja	nein
E2 8W	230	24,415	18,537	41,127	ja	ja
GEN 8W	215	24,572	17,55	36,603	ja	nein
EQ 8W	149	20,483	16,884	32,885	nein	nein
SF 8W vib.	207	19,977	16,082	30,801	--	nein
DHT 8W vib.	100	20,75	16,936	40,742	nein	nein
E2 8W vib.	140	24,649	17,779	40,958	ja	nein
GEN 8W vib.	155	21,694	16,806	33,039	nein	nein
EQ 8W vib.	239	23,38	17,447	44,048	ja	nein

Tab. A-6: Deskriptive Statistik der Meßwerte der Dicke der **Epiphysenfuge** der Tibia bei der Kontrollgruppe (KG = Tiere, die sojafrei ernährt wurden, Orx erhielten und nicht trepaniert und gerüttelt wurden) und den Gruppen SF, DHT, E2, Gen und EQ (ANOVA mit Holm-Sidak-Test gegen eine Kontrollgruppe); Mean (Mittelwert), Std Dev (Standardabweichung), SEM (Standardfehler vom Mittelwert), Signifikanz: ja=p<0,001

<i>Group Name</i>	<i>N</i>	<i>Mean</i> (μm)	<i>Std Dev</i> (μm)	<i>SEM</i> (μm)	<i>Signifikanz</i> SF vs. Gruppen	<i>Signifikanz</i> KG vs. Gruppen
KG	185,0	197,8	45,3	3,3		--
SF 2W	212,0	190,4	47,0	3,2	--	nein
DHT 2W	218,0	177,9	41,9	2,8	ja	ja
E2 2W	173,0	150,2	29,1	2,2	ja	ja
GEN 2W	235,0	172,9	35,5	2,3	ja	ja
EQ 2W	170,0	179,0	43,2	3,3	ja	ja
SF 3W	207,0	175,2	31,9	2,2	--	ja
DHT 3W	263,0	172,0	38,1	2,4	nein	ja
E2 3W	220,0	136,2	34,1	2,3	ja	ja
GEN 3W	172,0	164,6	30,8	2,4	p<0,003	ja
EQ 3W	200,0	160,4	29,8	2,1	ja	ja
SF 8W	147,0	147,9	29,0	2,4	--	ja
DHT 8W	159,0	149,4	28,6	2,3	nein	ja
E2 8W	135,0	131,0	27,7	2,4	ja	ja
GEN 8W	176,0	154,6	28,2	2,1	nein	ja
EQ 8W	125,0	147,6	22,6	2,0	nein	ja
SF 8W vib.	173,0	150,2	24,5	1,9	--	ja
DHT 8W vib.	131,0	148,4	28,5	2,5	nein	ja
E2 8W vib.	172,0	134,2	25,2	1,9	ja	ja
GEN 8W vib.	111,0	148,6	25,3	2,4	nein	ja
EQ 8W vib.	147,0	147,9	27,0	2,2	nein	ja

Tab. A-7: Deskriptive Statistik der Meßwerte der Dicke des **Gelenkknorpels** der Tibia im Kniebereich bei der Kontrollgruppe (KG = Tiere, die sojafrei ernährt wurden, Orx erhielten und nicht trepaniert und gerüttelt wurden) und der Gruppen SF, DHT, E2, Gen und EQ (ANOVA der Ränge mit Dunn-Test gegen eine Kontrollgruppe); Mean (Mittelwert), Std Dev (Standardabweichung), SEM (Standardfehler vom Mittelwert), Signifikanz: ja= $p < 0,05$

