

Der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen  
eingereicht von Prof. Dr. med. W. Wuttke

---

**Die Wirkung von Genistein und Equol  
in Kombination mit Vibrationstraining  
auf Knochenparameter  
der orchidektomierten Ratte  
während einer Knochendefektheilung**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von  
Sara Henze  
aus  
Kyritz

Göttingen 2015

Die vorliegende Dissertation wurde in Göttingen in der Abteilung experimentelle Endokrinologie unter der Betreuung von Prof. Dr. med. W. Wuttke im Zeitraum von Mai 2009 bis Januar 2015 angefertigt.

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

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

**II. Berichterstatter:** Prof. Dr. med. Dr. med. dent. K. G. Wiese

**Tag der mündlichen Prüfung:** 16.03.2016

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
1.1	Allgemeine Grundlagen des Knochengewebes .....	8
1.1.1	Makrostruktur des Knochens .....	8
1.1.2	Mikrostruktur des Knochens .....	9
1.1.3	Spezifische Zellen des Knochens .....	11
1.1.4	Knochenumbau und Frakturheilung .....	12
1.2	Osteoporose .....	14
1.2.1	Therapie der Osteoporose .....	16
1.3	Vibrationstraining .....	16
1.4	Sexualhormone .....	18
1.5	Phytoöstrogene .....	19
1.5.1	Genistein .....	19
1.5.2	Equol .....	21
1.6	Die Ratte als Tiermodell für die Erforschung der Knochenbruchheilung bei Osteoporose .....	22
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen .....	24
2.2	Versuchsvorbereitung und Versuchsablauf .....	25
2.3	Orchidektomie (orx) .....	26
2.4	Gruppeneinteilung und Behandlung .....	27
2.4.1	Tierfutter/ Testsubstanzen .....	28
2.5	Vibrationstherapie .....	29
2.6	Computertomographie (qCT) .....	30
2.7	qCT-Gerät .....	30
2.7.1	Messvorgang .....	30
2.7.2	Messprinzip .....	31
2.8	Trepanation .....	32
2.9	Statistische Methoden .....	33
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>34</b>
3.1	Futteraufnahme .....	34
3.2	Körpergewicht .....	36
3.3	Ergebnisse der Knochenparameter der Tibia in Höhe der Metaphyse durch qCT-Messung, vier Wochen nach Orx. ....	39
3.3.1	Spongiosadichte der Tibia in Höhe der Metaphyse .....	39
3.3.2	Knochenparameter der Tibia in Höhe der Metaphyse .....	40
3.4	Ergebnisse der absoluten Muskel- und Fettgewebsfläche und deren prozentuale Flächenanteile im Unterschenkelquerschnitt vier Wochen nach Orchidektomie unter Vibrationstraining .....	41

3.4.1	Absolute Muskelfläche und Fettgewebsfläche mit prozentualem Muskelflächen und Fettgewebsflächenanteil im Unterschenkelquerschnitt in Höhe der Metaphyse .....	41
3.5	Ergebnisse der Knochenparameter der Tibia in Höhe der Metaphyse in den jeweiligen Obduktionsgruppen nach Trepanation (Trep) und Futterumstellung .....	42
3.5.1	Spongiosadichte der Tibia in Höhe der Metaphyse .....	43
3.5.2	Kortikalisdichte der Tibia in Höhe der Metaphyse .....	44
3.5.3	Gesamtquerschnittsfläche der Tibia in Höhe der Metaphyse.....	46
3.5.4	Spongiosaquerschnittsfläche der Tibia in Höhe der Metaphyse.....	47
3.5.5	Kortikalisquerschnittsfläche der Tibia in Höhe der Metaphyse .....	49
3.5.6	Periostaler Umfang der Tibia in Höhe der Metaphyse .....	50
3.5.7	Endostaler Umfang der Tibia in Höhe der Metaphyse .....	52
3.6	Ergebnisse der absoluten Muskel- und Fettgewebsfläche und deren prozentuale Flächenanteile im Unterschenkelquerschnitt in den jeweiligen Obduktionsgruppen nach Trepanation (Trep) und Futterumstellung.....	53
3.6.1	Absolute Muskelfläche und prozentualer Muskelflächenanteil im Unterschenkelquerschnitt in Höhe der Metaphyse .....	54
3.7	Absolute Fläche des paratibialen Fettes und prozentualer Fettgewebsflächenanteil im Unterschenkelquerschnitt in Höhe der Metaphyse .....	56
3.8	Tibiallänge.....	58
3.9	Beobachtung der Tiere während des Vibrationstrainings .....	59
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>60</b>
4.1	Futtermaufnahme, Körpergewicht .....	61
4.2	Betrachtung der Knochenparameter vier Wochen nach Orchidektomie und Vibrationstraining .....	61
4.3	Betrachtung der Knochenparameter nach Trepanation und Behandlung mit Genistein und Equol .....	64
4.4	Veränderungen der Muskel- und Fettgewebsfläche sowie der prozentualen Flächenanteile vier Wochen nach Orchidektomie und Vibrationstraining .....	69
4.5	Veränderungen der Muskelfläche und des Fettanteils nach Trepanation und Behandlung mit Genistein und Equol .....	70
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>76</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AR	Androgenrezeptor
BMD	Knochendichte bzw. <i>bone mineral density</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CT	Computertomograph
d	Tag bzw. <i>day</i>
DHT	Dihydrotestosteron
DVO	Dachverband Osteologie
DXA	Doppelröntgen-Absorptiometrie
E2	Estradiolbenzoat
EQ	Equol
ER	Östrogenrezeptor
et al.	et alii
Fa.	Firma
GEN	Genistein
GKV	Ganzkörpervibration
HRT	Hormonersatztherapie bzw. <i>hormone replacement therapy</i>
Hz	Hertz
KG	Körpergewicht
n	Anzahl bzw. Stichprobenumfang
non-V	Tiere ohne Vibration
Mean	Mittelwert
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
Obd.	Obduktion
Orx; orx	Orchidektomie; orchidektomiert
Ovx; ovx	Ovarektomie; ovarektomiert
pQCT	periphere quantitative Computertomographie
praeorx	vor der Orchidektomie, intakt
prox	proximal
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
s.c.	subkutan
SD-Ratten	Sprague-Dawley-Ratten

SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
SERM	selektiver Estrogenrezeptormodulator
sf	sojafrei
SHBG	Sexualhormon-bindendes-Globulin
Tab.	Tabelle
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Trep	Trepanation
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
V bzw. Vibro	Vibrationstraining
WBV	<i>whole body vibration</i> , Ganzkörpervibration
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung

# 1 Einleitung

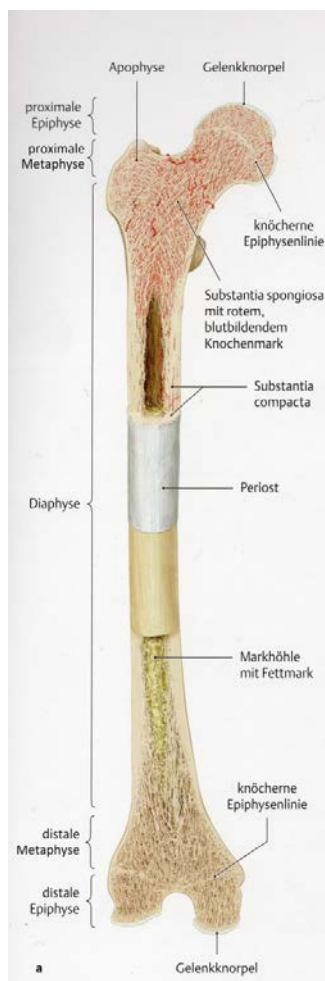
Wir leben in einer immer älter werdenden Gesellschaft. In den letzten 20 Jahren ist die Lebenserwartung für Männer und Frauen um 5-6 Jahre gestiegen. So liegt es auf der Hand, dass die Prävalenz für chronische Krankheiten, die den Alterungsprozess betreffen, steigt. Die häufigste Stoffwechselerkrankung des Knochens, die Osteoporose mit ihren Fragilitätsfrakturen, ist eine dieser Krankheiten. Ihre Prävalenz für über 50-Jährige wird in Deutschland mit 6,3 – 7,8 Millionen angegeben (Hadji et al. 2013; Haussler et al. 2007). Dabei sind ca. 24% der Frauen und 6% der Männer betroffen (Hadji et al. 2013). Auch wenn die männliche Bevölkerung unterrepräsentiert ist, gilt es, die Aufmerksamkeit darauf zu lenken. Beide Geschlechter sind oft davon betroffen, unterdiagnostiziert und unterbehandelt zu sein (DVO-Leitlinie-2009). Nur 7-20% der Patienten erhielten nach einer Osteoporose assoziierten Fraktur eine leitliniengerechte Therapie (Bartl et al. 2003; Haussler et al. 2007). Männer scheinen jedoch auf Grund der bisherigen Vorstellung, Osteoporose sei eine Krankheit der Frau, noch seltener korrekt behandelt zu werden (Drake und Khosla 2012). Dabei ist nicht nur die Mortalität nach osteoporotischen Hüftfrakturen bei Männern höher, auch kehren weniger Männer als Frauen ein Jahr nach einer Hüftfraktur in ihre vorherige Unabhängigkeit zurück. Kosten in Höhe von 5-10 Milliarden Euro belasten jährlich das deutsche Gesundheitswesen durch lange Krankenhausaufenthalte, Rehabilitationsmaßnahmen oder anhaltende Pflegebedürftigkeit (Haussler et al. 2007; Bartl et al. 2003). Hierbei werden nur 10% für Diagnostik, Prävention und Medikamente benötigt (Bartl et al. 2003). Daher besteht umso mehr die Notwendigkeit, das Interesse auf präventive Maßnahmen und neue Therapiemöglichkeiten zu lenken.

Zahlreiche Studien konnten schon den Nutzen von körperlichem Training im Sinne eines Vibrationstrainings für den Schutz vor Osteoporose belegen (Rubin et al. 2006; Verschueren et al. 2004). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Östrogene ausschlaggebend sind für den Erhalt der Knochendichte. Insbesondere ist zu erwähnen, dass dies auch für den Mann gilt (Stock et al. 2004; Gennari und Bilezikian 2007). Daher ist es von Interesse, Phytoöstrogene zu untersuchen, welche sich durch ein nebenwirkungsärmeres Profil auszeichnen. Überwiegend wurden diese Substanzen bis jetzt am weiblichen Organismus untersucht. Die Datenlage hierzu ist widersprüchlich (Wuttke et al. 2007; Lagari und Levis 2010). Noch weniger Informationen liegen vor zur Anwendung beim Mann. Daher soll in der vorliegenden

Arbeit die Kombination aus Vibrationstraining und Phytoöstrogenen, z.T. prophylaktisch als auch therapeutisch eingesetzt, während einer Knochendefektheilung bei Osteoporose erforscht werden. Dazu werden die Phytohormone Genistein (GEN) und Equol (EQ) sowie das SwingVibe Ganzkörpervibrationstrainingsgerät verwendet. Als Tiermodell dient die männliche orchidektomierte (orx) Sprague-Dawley-Ratte (SD-Ratte).

## 1.1 Allgemeine Grundlagen des Knochengewebes

Knochen ist eine besonders harte und spezialisierte Form des Binde- und Stützgewebes. Der Mensch besteht aus ungefähr 210 anatomisch abgrenzbaren Knochen, welche das menschliche Skelett bilden. Jeder einzelne Knochen zeichnet sich durch eine unterschiedlich hohe Zug- und Druckfestigkeit sowie eine gleichzeitig mäßige Elastizität aus. Die spezifischen Merkmale und Eigenschaften des Knochengewebes beruhen auf den Eigenschaften der



**Abb. 1: Röhrenknochen**  
(modifiziert nach: Schünke 2005, S.35)

Knochenmatrix. Sie besteht zu 35% aus organischem Material, vor allem dem Kollagen Typ I und zu 65% aus anorganischen Salzen in Form von Hydroxylapatit, einer kristallinen Ablagerungsform des Kalziumphosphats. Knochengewebe hat neben der Stütz- und Haltefunktion auch metabolische Eigenschaften. Hier werden 99% des Körperkalziums gespeichert (Spaniel-Borowski 2007). Neben dem Kalzium sind Magnesium, Natrium und weitere anorganische Salze im Knochen gebunden.