<i>Group Name</i>	<i>N</i>	<i>Mean</i> (μm)	<i>Std Dev</i> (μm)	<i>SEM</i> (μm)	<i>Signifikanz</i> SF vs. Gruppen	<i>Signifikanz</i> KG vs. Gruppen
KG	69,0	107,2	77,7	134,3		--
SF 2W	80,0	137,7	91,7	173,9	--	nein
DHT 2W	134,0	87,7	61,2	186,5	ja	nein
E2 2W	80,0	90,6	60,1	149,9	ja	nein
GEN 2W	146,0	146,4	94,7	236,7	nein	ja
EQ 2W	126,0	134,0	91,1	203,6	nein	nein
SF 3W	67,0	105,7	69,4	139,8	--	nein
DHT 3W	157,0	91,8	68,7	142,3	nein	nein
E2 3W	101,0	178,7	101,8	262,2	ja	ja
GEN 3W	112,0	126,0	97,1	203,5	ja	nein
EQ 3W	69,0	131,4	70,5	235,2	nein	nein
SF 8W	78,0	146,9	78,6	237,2	--	ja
DHT 8W	75,0	118,3	70,6	186,5	nein	nein
E2 8W	80,0	122,0	89,1	200,8	nein	nein
GEN 8W	90,0	142,8	90,3	204,4	nein	ja
EQ 8W	57,0	151,8	114,3	194,7	nein	ja
SF 8w Vib.	63,0	150,8	101,4	198,4	--	ja
DHT 8W vib.	80,0	141,7	86,3	213,1	nein	ja
E2 8W vib.	86,0	149,8	99,9	195,3	nein	ja
GEN 8W vib.	51,0	131,3	89,2	181,7	nein	nein
EQ 8W vib.	46,0	109,8	69,6	124,3	ja	nein

8 Literaturverzeichnis

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

Ashida K, Akehi Y, Kudo T, Yanase T (2010): Bone and Men's Health. The role of androgens in bone metabolism. *Clin Calcium*. 20(2), 165-73

Barrett-Connor E, Mueller JE, von Mühlen DG, Laughlin GA, Schneider DL, Sartoris DJ (2000): Low levels of estradiol are associated with vertebral fractures in older men, but not women: the Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 85(1), 219-23

Bartl R: Osteoporose: Prävention-Diagnostik-Therapie. 3., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage; Thieme, Stuttgart 2008, 8-19, 31-33, 109-157

Bingham SA, Atkinson C, Liggins J, Bluck L, Coward A (1998): Phyto-oestrogens: where are we now? *Br J Nutr*. 79(5), 393-406

Blottner D, Salanova M, Püttmann B, Schiffli G, Felsenberg D, Buehring B, Rittweger J (2006): Human skeletal muscle structure and function preserved by vibration muscle exercise following 55 days of bed rest. *Eur J Appl Physiol*. 97(3), 261-71

Bohnsack D: Der Effekt von Phyto- und Sexualhormonen auf den osteoporotischen Knochen der männlichen Rattentibia. *Med. Diss. Göttingen* 2010

Brozowski MA, Traina AA, Deboni MC, Marques MM, Naclério-Homem MD (2012): Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Rev Bras Reumatol*. 52(2), 265-270

Carlsen CG, Soerensen TH, Eriksen EF (2000): Prevalence of low serum estradiol levels in male osteoporosis. *Osteoporos Int*. 11(8), 697-701

Carlson S, Peng N, Prasain JK, Wyss JM (2008): Effects of botanical dietary supplements on cardiovascular, cognitive, and metabolic function in males and females. *Gend Med* 5, 76-90

Center JR, Nguyen TV, Schneider D, Sambrook PN, Eisman JA (1999): Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study. *Lancet* 353, 878-82

Cheng Z, Rios GR, King CD, Coffman BL, Green MD, Mojarrabi B, Mackenzie PI, Tephly TR (1998): Glucuronidation of catechol Östrogens by expressed human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 1A1, 1A3, and 2B7. *Toxicol Sci* 45, 52-7

Compston JE (2001): Sex steroids and bone. *Physiol Rev.* 81(1), 419-447

Cummings SR, Cawthon PM, Ensrud KE, Cauley JA, Fink HA, Orwoll ES; Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Research Groups; Study of Osteoporotic Fractures Research Groups (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(10), 1550-6

Decroos K, Vanhemmens S, Cattoir S, Boon N, Verstraete W (2005): Isolation and characterisation of an equol- producing mixed microbial culture from the human faecal sample and its activity under gastrointestinal conditions. *Arch Microbiol* 183(1), 45-55

Duan Y, Turner CH, Kim BT, Seeman E (2001): Sexual dimorphism in vertebral fragility is more the result of gender differences in age-related bone gain than bone loss. *J Bone Miner Res.* 16(12), 2267-75

DVO-Leitlinien (Dachverband Osteologie) (2009): www.dv-osteologie.org, 2009

Erben RG, Eberle J, Stahr K, Goldberg M (2000): Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats: a sequential histomorphometric study. *J Bone Miner Res* 15, 1085–1098