### 1.1.1 Makrostruktur des Knochens

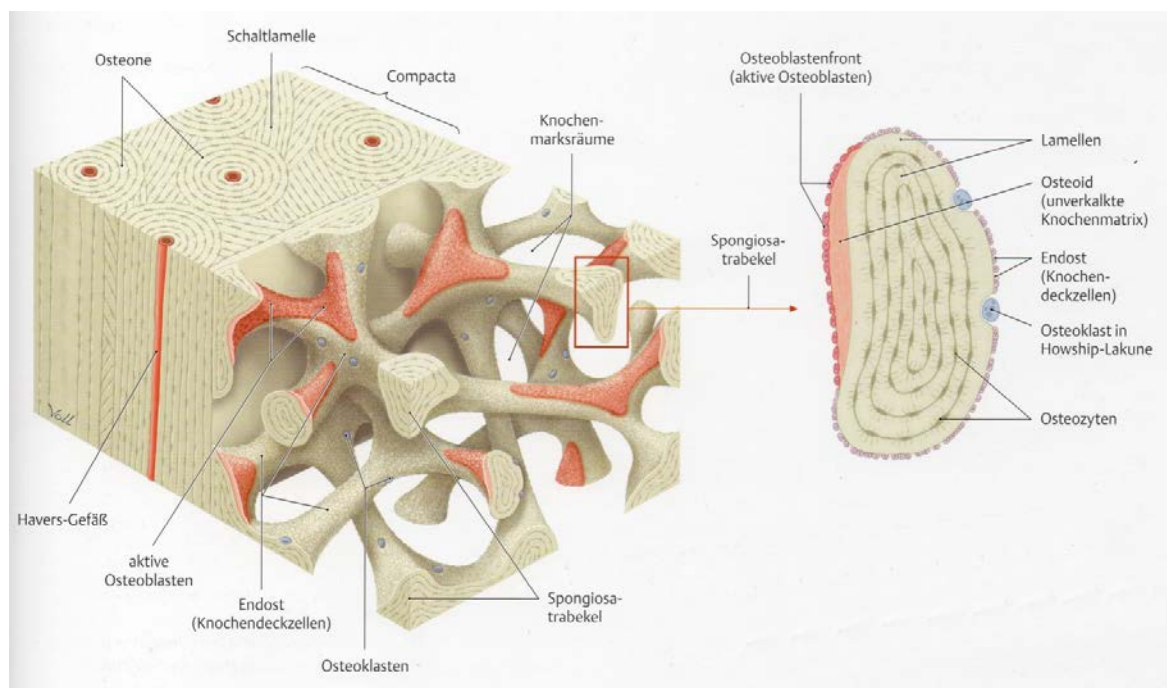
Wie der Abb. 1 zu entnehmen, ist der Knochen an seinen Außenflächen von einer straffen Bindegewebshaut, dem Periost umgeben. Darunter befindet sich kompaktes Knochengewebe, die Corticalis bzw. Substantia compacta. Weiter innen geht die Substantia compacta in ein schwammartiges Gerüst aus Knochenbälkchen (Trabekel) in die Substantia spongiosa bzw. Spongiosa über. Die Ausrichtung der Trabekel erfolgt dabei parallel zur größten Druck oder Biegebeanspruchung und verleiht so dem Knochen Stabilität. Die Zwischenräume der



Spongiosa sind mit blutbildendem Knochenmark und Fett ausgefüllt. Das größere Oberfläche-Volumen-Verhältnis des spongiösen Knochens gegenüber dem kortikalen Knochen erlaubt eine weitaus höhere metabolische Aktivität (Compston 2001). Als Endost (siehe Abb. 2) bezeichnet man die Oberfläche, welche die Spongiosa umgibt. Die Enden langer Röhrenknochen, die Epiphyse, und die darunter liegende Metaphyse bestehen hauptsächlich aus Spongiosa (Abb. 2), abzugrenzen von der Diaphyse (dem Schaft), die hauptsächlich aus Substantia compacta (siehe Abb. 3) besteht.

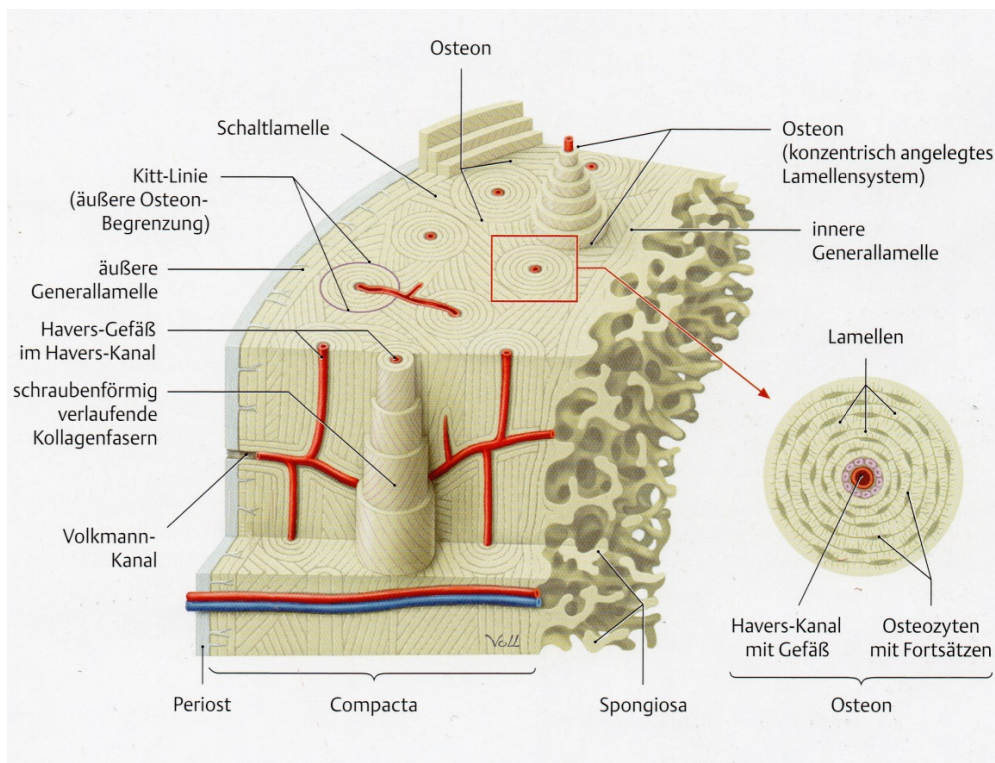
### 1.1.2 Mikrostruktur des Knochens

Histologisch werden anhand der Anordnung kollagener Fasern zwei Arten von Knochengewebe unterschieden: Geflechtknochen und Lamellenknochen. Geflechtknochen, auch primärer Knochen genannt, ist der Knochen der Fetalperiode, des Kleinkindes und tritt bei Knochenneubildung auf. Hier erscheinen die Kollagenfasern und Knochenzellen ungeordnet durchflochten und ohne höheres Organisationsmuster (Benninghoff und Drenckhahn 2002). Die Knochenmatrix ist weniger mineralisiert und weist einen höheren Wassergehalt auf, wodurch der Knochen zugfest und biegungselastisch ist (Spanel-Borowski 2007). Abgesehen von einigen wenigen Knochen entsteht nach Abbau des Geflechtknochens ein regelmäßiger mit parallel angeordneten Struktureinheiten und den jeweiligen Funktionsanforderungen angepasster Lamellenknochen (sekundärer Knochen).



**Abb. 2: Räumliche Darstellung der Spongiosa eines Lamellenknochens**  
(modifiziert nach: Schünke 2005, S.15)

Grundbaustein des Lamellenknochens ist das zylindrisch gebaute Osteon, in dessen Zentrum sich der Haverskanal mit einem längsverlaufenden Blutgefäß befindet (siehe Abb. 3).



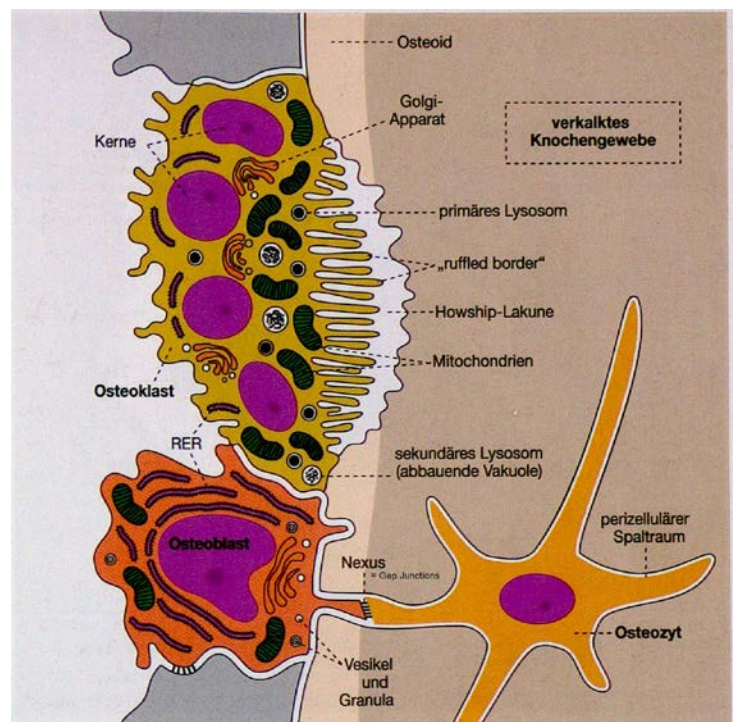
**Abb. 3: Substantia compacta mit Darstellung eines Osteon**  
(modifiziert nach: Schünke 2005, S.35)

Den Haverskanal umgeben 4-20 konzentrisch angeordnete Lamellen, in denen Spiralen parallel angeordneter kollagener Fasern des Typs I (mit einem schrägen Steigungswinkel) verlaufen. Osteone sind im Querschnitt meist rund bis oval. Ihr Durchmesser variiert zwischen 100-400  $\mu\text{m}$ . Zwischen den Lamellen befindet sich verkalkte Matrix, in der linsenförmige Lakunen ausgespart sind, die die Knochenzellen (Osteozyten) beherbergen. Die Osteozyten stehen über zahlreiche Fortsätze, welche in kleinen Knochenkanälchen verlaufen, mittels Gap Junctions in Kontakt. Über die Kanälchen und Fortsätze erfolgt die Ernährung der Knochengrundsubstanz. In der Peripherie werden die Osteone scharf durch eine faserarme 1-2  $\mu\text{m}$  dicke Zementlinie bzw. Kittlinie begrenzt (siehe Abb. 3).

An der äußeren und inneren Oberfläche sind kompakte Knochenpartien durch Lamellen gekennzeichnet. Sie umgeben das ganze Knochenelement nach außen (=äußere Generallamelle) bzw. kleiden die Markhöhle von innen aus (=innere Generallamelle).

### 1.1.3 Spezifische Zellen des Knochens

Grob unterscheidet man zwischen Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten (Abb. 4). Im Medizinstudium hilft einem der sehr vereinfachte Merkspruch: Osteoblasten sind „Knochenbauer“, Osteoklasten sind „Knochenklauer“. Wissenschaftlich genauer formuliert entwickeln sich Osteoblasten aus mesenchymalen Vorläuferzellen und sind einkernige 15-30 µm große Zellen (Benninghoff und Drenckhahn 2002). Sie synthetisieren das zum Aufbau der Knochenmatrix benötigte Kollagen, organisieren die



**Abb. 4: Schematische Darstellung von Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten**

Modifiziert nach: Welsch 2006, S.111)

Mineralisation und steuern die Osteoklastenfunktion (Lüllmann-Rauch 2006). Mittels Nexus sind sie im Kontakt. Neben der Sekretion von Kollagenen, Proteoglykanen, Osteokalzin (Welsch 2006) und anderen Proteinen besitzen sie eine Reihe von Rezeptoren für Hormone, Zytokine und Vitamine. Hierrüber werden sowohl der Knochenaufbau als auch Knochenabbau reguliert. So bilden die Osteoblasten nach Parathormonbindung osteoidabbauende Enzyme und osteoklastenstimulierende Zytokine, wodurch die Osteoklasten aktiviert werden. Aktives Vitamin D3 (Calcitriol) stimuliert partiell die Osteoblastenaktivität (Benninghoff und Drenckhahn 2002). Im weiteren Verlauf gehen die Osteoblasten durch Apoptose zu Grunde oder sie werden zu Osteozyten, indem sie sich durch die Prozesse der Mineralisation infolge der Lamellenbildung einmauern.

Osteozyten sind von mineralisierter Knochenmatrix umgeben und liegen in kleinen Lakunen vor, von denen zahlreiche Zellfortsätze über Knochenkanälchen (Canaliculi) abgehen, worüber sie untereinander über Gap Junction (siehe Nexus in Abb. 4) verbunden sind. Die Weiterleitung von Signalen zwischen den Osteozyten sowie ihre metabolische Aktivität wird so koordiniert (Compston 2001). Gap Junctions stellen so auch eine Verbindung zwischen Osteoblasten und -zyten her (siehe Abb. 3). Osteozyten gehören zu den mechanosensiblen

Zellen. Es wird davon ausgegangen, dass sie bei der belastungsabhängigen Knochenadaptation eine wichtige Rolle spielen (You et al. 2008). Dabei wird angenommen, dass bei Beanspruchung des Knochens der Fluss in den Knochenkanälchen stimuliert, so dass die Kommunikation gefördert wird (Piekarski und Munro 1977).