Eriksson S, Eriksson A, Stege R, Carlstrom K (1995): Bone mineral density in patients with prostatic cancer treated with orchidectomy and with Östrogens. *Calcif Tissue Int* 57, 97–9

Fallah Mohammadi M, Hajizadeh Moghaddam A, Mirkarimpur H. (2013): The effects of a moderate exercise program on knee osteoarthritis in male wistar rats. *Iran J Basic Med Sci.* 16(5), 683-8

Fanti P, Monier MC, GengZ, Schmidt J, Morris PE, Chohen D, Malluche HH (1998): The PhytoÖstrogenGenistein Reduces Bone Loss in Short-Term Ovariectomized Rats. *Osteoporos Int* 8, 274-281

Flieger J, Karachalios T, Khaldi L, Raptou P, Lyritis G (1998): Mechanical stimulation in the form of vibration prevents postmenopausal bone loss in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 63(6), 510-4

Fonseca D, **Ward** WE (2004): Daidzein together with high calcium preserve bone mass and biomechanical strength at multiple sites in ovariectomized mice. *Bone.* 35(2), 489-97

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(2), 305-10

Frost HM, **Jee** WS (1992): On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner.* 18(3), 227-36

Gennari L, Khosla S, Bilezikian JP (2008): Östrogenand fracture risk in men. *J Bone Miner Res.* 23(10), 1548-51

Gillberg P, Johansson AG, Ljunghall S (1999): Decreased estradiol levels and free androgen index and elevated sex hormone-binding globulin levels

Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, Steinle T, Verheyen F, Linder R (2013): The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. Dtsch Arztebl Int. 110(4), 52-7

Haney EM, **Blizotes** MM (2008): Male osteoporosis: new insights in an understudied disease. Curr Opin Rheumatol. 20(4), 423-8

Herold G und Mitarbeiter: Osteoporose; in: Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung; Gerd Herold, Köln 2011, 170

Hertrampf T, Gruca MJ, Seibel J, Laudénbach U, Fritzscheier KH, Diel P (2007): The bone-protective effect of the phytoÖstrogen genistein is mediated via ER alpha-dependent mechanisms and strongly enhanced by physical activity. Bone. 40(6), 1529-35.

Hughes PC, **Tanner** JM (1970): The assessment of skeletal maturity in the growing rat. J Anat. 106, 371-402

Inada M, Matsumoto C, Miyaura C (2011): Animal models for bone and joint disease. Ovariectomized and orchidectomized animals. Clin Calcium. 21(2), 164-170

Internetquellen

www.biofachforum.ch (2010)

Ishimi Y (2010): Dietary equol and bone metabolism in postmenopausal Japanese women and osteoporotic mice. J Nutr. 140, 1373S-6S

Ishimi Y, Yoshida M, Wakimoto S, Wu J, Chiba H, Wang X, Takeda K, Miyaura C (2002): Genistein, a Soyabean Isoflavone, Affects Bone Marrow Lymphopoiesis and Prevents Bone Loss in Castrated Male Mice. Bone 1, 180-185

Jackson RL, Greiwe JS, Schwen RJ (2011): Emerging evidence of the health benefits of S-equol, an Östrogenreceptor β agonist. *Nutr Rev.* 69(8), 432-48

Janssens H, **Vanderschueren** DM (2000): Endocrinological aspects of aging in men: is hormone replacement of benefit? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 92, 7-12

Jin JS, Nishihata T, Kakiuchi N, Hattori M (2008): Biotransformation of C-glucosylisoflavone puerarin to Östrogenic (3S)- equol in co- culture of two human intestinal bacteria. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1621- 1625

Juma SS, Ezzat-Zadeh Z, Khalil DA, Hooshmand S, Akhter M, Arjmandi BH (2012): Soy protein with or without isoflavones failed to preserve bone density in gonadal hormone-deficient male rat model of osteoporosis. *Nutr Res.* 32(9), 694-700

Kapur P, Wuttke W, Jarry H, Seidlová-Wuttke D (2010): Beneficial effects of beta-Ecdysone on the joint, epiphyseal cartilage tissue and trabecular bone in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17(5), 350-5