Osteoklasten sind große (50-100  $\mu\text{m}$ ), mehrkernige Zellen, die durch Fusion von Makrophagen entstehen. Sie liegen an der Oberfläche des Knochengewebes in flachen Einsenkungen, den Howship-Lakunen.

Im Vergleich zu den Osteoblasten haben Osteoklasten eine antagonistische Arbeitsweise. Sie bauen Knochenmatrix ab und demineralisieren den Knochen. An der lakunären Seite, die der Knochenmatrix anliegt, ist die Membranoberfläche der Osteoklasten in Falten geworfen (*ruffled border*), wodurch die Oberfläche vergrößert wird. Die stromawärtige Seite ist glatt. Über die zahlreichen in der Faltenmembran lokalisierten  $\text{H}^+$ -Pumpen werden Protonen in die Lakune gepumpt. Das entstehende saure Milieu aktiviert saure Hydrolasen, welche die Knochenmatrix abbauen. Gleichzeitig werden sich lösende Kalziumionen durch Kalziumkanäle in die Zelle aufgenommen und über Kalziumpumpen an der Stromaseite abgegeben. Die Proliferation und Differenzierung der Osteoklasten wird durch eine Vielzahl von Hormonen und Wachstumsfaktoren gesteuert. Parathormon wird in Abhängigkeit vom Kalziumspiegel im Blut in den Nebenschilddrüsen gebildet und stimuliert dann indirekt, mittels Aktivierung von Osteoblasten, die Knochenresorption. Calcitonin hemmt diese und wird vermehrt bei zu hohen Serumkalziumspiegeln sezerniert.

#### **1.1.4 Knochenumbau und Frakturheilung**

Jährlich werden ca. 10% des Knochens durch Umbau ersetzt (Lüllmann-Rauch 2006), so dass sich nach zehn Jahren das Skelett einmal komplett regeneriert hat (Manolagas 2000). Knochen ist somit ein ausgesprochen dynamisches Gewebe! Es hat die Fähigkeit, sich den wechselnden Ansprüchen des Körpers anzupassen, sei es das Wachstum in der Kindheit oder biomechanischer Stress durch beispielsweise exzessiven Sport. Dieses sogenannte Modeling findet in den ersten beiden Lebensdekaden statt. Die Knochenneusynthese überwiegt hier gegenüber der Resorption. Auch beim Knochenheilungsprozess spielt „Modeling“ eine Rolle (Baron und Kneissel 2013). „Remodeling“ findet nach Abschluss des Wachstums statt. Darunter versteht man solche Umbaumaßnahmen, die je nach funktionellem Anspruch und mechanischer Belastung des Knochens stattfinden und vor allem dem Erhalt der

Knochenmasse dienen. Bei jungen Erwachsenen ist das Synthese/Resorptionsverhältnis annähernd gleich. Mit fortschreitendem Alter kann es sich zu Gunsten einer größeren Resorption verschieben, so dass das Remodeling unbalanciert ist. Die Folge ist ein erhöhter Knochenverlust, der sich in Form von Osteoporose äußern kann (Seeman 2013; Compston 2001).

Frakturheilung hat das Ziel den ursprünglichen Zustand des Knochens möglichst vollständig und mit wenigen Residuen wiederherzustellen. Primäre und sekundäre Knochenheilung sind dabei voneinander abzugrenzen.

Voraussetzung für eine primäre bzw. direkte Knochenheilung sind eine intakte Durchblutung der Fragmente, ausreichende Stabilität im Frakturbereich sowie der Knochenkontakt zueinander (Frakturspalt <1mm) (Lüllmann-Rauch 2006). Meist sind diese Voraussetzungen nur bei einer Osteosynthese gegeben (Berchtold 2006). Der Bruchspalt wird dann direkt mit neuem Knochengewebe (Lamellenknochen) aufgefüllt.

Die natürliche, sekundäre Form der Frakturheilung erfolgt bei großem Bruchspalt und instabiler Bruchsituation über ein narbiges Ersatzgewebe, den Frakturkallus, der sich zwischen den Bruchenden bildet. Unmittelbar nach einer Fraktur durchläuft der menschliche Knochen dabei vier Stadien (Schindeler et al. 2008):

1. Entzündungsphase:

Initial bildet sich ein Frakturhämatom als Folge einer lokalen Durchblutungsstörung durch Unterbrechung der Gefäßversorgung. Thrombozyten und Zellen der akuten Entzündungsreaktion aktivieren die Gerinnungskaskade. Lokal sezernierte Zytokine und Wachstumsfaktoren lösen den Thrombus auf und ersetzen ihn durch Granulationsgewebe (1.-2. Woche) (Grifka und Kuster 2011). Kapillaren sprossen ein, so dass Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  in die Frakturrenden eingeschleust werden können. Dem Periost und dem Knochenmark entstammende mesenchymale Stammzellen wandern ein und fördern den Knochenheilungsprozess (Malizos und Papatheodorou 2005).

2. Fibrocartilaginöser Kallus:

Progenitorzellen werden zu Chondrozyten und produzieren Knorpelmatrix, bis das Granulationsgewebe vollständig ersetzt wurde. Dabei werden noch vorhandene Lücken mit Bindegewebe aufgefüllt, das von Fibroblasten produziert wird. Zwischen

den Frakturenenden ist nun ein schienendes Gewebe entstanden, das dem knöchernen Kallus als Schablone dient (4. -5. Woche).

### 3. Knöcherner Kallus:

Neu einsprossende Gefäße erhöhen die lokale Sauerstoffversorgung in dem Gebiet und fördern so die Osteoblastendifferenzierung in aktive Osteoblasten. Diese beginnen mit der Bildung von spongiösen Knochen trabekeln. Im weiteren Verlauf wird der Knochen mineralisiert, so dass der weiche durch einen harten knöchernen Kallus aus Geflechtknochen ersetzt wird (2. -4. Monat).

### 4. Remodeling:

Abschließend kommt es zur Umbauphase, in der Geflechtknochen entsprechend der wirkenden Kraftlinien in Lamellenknochen umstrukturiert wird. Anteile der ursprünglichen Knochenfragmente werden zunächst durch Osteoklasten resorbiert. Anschließend kommt es zur Knochenneubildung durch die Osteoblasten. Bis die alte Knochenstruktur wieder hergestellt ist, vergehen Jahre (Grifka und Kuster 2011).

Khussar et al. (2001) konnten in einer Studie zeigen, dass die Knochenheilung bei männlichen Wistar-Ratten in den gleichen vier Stadien abläuft wie bei Menschen. Jedoch durchlaufen die Ratten die Heilungsstadien schneller. Die Phase des Remodeling konnte schon ab dem 28. posttraumatischen Tag beobachtet werden (Khussar et al. 2001). Das qualitative Ergebnis einer Knochenbruchheilung ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Alter, Osteoporose und hormonelle Situation werden diskutiert. Studien zeigen, dass der Heilungsprozess bei osteopenischen weiblichen Ratten nicht länger dauert. Der Unterschied liegt in einer reduzierten mechanischen Festigkeit des neu geformten osteoporotischen Knochens (Augat et al. 2005). Andere Studien stellten am osteoporotischen Rattenmodell fest, dass die Kallusquerschnittsfläche gegenüber der Kontrolle vermindert ist und nach Abschluss des Heilungsprozesses die Knochendichte reduziert ist (Kubo et al. 1999; Namkung-Matthai et al. 2001).

## 1.2 Osteoporose

Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, welche durch eine erniedrigte Knochenmasse und Störung der Mikroarchitektur des Knochengewebes mit Anstieg der Knochenbrüchigkeit sowie einer erhöhten Frakturneigung charakterisiert ist (DVO-Leitlinie 2014).

Nach der Ätiologie unterscheidet man zwischen primärer und sekundärer Osteoporose. Zu der primären zählt die durch postmenopausalen Östrogenabfall verursachte Typ 1-Osteoporose der Frau, die senile Osteoporose beider Geschlechter (Typ 2-Osteoporose) sowie die seltene idiopathische juvenile Osteoporose. Eine durch verschiedene Grunderkrankungen ausgelöste Osteoporose, wie z.B. durch Hyperthyreose, Diabetes, aber auch eine durch Steroideinnahme bedingte, zählt zu den sekundären Osteoporosen (Fitzpatrick 2002).

Wie schon einleitend erwähnt, gewinnt bei steigender Lebenserwartung und zusätzlich stagnierenden Geburtenzahlen -einer somit immer älter werdenden Bevölkerung- die Osteoporose beim Mann immer mehr an Bedeutung. In den USA sind schätzungsweise 1/5 aller Betroffenen mit Osteopenie oder Osteoporose männlich (Drake und Khosla 2012). Ebenso beträgt das Lebensrisiko für Männer in einigen Populationen 25-33%, eine osteoporotische Fraktur zu erleiden (Binkley 2006).

Da in der vorliegenden Arbeit die Frakturheilung bei männlichen osteoporotischen Ratten untersucht wurde, geht es im Folgenden um die Pathogenese beim Mann. Nicht nur bei Frauen ist der postmenopausale Abfall des Östrogens ursächlich für die Entstehung der Osteoporose, sondern auch bei Männern führt der schleichende Testosteronabfall letztendlich zu einem Abfall von bioverfügbarem Östrogen und somit zum Knochenverlust (Khosla et al. 2012; Stock et al. 2004; Binkley 2006).

Neben der abnehmenden Funktion der Gonaden tragen auch Risikofaktoren wie Rauchen, Alkoholkonsum, Untergewicht und Bewegungsmangel zur Entstehung der Osteoporose bei (Mosekilde et al. 2013; Bartl et al. 2003).

Gemäß der Definition der WHO liegt Osteoporose vor, wenn die Knochendichte um 2,5 Standardabweichungen unter dem Mittelwert gesunder Frauen (weibliches Referenzkollektiv zwischen 20-29 Jahre alt) liegt (WHO 1994). Die ermittelte Abweichung wird T-Wert genannt, gibt Aufschluss über den Schweregrad und trägt zur Auswahl der Therapie mit bei. Laut dem Dachverband für Osteologie (= DVO) kann diese Definition auf Männer >50 Jahre übertragen werden (DVO-Leitlinie 2014). Für die Ermittlung des T-Wertes können aber auch eigene Referenzkollektive (z.B. männliches Referenzkollektiv, Gruppen gleicher Rasse etc.) gewählt werden. Es gilt zu überprüfen, auf welches Referenzkollektiv sich bei der Berechnung des T-Wertes bezogen worden ist, da sich daraus sonst Fehldiagnosen mit unerwünschten therapeutischen Konsequenzen ergeben können.

### 1.2.1 Therapie der Osteoporose

Es bedurfte vieler Jahre Forschung, bis neben den überwiegend an weiblichen Osteoporosepatientinnen durchgeführten Studien auch die Wichtigkeit erkannt wurde, Behandlungsmöglichkeiten für Männer mit Osteoporose zu schaffen.

Bei Frauen und Männern beruht eine effiziente Osteoporosetherapie gleichermaßen auf mehreren Säulen. Neben Basismaßnahmen, wie der Einnahme von Vitamin D und Kalzium, teilt man folgende Substanzen in antiresorptiv und osteoanabol ein. Antiresorptiv wirken dabei Bisphosphonate und SERM's wie z.B. Raloxifen und Denosumab. Von den antiresorptiv wirksamen sind die Bisphosphonate (speziell Alendronat, Risendronat und Zoledronat) (Drake und Khosla 2012) für den männlichen Osteoporosepatienten zugelassen, sowie Denosumab, ein monoklonaler Antikörper gegen RANKL (=Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand), welcher bei Männern allerdings nur bei hohem Frakturrisiko infolge einer Hormonablation bei Therapie des Prostatakarzinoms eingesetzt werden darf. (Lang-Roth und Karow 2012) Raloxifen ist ausschließlich für die postmenopausale Osteoporose bestimmt.

Osteoanabol wirkend und für beide Geschlechter zugelassen ist das Parathormon-Analogon Teriparatid. Es fördert die Neubildung von Knochen und senkt vor allem das Risiko für vertebrale Frakturen. (Drake und Khosla 2012). Nicht von minderer Bedeutung sind Maßnahmen wie der Verzicht auf Zigaretten und Alkohol sowie eine moderate sportliche Betätigung zur Kräftigung der Muskulatur, des Knochens und des Gleichgewichts, um das Sturz- und Frakturrisiko zu senken (Watts et al. 2012; Stock et al. 2004; Sehmisch et al. 2009).

Als weiterer Hoffnungsträger in der Behandlung der Osteoporose werden Phytohormone diskutiert, die in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden.

### 1.3 Vibrationstraining

Der Sportmarkt für neue Trainingsmethoden, um den Körper fit zu halten und in Form zu bringen, boomt in den letzten Jahren. Eine Methode, die sich sowohl im Sport als auch in der Medizin schon länger etabliert hat, ist das Vibrationstraining. Bereits vor einem halben Jahrhundert setzte die Sowjetunion das Vibrationstraining sowohl bei ihren Leistungssportlern zur muskulären Steigerung ein als auch bei ihren Kosmonauten. Verglichen zu ihren amerikanischen Kollegen war dadurch ein längeres Arbeiten im Weltall



möglich. Das Vibrationstraining hat nicht nur einen positiven Effekt auf die Muskulatur, sondern auch auf die Knochen. Dies zeigte Jankovich schon 1972 an einem Rattenmodell. Dabei verbesserte sich nach täglichen Vibrationseinheiten mit 20-25 Hz die Knochenstabilität- und Stärke der Tiere (Jankovich 1972).

Bei der Methode des Ganzkörpervibrationstrainings steht der Patient meist mit beiden Füßen auf der vibrierenden Platte, die sich je nach Einstellung in vertikale oder horizontale Richtung bewegt. Die Intensität kann durch Variation der Amplitude und Frequenz den Ansprüchen angepasst werden.

Vibrationstraining stellt eine nicht-pharmakologische Präventionsmöglichkeit der Osteoporose dar (Rubin et al. 2006; Verschueren et al. 2004). Flieger et al. (1998) zeigten an ovariectomierten (ovx) Ratten, dass ein fünfwöchiges Vibrationstraining mit 50 Hz, 30 min/day, dazu beiträgt den Knochendichteverlust in Femur und Tibia zu verhindern. Ebenso konnte eine drei-monatige Vibrationstherapie mit 45 Hz, 30 min/day, die durch Ovx induzierte endocorticale Resorption in Tibiae weiblicher Ratten gehemmt werden (Oxlund et al. 2003). Neben der anabolen Wirkung auf das Knochengewebe nimmt das Vibrationstraining auch Einfluss auf den Muskel. Die neuromuskuläre Übertragung ist gesteigert (Bosco et al. 2000), die Muskelkraft wird verbessert (Verschueren et al. 2004) und der Verlust an Muskelmasse kann minimiert werden (Blottner et al. 2006). In vielen erwähnten Studien und auch in der vorliegenden Arbeit wurde das Vibrationstraining prophylaktisch eingesetzt, um den Verlust der Knochendichte und der Muskulatur zu minimieren oder gar aufzuhalten und den Knochen vor auftretenden Frakturen zu schützen. Neben diesem prophylaktischen Nutzen kann man dem Vibrationstraining auch therapeutische Eigenschaften nach bereits erfolgter osteoporotischer Fraktur zugute schreiben, welche wir genauer untersucht haben.

Shi et al. konnten am Femur weiblicher Ratten zeigen, dass Vibrationstraining mit 35 Hz 20 min/day 5 d/week für 8 Wochen (LMHFV-low magnitude high frequency vibration), fünf Tage nach Fraktur beginnend, in gesunden als auch osteoporotischen Ratten die Frakturheilung beschleunigt und die Kallusbildung, das Remodeling, die Mineralisation als auch die mechanische Wiederherstellung fördert (Shi et al. 2010).

Komrakova et al. konnten ebenfalls am ovariectomierten Rattenmodell eine verbesserte Frakturheilung unter Vibrationstherapie mit 35/50 Hz feststellen, die sich in einer

vergrößerten Kortikalis- und Kallusdichte äußerte, als auch im beschleunigten Verschluss des Osteotomiespalt (Komrakova et al. 2013).

#### 1.4 Sexualhormone

Androgene und Östrogene sind sowohl bei der Frau als auch beim Mann die wichtigsten Vertreter der Sexualhormone. Sie gehören zu den Steroidhormonen und leiten sich vom Cholesterin ab. Ihre Synthese findet hauptsächlich in den Keimdrüsen (Testes, Ovar), in der Nebennierenrinde und während der Schwangerschaft in der Plazenta statt. Einige Zellen des Körpers haben die Möglichkeit aus frei zirkulierenden Androgenen oder ihren Vorstufen die jeweiligen gewünschten Steroidhormone zu produzieren. So kann aus dem Androgen Testosteron, mit Hilfe des Enzyms Aromatase, Estradiol gebildet werden. Die Aromatase kommt in den Granulosazellen des Ovars, in Leydig- und Sertollizellen, in einigen Knochenzellen, während der Embryogenese im Gehirn, in der Plazenta und im Fettgewebe vor (Silbernagl und Despopoulos 2003; Löffler 2006; Chin und Ima-Nirwana 2012).

Testosteron kann durch das Enzym 5-Alpha-Reduktase in den biologisch aktiveren Metaboliten 5-Alpha Dihydrotestosteron umgewandelt werden. Aktiviert werden beide Substanzen über den Androgenrezeptor der ubiquitär im männlichen und weiblichen Organismus vorkommt. Androgene sorgen in männlichen Individuen für die Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale, Muskelwachstum und Knochenaufbau (Silbernagl und Despopoulos 2003). Bei einer chemischen oder chirurgischen Kastration kann es durch den Androgenmangel zu einem erhöhtem Knochenumbau mit einhergehenden Knochendichteverlust kommen (Riggs et al. 2002; Erben 2001).

Östrogene haben ein breites Wirkspektrum. Sie nehmen Einfluss auf Wachstum, Proliferation und Differenzierung in verschiedenen Geweben wie z.B. den weiblichen Fortpflanzungsorganen, Knochen und Fettgewebe. Über die zwei Östrogenrezeptoren (ER) ER $\alpha$  und ER $\beta$  entfalten sie ihre Wirkung. Das Verteilungsmuster der Rezeptoren ist gewebe- und z.T. geschlechtsspezifisch. Auch im Knochen sind beide Subtypen vertreten, jedoch scheint der ER $\alpha$  dort die vorherrschende Rolle zu spielen (Pelletier 2000; Hou et al. 2006).

Die Bedeutsamkeit von Östrogenen für den männlichen Knochenstoffwechsel ist schon länger bekannt. Sie sind für den Epiphysenschluss verantwortlich (Khosla et al. 2002) hemmen Knochenremodeling, reduzieren die Knochenresorption und sorgen für die Knochenbildung (Khosla et al. 2012). Sie regulieren die Differenzierung und Aktivität von

Osteoblasten, -zyten und -klasten (Compston 2001), wobei sie letztere zu hemmen vermögen durch Steigerung der Apoptose solcher (Khosla et al. 2012).

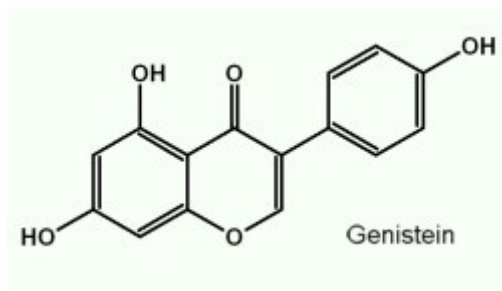
## 1.5 Phytoöstrogene

Phytoöstrogene sind in Pflanzen natürlich vorkommende Substanzen, die östrogenähnliche Wirkungen aufweisen. Nach ihrer chemischen Struktur teilt man sie ein in Isoflavone, Lignane, Coumestane und Stilbene (Oseni et al. 2008; Pilsakova et al. 2010). Auf Grund ihrer chemisch strukturellen Ähnlichkeit mit dem natürlichen 17 $\beta$ -Estradiol können Phytoöstrogene mit dem ER $\alpha$  und ER $\beta$  interagieren. Dabei wirken sie agonistisch, antagonistisch oder als Teilagonist/antagonist (Lagari und Levis 2010), so dass analog zu der Wirkung von SERM's hier von Phyto-SERM's gesprochen werden kann (Cos et al. 2003; Oseni et al. 2008). Erstmals in den 50er Jahren fiel die hormonelle Wirkung aus der Nahrung aufgenommener Isoflavone auf. Australische Schafzüchter bemerkten eine unerklärliche Unfruchtbarkeit bei ihren Tieren die auf Weiden mit Klee grasten. Die im Klee enthaltenen Isoflavone griffen in den hormonellen Kreislauf der Schafe ein und reduzierten die Fruchtbarkeit (Bennetts und Underwood 1951).

Diese Erkenntnis, verbunden mit der im Laufe der Jahrzehnte festgestellten niedrigen Inzidenz an hormonell abhängigen Erkrankungen wie Osteoporose, Brust- und Prostatakrebs etc. (Cos et al. 2003; Adlercreutz und Mazur 1997) im asiatischen Raum, hat zu einem gesteigerten wissenschaftlichen Interesse an Phytoöstrogenen geführt. Traditionell asiatische Ernährung enthält zum großen Anteil Lebensmittel aus Soja, eine der reichsten Aufnahmequelle für Isoflavone (Lagari und Levis 2010). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isoflavone Genistein und Equol werden im Folgenden genauer vorgestellt.

### 1.5.1 Genistein

Genistein gehört zur Gruppe der Isoflavone und ist überwiegend in Sojaprodukten und Rotklee enthalten. Seine Struktur ist dem Estradiol ähnlich. Beide besitzen einen Phenolring. Diese Ähnlichkeit ermöglicht die Bindung an das sexualhormonbindende Globulin (SHBG) als auch eine Interaktion mit dem ER (Dixon 2002), mit stärkerer Affinität zum ER $\beta$  (Kuiper et al. 1998). Einige Studien belegen den positiven Effekt von GEN auf den Knochen in weiblichen und männlichen Individuen. Eine Behandlung mit GEN zeigt in weiblichen Ratten eine



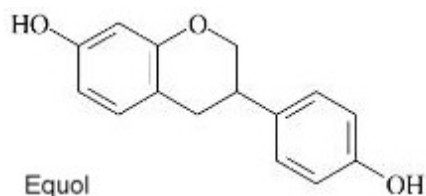
**Abb. 5: Strukturformel Genistein**  
 modifiziert nach: phytochemicals.info

protektive Wirkung auf den Knochendichteverlust nach Ovx (Fanti et al. 1998) mit einem Anstieg der Knochenmineraldichte (Mathey et al. 2007) und einer verbesserten Bruchfestigkeit (Bitto et al. 2008). Auch in Tierversuchen mit männlichen Mäusen konnte eine durch Orx verursachte Minderung der Knochendichte mit Hilfe von GEN

verhindert werden. Dabei schien die Wirkung auf den spongiösen Knochen der Kortikalis leicht überlegen (Ishimi et al. 2002). Wu et al. untersuchten die Therapiekombination aus GEN und Laufbandtraining bei männlichen orx Mäusen und erzielten damit positive Ergebnisse. Ein präventiver Effekt auf den Erhalt der Knochendichte im untersuchten Femur konnte gezeigt werden. Knochenvolumen und Trabekeldicke waren wieder hergestellt, mit dem gleichen Erfolg einer reinen Östrogentherapie (Wu et al. 2003).

Es ist anzunehmen, dass GEN seine knochenprotektiven Eigenschaften über Stimulation der Knochenneubildung entfaltet (Fanti et al. 1998). In Studien an Zellkulturen konnte durch GEN eine Wachstumsstimulation von Osteoblasten belegt werden, neben einer inhibierenden Wirkung auf Osteoklasten (Yamaguchi 2012; Rickard et al. 2003). Studien über die therapeutischen Effekte von GEN auf die Frakturheilung bei männlichen osteoporotischen Ratten sind rar und daher Mittelpunkt dieser Arbeit. Lediglich Ähnlichkeiten bestanden zu anderen Studien. Es konnten z.B. positive Effekte durch das Phytoöstrogen *Vitex agnus-castus* (= Mönchspfeffer) in der frühen Phase der Frakturheilung bei Kaninchen festgestellt werden (Ozturk et al. 2008). Des Weiteren gibt es eine malaysische Studie über die Anwendung von *Piper sarmentosum* (=thailändisches Pfefferblatt), das Isoflavone enthält. Die weiblichen ovx Ratten wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe radiologische Zeichen einer verbesserten Frakturheilung auf (Estai et al. 2011). Ebenso fasst ein malaysisches Review von 2012 Möglichkeiten der Behandlung von osteoporotischen Frakturen durch medizinische Pflanzen und Naturprodukte zusammen (Abd Jalil et al. 2012).

## 1.5.2 Equol



**Abb. 6: Strukturformel Equol**

(modifiziert nach: Kostelac et al. 2003 S. 2)

Equol ist im eigentlichen Sinne kein Isoflavon, sondern ein metabolisches Produkt. Es wird im menschlichen Körper durch Darmbakterien aus dem Isoflavon Daidzein gebildet. Daidzein wird über den Verzehr von Sojabohnen und Sojaprodukten aufgenommen. Die Bioverfügbarkeit von EQ ist abhängig von der individuellen Darmflora. Nicht jedes Individuum, sondern ca. 30-50% der Bevölkerung können EQ aus Daidzein synthetisieren (Setchell et al. 2002). Dabei gibt es kontroverse Studien, ob der Anteil der "Equolproducer" unter Vegetariern oder anderen Formen einer speziellen Ernährung (asiatische, westliche Ernährung, fettarm/haltig) besonders hoch ist (Ishimi 2009). Seine östrogene Wirkung entfaltet EQ über die Bindung an ER $\alpha$  und ER $\beta$ , jedoch ist die Transkriptionsaktivität nach Bindung an ER $\alpha$  höher als bei GEN oder anderen Isoflavonen (Kostelac et al. 2003; Morito et al. 2001).