Khalil DA, Lucas EA, Smith BJ, Soung DY, Devareddy L, Juma S, Akhter MP, Recker R, Arjmandi BH (2005): Soy isoflavones may protect against orchidectomy-induced bone loss in aged male rats. *Calif Tissue Int* 76, 56-62

Khosla S, Melton LJ 3rd, Atkinson EJ, O'Fallon WM (2001): Relationship of serum sex steroid levels to longitudinal changes in bone density in young versus elderly men. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(8), 3555-61

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(1), 124-31

Kressig R, Proust J (1998): Physical activity and aging. Schweiz Med Wochenschr. 128(31-32), 1181-6

Kolios L, Sehmisch S, Daub F, Rack T, Tezval M, Stürmer KM, Stürmer EK (2009): Equol but not genistein improves early metaphyseal fracture healing in osteoporotic rats. Planta Med 75, 459-65

Kudlacek S (2008): Androgendefizit als Ursache der Osteoporose beim Mann. Journal für Mineralstoffwechsel 15, 3-32

Kudlacek S, Freudenthaler O, Willvonseder R (1999): Einfluss androgener Hormone auf den Knochenstoffwechsel des Mannes. Journal für Urologie und Urogynäkologie 6 (Sonderheft 2, Ausgabe für Österreich), 17-19

Kuiper GGJM, 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 estrogenreceptor beta. Endocrinology 139, 4252-4263

Kulling SE, Watzl B (2003): Phytoöstrogene. Ernährungsumschau 50, 234-239

Kurland ES, Cosman F, McMahon DJ, Rosen CJ, Lindsay R, Bilezikian JP (2000): Parathyroid hormone as a therapy for idiopathic osteoporosis in men: effects on bone mineral density and bone markers. J Clin Endocrinol Metab 85, 3069-76

Kwak HS, Park SY, Kim MG, Yim CH, Yoon HK, Han KO (2009): Marked individual variation in isoflavone metabolism after a soy challenge can modulate the skeletal effect of isoflavones in premenopausal women. J Korean Med Sci. 24(5), 867-73

Lampe JW (2009): Is equol the key to the efficacy of soy foods? Am J Clin Nutr. 89(5), 1664S-1667S

Lee YB, Lee HJ, Kim KS, Lee JY, Nam SY, Cheon SH, Sohn HS (2004): Evaluation of the Preventive Effect of Isoflavone Extract on Bone Loss in Ovariectomized Rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 1040-1045

Legrand E, Chappard D, Pascaretti C, Duquenne M, Krebs S, Rohmer V, Basle MF, Audran M (2000): Trabecular bone microarchitecture, bone mineral density, and vertebral fractures in male osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 15(1), 13-9.

Lindberg MK, Movérare S, Skrtic S, Alatalo S, Halleen J, Mohan S, Gustafsson JA, Ohlsson C (2002): Two different pathways for the maintenance of trabecular bone in adult male mice. *J Bone Miner Res.* 17(4), 555-62

Luger A (2007): Osteoporose des Mannes. *Journal für Urologie und Urogynäkologie* 14 (Sonderheft 6; Ausgabe für Österreich), 24

Lüllmann-Rauch R: Knochen; in: Taschenlehrbuch Histologie; 3. Auflage; hrsg. v. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2009, 151-155

Marini H, Minutoli L, Polito F, Bitto A, Altavilla D, Atteritano M, Gaudio A, Mazzaferro S, Frisina A, Frissina N (2007): Effects of the Phytoestrogen Genistein on Bone Metabolism in Osteopenic Postmenopausal Women :a randomized trial. *Ann Intern Med.* 146, 1-36

Maruo T, Sakamoto M, Ito C, Toda T, Benno Y (2008): *Adlerkreutzia equolifaciens* gen. nov., sp. nov., an equol- producing bacterium isolated from human faeces, and emended description of the genus *Eggerhella*. *Int Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1221- 1227

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

Mellström D, Vandenput L, Mallmin H, Holmberg AH, Lorentzon M, Odén A, Johansson H, Orwoll ES, Labrie F, Karlsson MK, Ljunggren O, Ohlsson C (2008): Older men with low serum estradiol and high serum SHBG have an increased risk of fractures. *J Bone Miner Res.* 23(10), 1552-60

Milz S, Boszczyk A, Putz R. (2002): Entwicklung und funktionelle Struktur der Epiphysenfugen. *Orthopäde* 31(9), 835-40