Bislang sind folgende Wirkungen von EQ auf den Knochen beschrieben: In Studien an ovx Ratten zeigte Mathey et al. (2007) den Erhalt der Knochenmineraldichte durch eine dreimonatige EQ-Einnahme, Picherit et al. (2000) beobachtet diese Wirkung durch dreimonatige Daidzeinzufuhr am Femur und der Wirbelsäule. Andere konnten knochensparende Effekte für die Wirbelsäule allein feststellen (Rachon et al. 2007a). Ferner führt die Applikation von EQ zu einer verbesserten Knochenqualität insbesondere des spongösen Knochens (Sehmisch et al. 2010).

Die Kombination von sportlicher Aktivität und Equolzufuhr scheint auch hier von sinnvoller Bedeutung. Wu et al. (2006) kombinierten für ein Jahr Lauftraining mit einer Isoflavonmischung, welche über die Hälfte Daidzein enthielt und beobachteten stärkere Effekte auf die Knochenmineraldichte von Hüfte und Schenkelhals als bei jedem Faktor allein (Wu et al. 2006).

Publikationen zur Frakturheilung unter Anwendung von EQ gibt es bislang auch hier nur wenige. Jedoch konnten Kolios et al. (2009) eine Verbesserung der frühen Phase der metaphysären Frakturheilung durch EQ nachweisen, die sie bei GEN nicht beobachteten (Kolios et al. 2009).

Um die variable Bioverfügbarkeit von Daidzein durch EQ-Producer und Non-EQ Producer zu umgehen (Shor et al. 2012) verwenden wir in unserer Arbeit den Metaboliten EQ.

## 1.6 Die Ratte als Tiermodell für die Erforschung der Knochenbruchheilung bei Osteoporose

Bei der Suche nach einem geeigneten Versuchstier sollte die Ähnlichkeit und Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus, hinsichtlich Stoffwechsel und Reaktion auf äußere Einflüsse, von Bedeutung sein.

Zur Untersuchung des Knochenhaushaltes unter Osteoporose haben sich weibliche als auch männliche Ratten bewährt (Wronski et al. 1985; Kalu 1991; Sturmer et al. 2006). In weiblichen Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten) konnte Wronski bereits 14 Tage nach Ovx erste Knochenveränderungen in der proximalen Tibiametaphyse beobachten (Wronski et al. 1988). Drei Monate nach Ovx beträgt der Knochenverlust schon bis zu 50% (Seidlová-Wuttke et al. 2003; Wronski et al. 1985), der insbesondere den spongiösen Knochen betrifft (Seidlová-Wuttke et al. 2008). Darüber hinaus ist es möglich, die Substanz- und Hormonwirkungen durch Futterapplikation unter ad libitum-Bedingungen zu beobachten und auf den Menschen zu übertragen (Frost und Jee 1992). Auch für die Untersuchung der Phytohormone eignet sich unser gewähltes Tiermodell. In einer Studie mit isoliertem Darm aus männlichen SD-Ratten konnte gezeigt werden, dass die Isoflavone GEN und Daidzein absorbiert und metabolisiert werden können (Andlauer et al. 2000). Ferner hat sich die Ratte als Tiermodell zur Erforschung von Frakturheilung in anderen Studien etabliert (Walsh et al. 1997; Frost und Jee 1992).

Zur Untersuchung der Frakturheilung bei Osteoporose mittels peripherer quantitativer Computertomographie (qCT) haben wir die proximale Tibiametaphyse gewählt, da sich bei der Ratte an dieser Lokalisation die Osteoporose stark manifestiert (Wronski et al. 1985) und darüber hinaus die Spongiosa hier sehr empfindlich gegenüber Östrogen ist (Hertrampf et al. 2006). Das qCT-Verfahren eignet sich gut für Kleintiere, um Veränderungen bezüglich Knochendichte und -masse zu erforschen (Gasser 1995).

**Fragestellung:**

1. Welchen Effekt zeigt das Vibrationstraining auf den durch Orx induzierten Knochenverlust der männlichen Ratte?
2. Wie verändern sich die mittels qCT gemessenen Knochenparameter eines osteoporotischen Knochens - unter Therapie mit Genistein und Equol - während Heilung eines künstlich gesetzten Knochendefektes (Trepanation)?
3. Bringt ein zusätzliches Vibrationstraining, neben der Gabe der Phytohormone, während des Heilungsprozesses einen Benefit?
4. Welche Auswirkungen haben das Vibrationstraining und die Phytohormone auf das paratibiale Fettdepot und die Muskulatur der Tiere?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für den Tierversuch lag eine Genehmigung der Deutschen Forschungsgesellschaft, DFG-Antrag JA 398/10-1 mit Tierschutz AZ: G 43.09., vor.

Hierfür wurden 180 männliche selbstgezoogene SD-Ratten verwendet (Winkelmann, Borchon). Die Ratten wurden in Gruppen von vier Tieren pro Käfig gehalten. In den Käfigen (Makrolon®-Käfige vom Typ IV, Firma Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg) hatten die Tiere jederzeit freien Zugang zu Futter (sojafreies Pellet-Futter ssniff®,



phytoöstrogenarm V 1354-000 ssniff R-Z, 10 mm=sf) und frischem Trinkwasser (ad libitum). Die Beleuchtung des Raumes erfolgte von 6 bis 18Uhr im 12h „dark-light-cyclus“, die Raumtemperatur betrug ca. 23 °C bei 55% rel. Luftfeuchtigkeit. Bei Versuchsbeginn (25.03.2009) hatten die Ratten ein Alter von drei Monaten. Das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere betrug nach einer dreiwöchigen Eingewöhnungsphase  $355 \pm 19$  g.

Die tierexperimentelle Durchführung stand unter der Leitung und Aufsicht von Dr. D. Seidlová-Wuttke. Ich selber habe ab dem Zeitpunkt der ersten computertomographischen Untersuchung an diesem Versuch mitgearbeitet. Sowohl bei der Orchidektomie als auch bei der Trepanation und Obduktion

#### Abb. 7: Tierhaltungsraum

(eigenes Foto)

habe ich der Arbeitsgruppe assistiert. Das Vibrationstraining, Gewichtskontrollen, Futtergaben und die CT-Untersuchungen habe ich in Zusammenarbeit mit dem Co-Doktoranden Sebastian Papenberg durchgeführt.



## 2.2 Versuchsvorbereitung und Versuchsablauf

Der Versuchszeitraum erstreckte sich über 18 Wochen und kann in drei Phasen eingeteilt werden. Eingewöhnung, Vibrationstherapie (Vibro) und Behandlung. Ein detaillierter Versuchsablauf ist der Abb. 8 zu entnehmen.

Nach Ankunft der Tiere in der Zentralen Tiereinrichtung des Universitätsklinikums Göttingen konnten sich die Versuchstiere über drei Wochen an ihre neue Umgebung gewöhnen. In der 4. Woche erfolgte eine quantitative CT-Untersuchung (XCT Research SA+, Stratec Medizintechnik, Pforzheim) der linken Tibia eines jeden Tieres zur Darstellung der Knochendichte und weiterer geometrischer Knochenparameter. Das CT erfolgte unter Narkose von Isofluran (Forene® Abbott). Die Tiere wurden dabei an ein Inhalationsnarkosegerät (Penlon Sigma Delta, Penlon Ltd. Abingdon, Oxon, UK) mittels Maske angeschlossen und mit einem Flow von 0,45 l/ min O<sub>2</sub> und 0,457/ min Air beatmet. Die Narkosetiefe wurde anhand des Relaxationsgrades der peripheren Muskulatur kontrolliert. Ein weiteres CT wurde unter gleichen Bedingungen bei jedem Tier kurz vor der Obduktion durchgeführt.

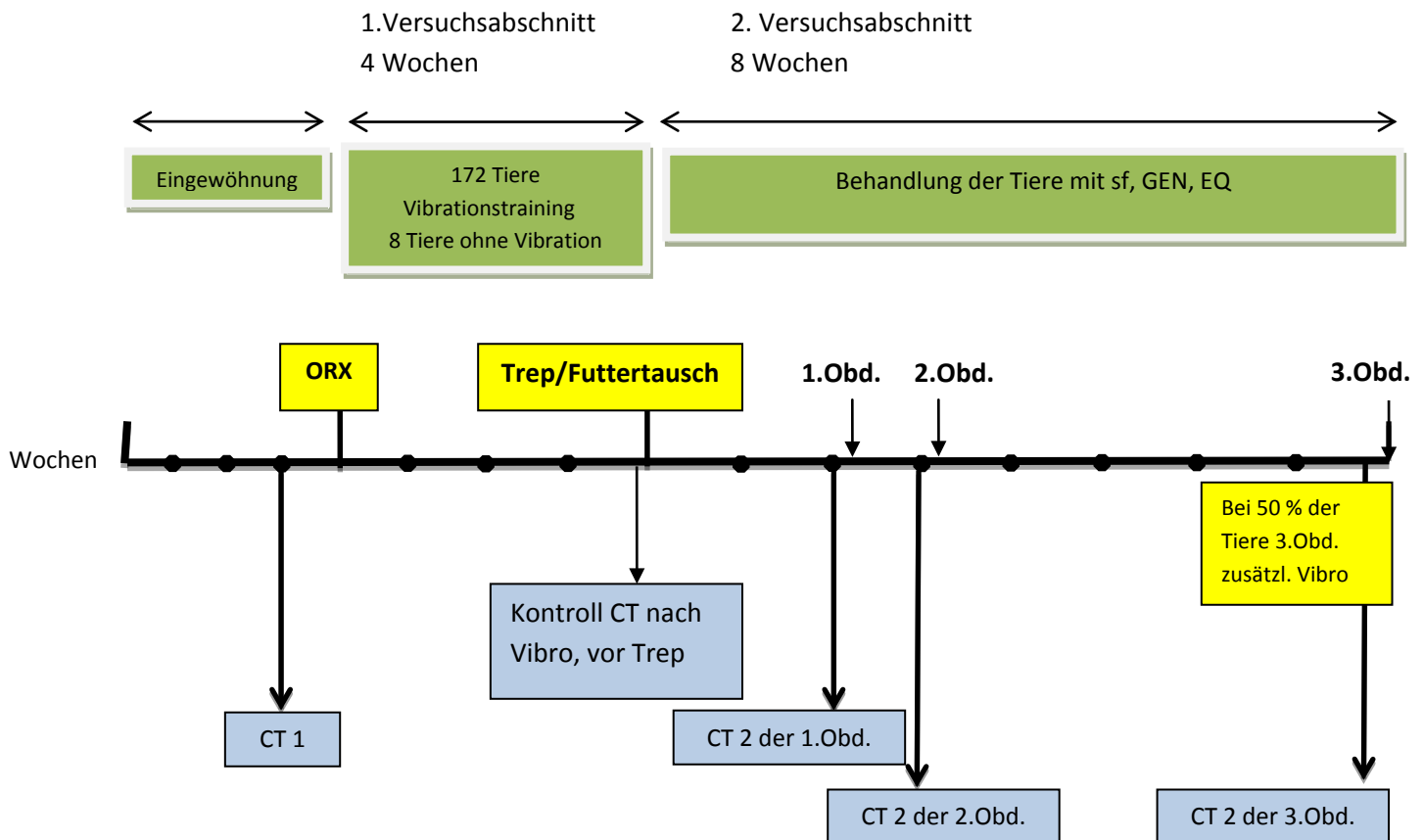
Nach vier Wochen wurden alle Versuchstiere unter Isofluran-Narkose orchidektomiert und jedem Tier wurde ein Transponder (UNO Micro ID®) subkutan in der Nackenhaut implantiert. Durch den Transponder war während der gesamten Versuchsdauer eine eindeutige Identifizierung möglich.

Als nächstes erhielten alle Tiere - bis auf eine Kontrollgruppe von acht Tieren - für vier Wochen eine Vibrationstherapie (siehe Kapitel 2.5.). Bevor bei allen vibrierten Tieren die Trepanation beider Tibiae durchgeführt wurde (Kapitel 2.8.), bekam die Kontrollgruppe sowie acht vibrierte Tiere eine zweite CT-Untersuchung (Kontroll CT siehe Abb. 8). Im Anschluss an die Trepanation teilte man die Tiere in gleichgroße Versuchsgruppen ein, die von nun an Futter mit bzw. ohne Testsubstanz erhielten (siehe auch Tabelle 2).