Mohnike K, **Richter-Unruh** A (2013): Handlungsempfehlung nach der Leitlinie *Pubertas praecox*. *Monatsschr Kinderheilkd.* 161, 153–154

Monfoulet L, Rabier B, Chassande O, Fricain JC (2010): Drilled hole defects in mouse femur as models of intramembranous cortical and cancellous bone regeneration. *Calcif Tissue Int.* 86(1), 72-81

Multanen J, Nieminen MT, Häkkinen A, Kujala UM, Jämsä T, Kautiainen H, Lammentausta E, Ahola R, Selänne H, Ojala R, Kiviranta I, Heinonen A. (2013): Effects of high-impact training on bone and articular cartilage: 12 months randomized controlled quantitative magnetic resonance imaging study. *J Bone Miner Res.* 15, 10.1002

Muthyala RS, Ju YH, Sheng S, Williams LD, Doerge DR, Katzenellenbogen BS, Helferich WG, Katzenellenbogen JA (2004): Equol, a natural Östrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S- equols and their differing binding and biological activity through Östrogenreceptors alpha and beta. *Bioorg Med Chem.* 15;12(6), 1559-67

Niethard FU, Pfeil J, Bierthaler P: Knochenerkrankungen. Duale Reihe. Orthopädie und Unfallchirurgie. 6. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage; Thieme, Stuttgart 2009, 133-145

Oestergaard S, Sondergaard BC, Hoegh-Andersen P, Henriksen K, Qvist P, Christiansen C, Tankó LB, Karsdal MA (2006): Effects of ovariectomy and estrogen therapy on type II collagen degradation and structural integrity of

articular cartilage in rats: implications of the time of initiation. *Arthritis Rheum* 54 (8), 2441-2451

Ohlsson C, Vandenput L (2009): The role of Östrogens for male bone health. *Eur J Endocrinol.* 160(6), 883-9

Oleksik A, Ott SM, Vedi S, Bravenboer N, Compston J, Lips P (2000): Bone structure in patients with low bone mineral density with or without vertebral fractures. *J Bone Miner Res.* 15(7), 1368-75

Orwoll ES (2003): Men, bone and Östrogen: unresolved issues. *Osteoporos Int.* 14(2), 93-8

Orwoll E, Ettinger M, Weiss S, Miller P, Kendler D, Graham J, Adami S, Weber K, Lorenc R, Pietschmann P, Vandormael K, Lombardi A (2000): Alendronate for the treatment of osteoporosis in men. *N Engl J Med* 343(9), 604-10

Orwoll ES, Scheele WH, Paul S, Adami S, Syversen U, Diez-Perez A, Kaufman JM, Clancy AD, Gaich GA (2003): The effect of teriparatide [Human parathyroid hormone (1-34)] therapy on bone density in men with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 18, 9-17

Otto AM (2000): PhytoÖstrogene: Potentielle Wirkstoffe zur Prävention und Therapie des Mammacarcinoms. 2. Östrogene und antiÖstrogene Pflanzenwirkstoffe. *Pharm. Unserer Zeit* 29, 91-99

Papenberg S: Beeinflussung der Knochenparameter und der Knochendefektheilung des osteoporotischen Knochens am Modell der orchidektomierten Ratte durch Vibrationstherapie in Kombination mit Dihydrotestosteron und Östradiol. *Med. Diss. Göttingen* 2011

Pan W, Quarles LD, Song LH, Yu YH, Jiao C, Tang HB, Jiang CH, Deng HW, Li YJ, Zhou HH, Xiao ZS (2005): Genistein stimulates the osteoblastic differentiation via NO/oGMP in bone marrow culture. *J Cell Biochem* 94, 307-16

Pernow Y, Hauge EM, Linder K, Dahl E, Sääf M (2009): Bone histomorphometry in male idiopathic osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 84(6), 430-8

Perry RJ, Farguharson C, Ahmed SF (2008): The role of sex steroids in controlling pubertal growth. *Clin Endocrinol* 68, 4-15

Piekarz AV, **Ward** WE (2007): Effect of neonatal exposure to genistein on bone metabolism in mice at adulthood. *Pediatr Res.* 61(1), 48-53

Prisby RD, Lafage-Proust MH, Malaval L, Belli A, Vico L (2008): Effects of whole body vibration on the skeleton and other organ systems in man and animal models: what we know and what we need to know. *Ageing Res Rev.* 7(4), 319-29.

Pschyrembel: Klinisches Wörterbuch; 261. Auflage; hrsg. v. Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin 2007, 1405, 1831

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

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: Biochemie. Duale Reihe. 2. Auflage; Thieme; Stuttgart 2008, 602-608

Reutrakul S, Ongphiphadhanakul B, Piaseu N, Krittiyawong S, Chanprasertyothin S, Bunnag P, Rajatanavin R (1998): The effects of estrogenexposure on bone mass in male to female transsexuals. *Clin Endocrinol* 49(6), 811-4

Riggs BL, Melton Iii LJ 3rd, Robb RA, Camp JJ, Atkinson EJ, Peterson JM, Rouleau PA, McCollough CH, Bouxsein ML, Khosla S (2004): Population-based study of age and sex differences in bone volumetric density, size, geometry, and structure at different skeletal sites. *J Bone Miner Res.* 19(12), 1945-54

Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd. (2002): Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev.* 23(3), 279-302

Ringe JD, Faber H, Dorst A (2001): Alendronate treatment of established primary osteoporosis in men: results from a 2-year prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 5252-5

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice PR, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresfor SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J, Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (2002): Risks and benefits of Östrogenplus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trail. *JAMA* 288(3), 321-333.

Rubinacci A, Marenzana M, Cavani F, Colasante F, Villa I, Willnecker J, Moro GL, Spreafico LP, Ferretti M, Guidobono F, Marotti G (2008): Ovariectomy sensitizes rat cortical bone to whole-body vibration. *Calcif Tissue Int.* 82(4), 316-26

Sargeant P, Farndale RW, Sage SO (1993): ADP- and thapsigargin-evoked Ca²⁺ entry and protein-tyrosine phosphorylation are inhibited by the tyrosine kinase inhibitors genistein and methyl-2,5-dihydroxycinnamate in fura-2-loaded human platelets. *Journal of Biological Chemistry* 268, 18151-18156

Saunier EF, Vivar OI, Rubenstein A, Zhao X, Olshansky M, Baggett S, Staub RE, Tagliaferri M, Cohen I, Speed TP (2011): Östrogenic Plant Extracts Reverse Weight Gain and Fat Accumulation without Causing Mammary Gland or Uterine Proliferation. *PLoS One.* 6(12), e28333

Schot LP, **Schuurs** AH (1990): Pathophysiology of bone loss in castrated animals. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 20;37(3), 461-5

Seeman E (2003): Invited Review: Pathogenesis of osteoporosis. *J Appl Physiol.* 95(5), 2142-51

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

Sehmisch S, Galal R, Kolios L, Tezval M, Dullin C, Zimmer S, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Effects of low-magnitude, high-frequency mechanical stimulation in the rat osteopenia model. *Osteoporos Int* 20(12), 1999-2008

Sehmisch S, Erren M, Kolios L, Tezval M, Seidlová-Wuttke D, Wuttke W, Stürmer KM, Stürmer EK (2010): Effects of isoflavones equol and genistein on bone quality in a rat osteopenia model. *Phytother Res Suppl* 2, 168-74

Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Pitzel L, Wuttke W (2005): Effects of estradiol-17beta, testosterone and a black cohosh preparation on bone and prostate in orchidectomized rats. *Maturitas.* 51(2), 177-86.

Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Jäger Y, Wuttke W (2008): Bone development in female rats maintained with soy-free or soy-containing food as determined by computer-assisted tomography and serum bone markers. *J Bone Miner Metab* 26, 321-7

Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E (2002): The clinical importance of the metabolite equol- a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J. Nutr.* 132, 3577- 3584

Shu XO, Jin F, Dai Q, Wen W, Potter JD, Kushi LH, Ruan Z, Gao YT, Zheng W (2001): Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10(5), 483-488.