Im nächsten Schritt erfolgte zwei, drei und acht Wochen nach Trepanation und Futtertausch ein weiteres CT. Anschließend wurden jeweils 11-12 Tiere aus jeder Futtergruppe mit Kohlenstoffdioxid narkotisiert und durch Dekapitation getötet. In Folgearbeiten konnte durch andere Doktoranden mit dem so gewonnenen Material die histologische Auswertung der Studie erfolgen, etwa in der Dissertation von Thole 2014.

Wie der Abb. 8 und Tab. 2 zu entnehmen ist, erhielt die Hälfte der 3. Obduktionsgruppe eine zusätzliche Vibrationstherapie in den letzten zwei Versuchswochen.

Über die gesamte Versuchsdauer verteilt, wurde an sechs relevanten Zeitpunkten das Körpergewicht der Tiere mittels einer Tierwaage (Waage basic lite BL3, Sartorius) erfasst und dokumentiert.



**Abb. 8: zeitlicher Versuchsablauf**

CT1: alle 180 Tiere erhalten eine computertomographische Untersuchung vor Orx und Vibration, Kontroll CT: acht Tiere erhalten nach Orx und vierwöchiger Vibration ein CT (= 4 Wo n. Orx +V) und acht orx Tiere ohne Vibrationstraining erhalten ein CT (= 4 Wo n. Orx non-V), CT2 der 1. Obd.: jeweils 11-12 trepanierte Tiere erhalten nach zwei wöchiger Substanzapplikation(sf, GEN, EQ) ein CT , CT2 der 2. Obd.: jeweils 11-12 trepanierte Tiere erhalten nach dreiwöchiger Substanzapplikation (sf, GEN, EQ) ein CT, CT2 der 3. Obd. trepanierte und z.T. erneut vibrierte Tiere erhalten nach achtwöchiger Substanzapplikation (sf, GEN, EQ) eine CT Untersuchung

### 2.3 Orchidektomie (orx)

Die Orchidektomie erfolgte unter Isofluran. Durch Palpation der Bauchhöhle wurden die Hoden der Ratte beidseits aufgesucht. Nach medialer Inzision der Skrotalhaut wurde das viszerale Peritoneum durchtrennt, um den Hoden zu präparieren. Im Anschluss an die Darstellung des Hodens wurde der Ductus epididymidis mit Gefäßen durch Vicryl-Fäden

ligiert und nach Unterbindung der Blutversorgung entfernt. Anschließend wurde das Operationsfeld auf Blutungsfreiheit kontrolliert. Das beschriebene Verfahren wurde auf der kontralateralen Seite durchgeführt, woran sich der Verschluss der Skrotalhaut mittels Vicryl-Fäden anschloss.

Um eine postoperative Dehydratation zu verhindern, wurden 5 ml isotoner NaCl-Lösung (Braun) subkutan verabreicht. Während der Aufwachphase standen die Tiere durchgängig unter Beobachtung.

Es folgte eine analgetische Prophylaxe mit Rimadyl (Pfizer) 0,2 ml/Tier s.c. (in der Lösung 1:10).

## 2.4 Gruppeneinteilung und Behandlung

Eine Gruppeneinteilung der Tiere erfolgte ab dem Zeitpunkt der Vibrationstherapie in zwei Behandlungsgruppen, jeweils mit bzw. ohne Vibrationstherapie (siehe Tab. 2). Alle 180 Versuchstiere erhielten zu dem Zeitpunkt sf Futter.

Nach erfolgter Vibrationstherapie und Trepanation bei 172 Tieren wurden die Versuchstiere zufällig in fünf gleich große Gruppen eingeteilt und mit verschiedenen Futterarten behandelt (Tab. 2). Jede Futterarten Gruppe (ca. 34-36 Tiere) setzte sich zusammen aus drei Untergruppen (1., 2., und 3. Obduktion), wobei jeweils 11-12 Tiere eine Obduktionsgruppe bildeten. Die acht nicht-vibrierten Tiere dienten als Kontrollgruppe zum Knochendichtevergleich zwischen Tieren mit bzw. ohne Vibration. Die Kontrollgruppe wurde unmittelbar nach dem Zeitraum der Vibrationstherapie obduziert.

### Gruppeneinteilung vor Trepanation (1. Versuchsabschnitt)

GRUPPE	ANZAHL DER TIERE	FUTTERART	VIBRATIONS-THERAPIE 5 Tage/Woche 3x 5min bei 25-30-30 Hz	ZEITPUNKT OBDUKTION
sf+Vibro	172	sojafreies, phytoöstrogenarmes Futter	Vibrationstherapie über vier Wochen	siehe Tab. 2
Co-sf-non-Vibro	8	sojafreies, phytoöstrogenarmes Futter	keine Vibrationstherapie	02.06.09

**Tab. 1: Gruppeneinteilung und Behandlung vor Trepanation (1. Versuchsabschnitt)**

sf+Vibro: Tiere mit Vibrationstraining. Co-sf-non-Vibro: Kontrollgruppe ohne Vibrationstraining

**Gruppeneinteilung nach Trepanation (2. Versuchsabschnitt)**

GRUPPE	ANZAHL DER TIERE	FUTTERART	ZEITPUNKT OBDUKTION	BESONDERHEIT
Co-sf 1. Obduktion	12	sojafreies, phytoöstrogenarmes Futter	zwei Wochen nach Trep	
Co-sf 2. Obduktion	12	sojafreies, phytoöstrogenarmes Futter	drei Wochen nach Trep	
Co-sf 3. Obduktion	12	sojafreies, phytoöstrogenarmes Futter	acht Wochen nach Trep	50% der Tiere erhielten 2 Wo vor Obdukt. Vibro
Genistein 1. Obduktion	11	genisteinhaltiges Futter (1 g/kg)	zwei Wochen nach Trep	
Genistein 2. Obduktion	12	genisteinhaltiges Futter (1 g/kg)	drei Wochen nach Trep	
Genistein 3. Obduktion	11	genisteinhaltiges Futter (1 g/kg)	acht Wochen nach Trep	50% der Tiere erhielten 2 Wo vor Obdukt. Vibro
Equol 1. Obduktion	11	equolhaltiges Futter (400 mg/kg)	zwei Wochen nach Trep	
Equol 2. Obduktion	11	equolhaltiges Futter (400 mg/kg)	drei Wochen nach Trep	
Equol 3. Obduktion	12	equolhaltiges Futter (400 mg/kg)	acht Wochen nach Trep	50% der Tiere erhielten 2 Wo vor Obdukt. Vibro

**Tab. 2: Gruppeneinteilung und Behandlung der 104 vibrierten Tiere nach Trepanation (2. Versuchsabschnitt)**

Rot: Kontrollgruppe, die sojafreies phytoöstrogenarmes Futter erhalten hat

Grün: Behandlungsgruppe mit genisteinhaltiger Ernährung

Blau: Behandlungsgruppe mit equolhaltiger Ernährung

### 2.4.1 Tierfutter/ Testsubstanzen

Bis zu dem Zeitpunkt der Trepanation stand den Tieren über die Raufen der Käfige das sojafreie Futter frei zur Verfügung. Nach dieser erfolgte die Applikation der Testsubstanzen oral als Futterzusatz, welche die Fa. Ssniff auf Basis des Futters „SM R/M“ herstellte. Die bei dem Versuch verwendeten Substanzen Genistein und Equol wurden vor Versuchsbeginn an das Unternehmen gesandt und dem Futter beigefügt. In welcher Konzentration die jeweilige Substanz dem sojafreien Futter beigemischt wurde kann der Tab. 2 entnommen werden.

Regelmäßig wurden die in den Raufen der Käfige verbliebenen Nahrungsmengen gemessen, um so auf die verzehrten Futtermengen zu schließen

## 2.5 Vibrationstherapie



**Abb. 9: SwingVibe Ganzkörper-Vibrationsgerät**  
(eigenes Foto)

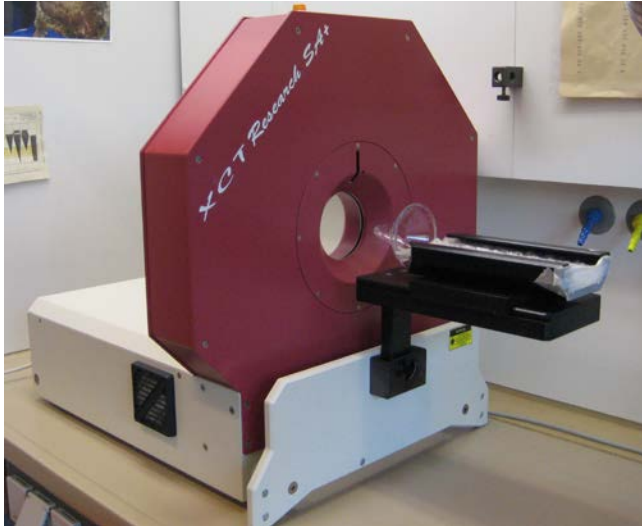
Die Vibrationstherapie erfolgte mit dem SwingVibe Ganzkörper Vibrationstrainingsgerät im Trainingsmodus „Monoswing“. Dieser Modus garantiert gleich starke vertikale Schwingungen an jeder Stelle der Vibrationsplatte.

Mit Hilfe des vom Hersteller mitgelieferten Bedienelements lassen sich verschiedene Vibrationsfrequenzen einstellen. Auf

Grund wissenschaftlicher Studien, sowie erfolgreicher Ergebnisse mit der Vibrationstherapie in der Abteilung für Klinische und Experimentelle Endokrinologie wurde die Vibrationsfrequenz festgelegt auf 25-30 Hz mit der Amplitude 4mm. Täglich wurden die Tiere für insgesamt 15 min vibriert. Die Durchführung erfolgte immer in der Stärke 25/30/30 Hz à 5 min. Die Vibrationstherapie fand bei den Tieren über einen Zeitraum von vier Wochen Anwendung, in der die Tiere fünf Tage/Woche in dem oben beschriebenen Rhythmus vibriert worden sind. Auf der Vibrationsplatte konnten zwei Makrolon®- Käfige Typ IV nebeneinander platziert werden. Die Käfige hatten an der gesamten Unterfläche Kontakt zur Vibrationsplatte, wodurch den Tieren die Möglichkeit genommen wurde, sich der Vibration zu entziehen. Für die Vibrationstherapie setzte man die Versuchstiere in zwei Makrolon®- Käfige Typ IV ohne Einstreu, Futter oder Wasser. Daraufhin wurden zwei Käfige nebeneinander auf der Vibrationsplatte mit Spanngurten sowohl aneinander als auch an der Vibrationsplatte fixiert. Somit konnten unerwünschte Bewegungen der Käfige gegeneinander, als auch von der Platte, ausgeschlossen werden.

## 2.6 Computertomographie (qCT)

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe eines peripheren quantitativen CT-Gerätes (qCT) (Abb. 10), das speziell für Kleintiere entwickelt und zugelassen ist, verschiedenste Messungen der Tibia und des paratibialen Fettdepots durchgeführt werden.



**Abb. 10:** Das qCT-Gerät  
(eigenes Foto)

## 2.7 qCT-Gerät

Die Messungen der Tibiae wurden mit einem qCT-Gerät (XCT-Research Bone Scanner, Fa.Stratec Medizintechnik, Pforzheim) durchgeführt. Bei diesem Gerät handelt es sich um einen vollautomatischen Computertomographen, mit dem die Knochendichte und andere geometrische Knochenparameter mittels peripher quantitativer Computertomographie bestimmt werden können. Das qCT-Gerät ist ausdrücklich für Messungen an Kleintieren entwickelt worden und für den Menschen nicht zugelassen (Helterbrand et al. 1997). Nach dem qCT-Scan wurden die Messdaten auf einen PC übertragen, wo sie bearbeitet und ausgewertet werden konnten. Für diesen Zweck konnte ein vom Hersteller mitgeliefertes Programm genutzt werden.

### 2.7.1 Messvorgang

Um Störungen während des Messvorgangs durch Bewegungen der Tiere zu vermeiden, standen die Tiere unter Narkose. Eine Inhalationsnarkose mit Isofluran (Forene®, Abbot) wurde dabei angewandt. Für eine bessere Vergleichbarkeit der qCT-Bilder untereinander

wurden die Tiere für die Messung der linken Tibia identisch positioniert und rechtsseitig gelagert. Zusätzlich fixierte ein u-förmiges Hilfsstück den Fuß, um das Bein in eine gestreckte Lage zu positionieren. Die Messdauer betrug ca. sieben Minuten. Nach Beendigung des Messvorgangs wurden die Tiere für die Aufwachphase in einzelnen Käfigen separiert, dabei ihr Wohlbefinden ständig kontrolliert.