Sims NA, Dupont S, Krust A, Clement-Lacroix P, Minet D, Resche-Rignin M, Gaillard-Kelly M, Baron R (2002): Deletion of Östrogenreceptors reveals a regulatory role for Östrogenreceptor beta in bone remodeling in females but not in males. *Bone* 30, 18-25

Sniekers YH, Weinans H, Bierma-Zeinstra SM, van Leeuwen JP, van Osch GJ (2008): Animal models for osteoarthritis: the effect of ovariectomy and estrogen treatment - a systematic approach. *Osteoarthritis Cartilage* 16 (5), 533-541

Soung DY, Devareddy L, Khalil DA (2006): Soy affects trabecular microarchitecture and favourably alters select bone-specific gene expression in a male rat model of osteoporosis. *Calif Tissue Int* 78, 385-391

Stuermer EK, Sehmisch S, Tezval M, Tezval H, Rack T, Boekhoff J, Wuttke W, Herrmann TR, Seidlová-Wuttke D, Stuermer KM (2009): Effect of testosterone, raloxifene and Östrogenreplacement on the microstructure and biomechanics of metaphyseal osteoporotic bones in orchietomized male rats. *World J Urol.* 27(4), 547-55

Sugiyama F, Wu J, Fujjoka M, Ezaki J, Takeda K, Miyaura C, Ishida T, Yamada K, Ishimi Y (2006): Sojabean isoflavones preserve bone mass in hindlimb-unloaded mice. *J Bone Miner Metab* 24, 439-446

Szulc P, Munoz F, Claustrat B, Garnero P, Marchand F, Duboeuf F, Delmas PD (2001): Bioavailable estradiol may be an important determinant of osteoporosis in men: the MINOS study. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(1), 192-9

Tezval M, Biblis M, Sehmisch S, Schmelz U, Kolios L, Rack T, Stuermer KM, Stuermer EK (2011): Improvement of femoral bone quality after low-magnitude, high-frequency mechanical stimulation in the ovariectomized rat as an osteopenia model. *Calcif Tissue Int.* 88(1), 33-40

Totosy de Zepetnek JO, Giangregorio LM, Craven BC (2009): Whole-body vibration as potential intervention for people with low bone mineral density and osteoporosis: a review. *J Rehabil Res Dev.* 46(4), 529-42

Travis RC, Spencer EA, Allen NE, Appleby PN, Roddam AW, Overvad K, Johnsen NF, Olsen A, Kaaks R, Linseisen J, Boeing H, Nöthlings U (2009): Plasma phyto-oestrogens and prostate cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Br J Cancer.* 100(11), 1817-23

Tuukkanen J, Peng Z, Väänänen HK (1994): Effect of Running Exercise on the Bone Loss Induced by Orchidectomy in the Rat. *Calcif Tissue Int.* 55(1), 33-7

Vandenput L, **Ohlsson** C (2009): Östrogens as regulators of bone health in men. *Nat Rev Endocrinol.* 5(8), 437-43

Vandenput L, **Ohlsson** C (2010): Sex steroid metabolism in the regulation of bone health in men. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 121(3-5), 582-8

Vandenput L, Boonen S, Van Herck E, Swinnen JV, Bouillon R, Vanderschueren D (2002): Evidence from the aged orchidectomized male rat model that 17beta-estradiol is a more effective bone-sparing and anabolic agent than 5alpha-dihydrotestosterone. *J Bone Miner Res.* 17(11), 2080-6

Van der Eerden BC, Gevers EF, Löwik CW, Karperien M, Wit JM (2002): Expression of estrogen receptor alpha and beta in the epiphyseal plate of the rat. *Bone* 30(3), 478-85

Van der Klift M, Pols HA, Geleijnse JM, Van der Kuip DA, Hofman A, De Laet CE (2002): Bone mineral density and mortality in elderly men and women: the Rotterdam Study. *Bone* 30:643-8

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(5), 2906-16

Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C (2004): Androgens and bone. *Endocr Rev*. 25(3), 389-425

Venken K, De Gendt K, Boonen S, Ophoff J, Bouillon R, Swinnen JV, Verhoeven G, Vanderschueren D (2006): Relative impact of androgen and Östrogenreceptor activation in the effects of androgens on trabecular and cortical bone in growing male mice: a study in the androgen receptor knockout mouse model. *J Bone Miner Res*. 21(4), 576-85

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(4), 325-30

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(4), 1462-6

Ward WE, **Piekarz** AV (2007): Effect of prenatal exposure to isoflavones on bone metabolism in mice at adulthood. *Pediatr Res* 61(4), 438-443