### 2.7.2 Messprinzip

Das Messprinzip des qCT basiert auf einer gefilterten Rückprojektion. Als erstes wird ein Absorptionsprofil erstellt, mittels Absorption von Röntgenstrahlen durch ein Objekt. Nach anschließender Korrektur der Rohdaten und darauf folgender mathematischer Verknüpfung möglichst vieler Absorptionsprofile aus verschiedenen Winkeln, werden Querschnittsbilder berechnet, die möglichst exakt dem ursprünglichen Messobjekt entsprechen sollen. Jedem Bildpunkt ist ein Schwächungskoeffizient zugeteilt, der in  $1/\text{cm}$  angegeben wird. Durch Kalibrierung mittels bekannter Hydroxyapatit-Konzentration können die Schwächungskoeffizienten in Dichtewerte ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) umgerechnet werden.

Für die Messung der Tibia wird zunächst ein Übersichtsscan (SV-Scan) angefertigt und so die Epiphyse lokalisiert. Der Messbereich wird darauf folgend durch Positionierung einer Referenzlinie genauer definiert. Dies erfolgt über einen Vorschlag der Software, der andernfalls manuell verändert werden kann. Von der Referenzlinie ausgehend wurden drei Messungen nach distal durchgeführt, wobei zwei im Bereich der Metaphyse, eine im Bereich der Diaphyse lokalisiert war. Der zu messende Bereich wird in 1mm Schritte längs der Ratte mäanderförmig abgescannet, wobei der Messstrahl quer durch das Objekt hindurch geht.

Die Objektvermessung erfolgt in einem Winkelbereich von  $180^\circ$ . Der Messstrahl durchdringt dabei das Objekt quer zur Knochenachse, wobei nach jedem Linearscan das Messsystem um  $12^\circ$  gedreht wird. Der Winkelabstand der Detektoren zur Quelle beträgt  $1^\circ$ , womit nach 15 CT-Scanpositionen 180 Winkelschnitte für die CT-Bildauswertung zur Verfügung stehen.

Bei der Messung entsteht ein farblich codiertes digitales Rasterbild in dem die Knochenanteile hell und die Weichteile dunkel dargestellt sind.

Die Messdaten werden zur Auswertung im Computer gespeichert und die Querschnittsbilder durch ein voll automatisiertes Programm zur Datenauswertung berechnet. Im ersten Schritt werden vom Gesamtquerschnittsbild Knochen und Weichteilgewebe voneinander abgegrenzt (Schwellenwert  $280 \text{ mg}/\text{cm}^3$ ). Als zweites kann zwischen Spongiosa und Kortikalis

unterschieden werden. Dazu wird eine Schwelle zwischen 400 und 710 mg/cm<sup>3</sup> gewählt. Alle Bildpunkte mit einer Dichte unterhalb dieser Schwelle werden der Spongiosa, sämtliche mit einer Dichte oberhalb der Schwelle werden der Kortikalis zugeordnet. Des Weiteren können verschiedene Parameter des Knochens und des umliegenden Gewebes bestimmt werden wie z.B. das paratibiale Fettdepot und die Muskelfläche.

Zur Dokumentation lassen sich die Daten, sowie die Querschnittsbilder ausdrucken.

## 2.8 Trepanation



**Abb. 11: Trepanation der Metaphyse**  
(Wiese)

Unmittelbar nach der vierwöchigen Vibrationstherapie und somit fünf Wochen nach Orx wurden die Tiere unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. med. G. Wiese trepaniert.

Die Anästhesie erfolgte mit Isofluran (Forene® Abbott). Zur Analgesie sind 0,1 ml pro 500 g BW Metacam (Fa. Boeringer) s.c. verabreicht worden. Zur perioperativen Infektionsprophylaxe applizierte man 0,1 ml/kg BW Hostamox (Fa. Intervet) i.m.

Anschließend wurde das Fell der Tiere im Bereich der hinteren Extremitäten mit einem Elektrorasierer (Fa. Moser) geschoren.

Unter strengen sterilen Bedingungen ist 3 mm unterhalb des Kniegelenks auf der Vorderkante der Tibia eine ca. 8-10 mm lange Haut- und Periostincision mit einem 15er-Skalpell vorgenommen worden. Mit Hilfe eines kleinen Raspatoriums nach Partsch konnte nun die mediale Knochenfläche der Tibia freipräpariert werden. Als nächstes wurde mit einem Knochenbohrer (1,5 mm Durchmesser) ein Loch in die Kortikalis der Metaphyse gebohrt. Während des Bohrens erfolgte ein ständiges Spülen und Kühlen mittels isotoner NaCl- Lösung. Abschließend ist die Hautwunde einschichtig mit einem 4-0 monophilen Kunststofffaden (Fa. ETHICON) verschlossen und die Haut nochmals mit Kodan (Schülke & Mayr) desinfiziert worden. Um mögliche Schmerzen zu vermeiden,



behandelte man die Tiere am ersten und zweiten Tag nach der Operation subkutan mit 0.2 ml Metacam (Fa. Boeringer).

Um nach der Obduktion das gewonnene Knochenmaterial histologisch mit einer Fluoreszenzuntersuchung auswerten zu können, sind den Tieren unter Isofluran (Forene® Abbott)-Narkose folgende Substanzen verabreicht worden:

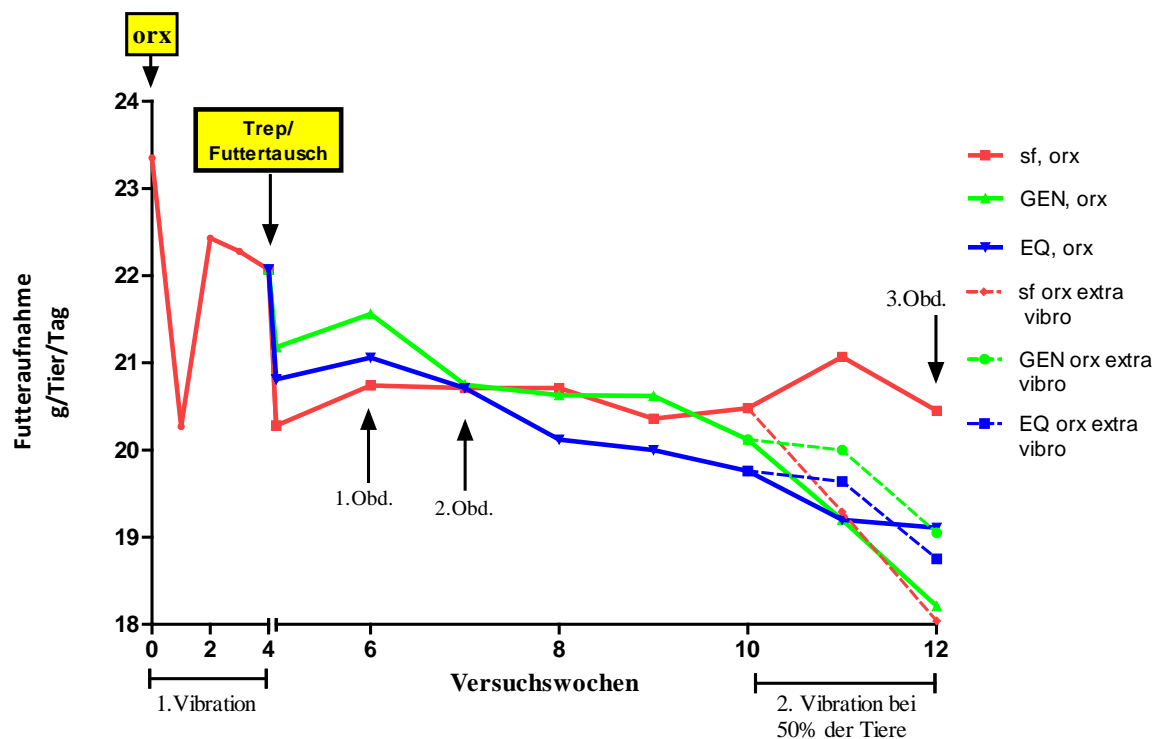
Für die histologische Auswertung wurde den Tieren sieben Tage nach Orchidektomie den Tieren Tetrazyklinhydrochlorid 95% (Sigma) in der Konzentration 25mg/kg BW in 0,9%NaCl und 7 Tage nach der Trepanation Alizarin- Komplexon (Merk) in der Konzentration 30 mg/kg BW in Aqua. Dest.+ N NaOH auf pH 7,2 verabreicht.

## **2.9 Statistische Methoden**

Die Werte für die Statistik wurden mit dem Computerprogramm Graph Pad Prism 4® berechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,0001$  festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Anwendung eines unpaaren t-Test.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Futterraufnahme



**Abb. 12: Futterraufnahme der Tiere in den Versuchswochen 1-4 unter Vibrationstraining und den Wochen 4-12 während der Phytohormonapplikation.**

Dargestellt sind Mittelwerte. n = 172 Tiere bzw. nach Trepanation/Futtertausch n = 11-12 Tiere pro Substanzgruppe/pro Obd.. Futterraufnahme der orx. Tiere ab Versuchsbeginn während Vibration (Woche 1-4) und nach Trepanation unter der Aufnahme von sojafreiem Kontrollfutter, EQ oder GEN für 2,3 und 8 Wochen (1.-3. Obd./Woche 4-12). 50% der Tiere der 3. Obduktionsgruppe bekamen eine zusätzliche Vibrationstherapie.

#### Durchschnittlich aufgenommene Substanzmenge vor und nach Trepanation

Futtergruppe	Durchschnittliche Futterraufnahme vor Trepanation und Futterumstellung in Gramm/Tier/Tag	Durchschnittliche Futterraufnahme nach Trepanation und Futterumstellung in Gramm/Tier/Tag	Dosis der gefütterten Substanzen in g/kg Futter	Durchschnittlich aufgenommene Substanzmenge nach Trepanation und Futterumstellung in mg/Tier/Tag
sojafrei	22,07	20,9		
Genistein	22,07 (sf)	20,7	1	20,7
Equol	22,07 (sf)	20,46	0,4	8,18

**Tab. 3: Durchschnittliche Futterraufnahme und aufgenommene Substanzmenge vor und nach Trepanation und Futtertausch**

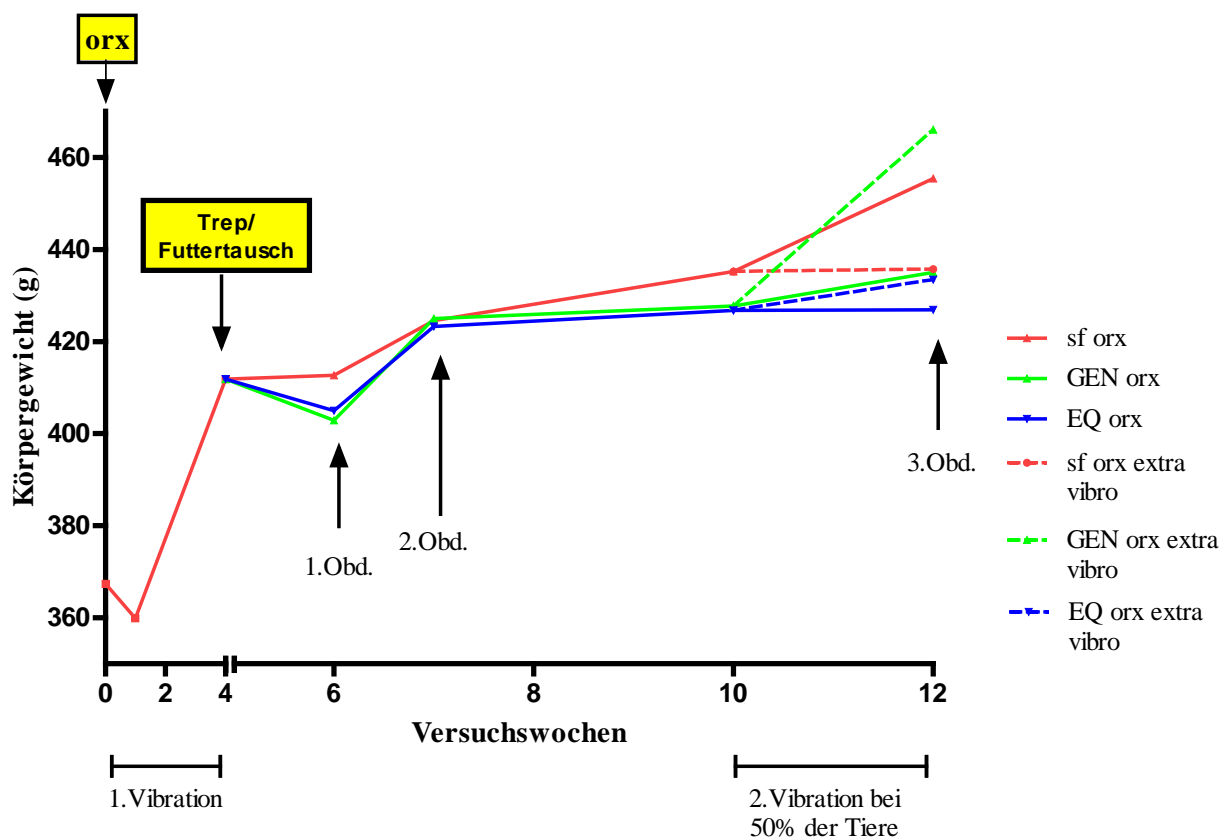
Die durchschnittlichen Futterraufnahmen der Tiere ist in der Abb. 12 und der Tab. 3 dargestellt. In den ersten vier Wochen des Versuches (= 1.Versuchsabschnitt, Abb. 12)

nahmen die Tiere unter der Vibrationstherapie durchschnittlich 22,07 g sojafreies Futter pro Tier/Tag zu sich.