Weaver CM, **Legette** LL (2010): Equol, via dietary sources or intestinal production, may ameliorate Östrogen deficiency-induced bone loss. *J Nutr*. 140, 1377S-9S

Weise M, De-Levi S, Barnes KM, Gafni RI, Abad V, Baron J (2001): Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(12), 6871-6

Wenger KH, Freeman JD, Fulzele S, Immel DM, Powell BD, Molitor P, Chao YJ, Gao HS, Elsalanty M, Hamrick MW, Isales CM, Yu JC (2010): Effect of whole-body vibration on bone properties in aging mice. *Bone*. 47(4), 746-55

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 843, 1-129

Wink CS, Felts WJ (1980): Effects of castration on the bone structure of male rats: a model of osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 32(1), 77-82

Wolters M, Hahn A (2004): Sojaisoflavone – ein Therapeutikum gegen menopausale Beschwerden? *Wien Med Wochenschr* 154/13-14, 334-341

Wu J, Wang XX, Chiba H, Higuchi M, Takasaki M, Ohta A, Ishimi Y (2003): Combined intervention of exercise and genistein prevented androgen deficiency-induced bone loss in mice. *J Appl Physiol.* 94(1), 335-42

Wuttke W, Jarry H, Becker T, Schultens A, Christoffel V, Gorkow C, Seidlová-Wuttke D (2003): PhytoÖstrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas* 44, 9-20

Wuttke W, Jarry H, Seidlová-Wuttke D (2007): Isoflavones: safe food additives or dangerous drugs? *Ageing Res Rev* 6, 150-188

Xu M, Qi C, Deng B, Deng PX, Mo CW (2009): Phytotherapy versus hormonal therapy for postmenopausal bone loss: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 20(4), 519-26. Epub 2008 Sep 17

Yao X, Chen H, Ohtake N, Shoumura S (2006): Morphological alterations in the growth plate cartilage of ovariectomized mice. *Med Mol Morphol.* 39(4), 193-7

Yarrow JF, Conover CF, Purandare AV, Bhakta AM, Zheng N, Conrad B, Altman MK, Franz SE, Wronski TJ, Borst SE (2008): Supraphysiological testosterone enanthate administration prevents bone loss and augments bone strength in gonadectomized male and female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295(5), E1 213-22

Zanner R, Junqueira LC, Carneiro J: Knochen; in: Histologie; 5. Auflage; hrsg. v. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 2002, 102

Dank

Ich möchte mich an dieser Stelle recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. K. G. Wiese für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, die Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Ebenso möchte ich Prof. Dr. med. W. Wuttke und Priv. Doz. Dr. med. D. Seidlová-Wuttke danken, die beide ebenfalls maßgeblich an der Entstehung, der Untersuchung und der Durchführung des Tierexperiments beteiligt waren.

Ohne das Forschungsteam der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Erwähnung verdienen hier Frau Ahrbecker und Frau Brüggemann, die für die Anfertigung der histologischen Präparate verantwortlich waren.

Besonderer Dank gilt meiner Kommilitonin Sonja Thole für die zahlreichen Diskussionen.

Lebenslauf

Ich, Johannes Szentmiklossy von Primocz, wurde am 9. März 1984 in Hannover geboren. Meine Mutter ist eine gebürtige Räger aus Hannover. Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit und bin ledig. 1990 begann ich in Fuhrberg, bei Hannover, meine schulische Ausbildung und schloss sie 2004 in Großburgwedel mit der Allgemeinen Hochschulreife ab. Im Zeitraum vom Juli 2004 bis März 2005 leistete ich meinen Zivildienst in der Werkstatt für Behinderte des Diakoniezentrums Pestalozzi-Stiftung ab. Im Oktober 2006 begann ich das Zahnmedizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen, welches ich im Dezember 2011 mit der Zahnärztlichen Prüfung (Note: sehr gut) abschloss. Im Februar 2012 begann ich meine zahnärztliche Tätigkeit als Assistenz Zahnarzt in der väterlichen Zahnarztpraxis in Burgdorf. Im Mai 2012 wechselte ich dann in eine gemeinschaftliche Zahnarztpraxis nach Delligsen. Seit Februar 2010 arbeite ich an meiner experimentellen Dissertation in der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Georg-August-Universität Göttingen.