Für die Futteraufnahme nach Trepanation und Futtertausch ist zu beachten, dass die im Graphen bezeichnete 1.-3. Obd. ein Hinweis für den zeitlichen Versuchsablauf darstellt und hier nicht die durchschnittliche Futteraufnahme der einzelnen Obduktionsgruppe gezeigt ist. Das heißt zum Zeitpunkt der 1. Obd. ist die durchschnittliche Futteraufnahme aller Versuchstiere dargestellt. Zum Zeitpunkt der 2. Obd. ist die Aufnahme der verbliebenen Tiere (2. und 3. Obd.gruppe) zu sehen. Der erhobene Messwert aus Woche 12 stellt die durchschnittliche Futteraufnahme der noch verbliebenen 3. Obd.gruppe dar. Diese vereinfachende Darstellung wurde gewählt, da sich in den Rohdaten, wie bei Ratten einer Rasse gleichen Ausgangsalters und –gewichts zu erwarten, keine signifikanten Unterschiede in der Futteraufnahme zwischen den einzelnen Obduktionsgruppen zeigte.

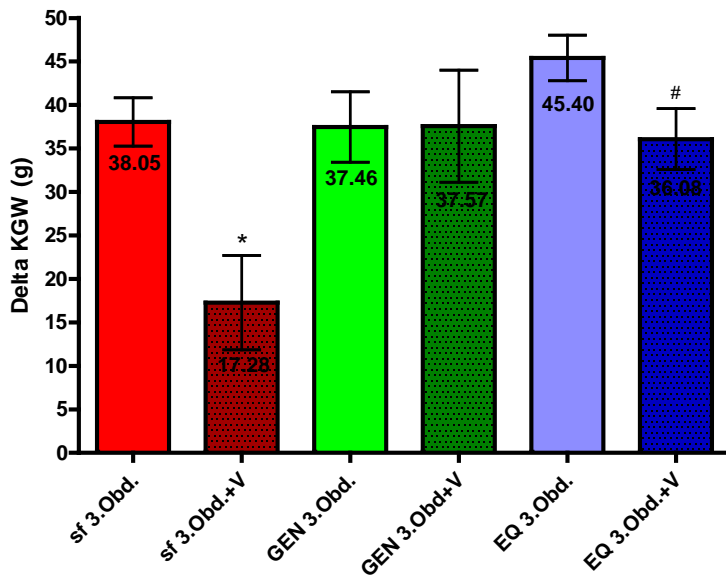
Während des zweiten Versuchsabschnitts (Woche 4-12) veränderte sich innerhalb von acht Wochen die durchschnittliche Futteraufnahme von 22,07 g auf 20,9 g pro Tier/Tag zum Zeitpunkt der Trepanation und des Futtertausches in der sojafreien Kontrollgruppe. Bei den mit GEN gefütterten Tieren sank der Wert durchschnittlich auf 20,7 g, bei der EQ-Gruppe auf 20,46 g pro Tier/Tag. In Tab. 3 ist noch einmal die durchschnittliche Futteraufnahme sowie die aufgenommene Substanzmenge der Wirkstoffe GEN und EQ dargestellt.

### 3.2 Körpergewicht



**Abb. 13: Entwicklung des Körpergewichts nach zwei- drei- und achtwöchiger Phytohormonapplikation**

Entwicklung des Körpergewichts der orx. und vibrierten Tiere ab Versuchsbeginn und 2, 3, und 8 Wochen (1., 2., und 3. Obduktionsgruppe) nach Trepanation unter der Aufnahme von sojafreiem Kontrollfutter, EQ oder GEN. 50% der Tiere der 3. Obduktionsgruppe bekamen eine zusätzliche Vibrationstherapie.



**Abb. 14: Delta Körpergewicht der 3. Obduktionsgruppe zwischen Trepanation/Futtertausch und Obduktion**

Darstellung der Körpergewichtszunahme innerhalb der achtwöchigen Phytohormonapplikation. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  versus sf, # $p < 0,05$  versus sf+V

Die Ermittlung des Körpergewichts fand an sechs verschiedenen Zeitpunkten statt. Während der CT1-Untersuchung wurde die erste Erhebung durchgeführt. Anschließende Messungen erfolgten zum Zeitpunkt der Orx, der Gabe von Calcein, der Trepanation und zum Zeitpunkt der Gabe von Alizarin. Abschließend wurden die Tiere kurz vor der Obduktion, im Rahmen der 2. CT-Untersuchung gewogen. Analog zur Futteraufnahme wurden auch für die Darstellung des Körpergewichts die Substanzgruppen vereinfachend jeweils als eine Linie dargestellt (siehe Beschreibung der Abb. 12).

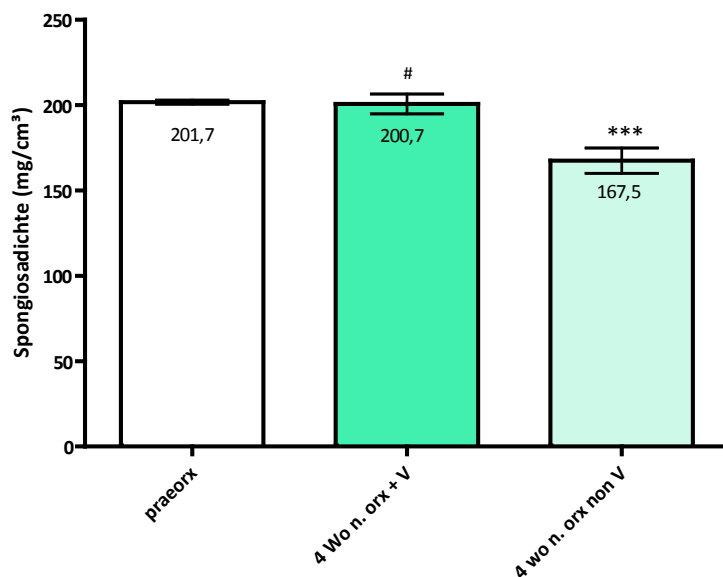
Das durchschnittliche Körpergewicht lag zu Beginn des Versuchs bei 367,4 g. Nach einer geringen Gewichtseinbuße kurz nach der Orx von 7,5 g = 2,04%, nahmen die Ratten während der Vibrationstherapie stetig an Gewicht zu: Zunahme von 44,48 g = 12,1% zum Zeitpunkt der Orx bis zur Trepanation. Anschließend erhielten die Tiere unterschiedliches Futter. Dies spiegelt sich auch in der Gewichtsentwicklung wider. Bei der Gruppe, die weiterhin mit sojafreiem Pellet-Futter ernährt wurde, ist eine kontinuierliche Gewichtszunahme zu beobachten. Annähernd gleich nehmen auch die Tiere, bei denen GEN verabreicht wurde an Gewicht zu, wobei diese Tiere zunächst unmittelbar nach der Futterumstellung gering abnehmen. Entsprechend den Genistein-Tieren verlieren auch die Tiere, denen EQ angeboten wurde zunächst Gewicht. Kurz darauf ist auch hier eine Gewichtszunahme zu

erkennen, die allerdings insgesamt unter der von den Sojafreien- und Genistein-Tieren bleibt. Es ist zu beachten, dass die Tiere der 2. und 3. Obduktionsgruppe, auf Grund ihres längeren Lebens, folglich ein höheres Endgewicht erreichen als Tiere der 1. Obduktionsgruppe. Die zusätzlich vibrierten der sf- und EQ-Tiere der 3. Obduktionsgruppe (sf 3. Obd +V und EQ 3. Obd. +V) haben in dem Zeitraum der achtwöchigen Phytohormonapplikation und erneuten Vibration weniger Gewicht zugenommen als die Tiere gleicher Wirkstoffgruppe ohne erneute Vibration (Abb. 14).

### 3.3 Ergebnisse der Knochenparameter der Tibia in Höhe der Metaphyse durch qCT-Messung, vier Wochen nach Orx.

Im Folgenden wurde untersucht, wie sich ein vierwöchiges Vibrationstraining (5 d/week/15 min) auf den Erhalt der Knochendichte bzw. die Knochenbeschaffenheit auswirkt. Die Messungen wurden in der Metaphyse durchgeführt, da sich in diesem Abschnitt die Osteoporose stark manifestiert (Wronski et al. 1985) und die spongiösen Knochenteile sehr sensibel auf Östrogen reagieren (Hertrampf et al. 2006). Sie sind als Graph in Abb. 15 dargestellt. Weitere erhobene Knochenparameter folgen in tabellarischer Form.

#### 3.3.1 Spongiosadichte der Tibia in Höhe der Metaphyse



**Abb. 15: Spongiosadichte vor Orchidektomie und nach Orchidektomie mit/ohne Vibration**

Spongiosadichte der Tibia in Höhe der Metaphyse in  $\text{mg}/\text{cm}^3$  vor Orx und nach Orx mit und ohne vierwöchiger Vibrationstherapie. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM; praeorx: n = 180 Tiere, 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere, 4 Wo n. Orx non-V: n = 8 Tiere; \*\*\* $p < 0,0001$  versus praeorx; # $p < 0,05$  versus 4 Wo n. Orx non-V

Bei den intakten praeorx Tieren wurde, wie in Abb. 15 gezeigt, zu Beginn eine durchschnittliche Spongiosadichte von  $201,7 \text{ mg}/\text{cm}^3$  ermittelt. Vibrierte Tiere (im Graphen dargestellt als 4 Wo n. orx + V) konnten ihre Spongiosadichte gegenüber den Werten vor der Orx (praeorx) halten bei  $200,7 \text{ mg}/\text{cm}^3$  (entspricht 99,5% des Ausgangswertes). Die Spongiosadichte der nicht-vibrierten (4 Wo n. orx non-V) Tiere hat signifikant gegenüber den intakten Tieren abgenommen auf  $167,5 \text{ mg}/\text{cm}^3$ , was nur noch

83,1% des Ausgangswertes entspricht. Insgesamt konnte ein signifikanter Vorteil bei den vibrierten Tieren gegenüber den nicht-vibrierten festgestellt werden.

### 3.3.2 Knochenparameter der Tibia in Höhe der Metaphyse

Knochenparameter/ Gruppen	praeorx	4 Wo n. Orx + V	4 Wo n. Orx non V
<b>Kortikalisdichte mg/cm<sup>3</sup></b>	982,7 ± 1,362	1118 ± 4,516 *** ###	1086 ± 5,363 ***
<b>Gesamtquerschnittsfläche mm<sup>2</sup></b>	19,08 ± 0,075	17,82 ± 0,28 ** #	19,10 ± 0,28
<b>Spongiosaquerschnittsfläche mm<sup>2</sup></b>	9,57 ± 0,051	9,44 ± 0,216	8,917 ± 0,188 *
<b>Kortikalisquerschnittsfläche mm<sup>2</sup></b>	5,165 ± 0,019	6,713 ± 0,088 ***	6,859 ± 0,081 ***
<b>Periostaler Umfang mm</b>	15,47 ± 0,030	14,96 ± 0,117 ** ##	15,56 ± 0,132
<b>Endostaler Umfang mm</b>	13,20 ± 0,038	11,80 ± 0,1267 ** ###	12,49 ± 0,137 ***

**Tab. 4: Knochenparameter vor Orchidektomie und nach Orchidektomie mit/ohne Vibration**

Knochenparameter der Tibia in Höhe der Metaphyse vor Orx (praeorx) und nach Orx mit und ohne vierwöchiger Vibrationstherapie (4 Wo n. Orx + V, 4 Wo n. Orx non V). Die Tabelle zeigt Mittelwerte ± SEM; praeorx: n = 180 Tiere, 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere, 4 Wo n. Orx non-V: n = 8 Tiere; \*\*\*p<0,0001 versus praeorx; \*\*p<0,001, \*p<0,05 versus praeorx, ###p<0,0001 versus 4 Wo n. Orx non-V, ##p<0,001 versus 4 Wo n. Orx non-V, #p<0,05 versus 4 Wo n. Orx non-V

In Tab. 4 sind die durchschnittlichen Werte weiterer Knochenparameter dargestellt zum Zeitpunkt vor Orx (praeorx), als auch vier Wochen nach Orx mit/ohne Vibrationstraining. Die Kortikalisdichte stieg bei den vibrierten und nicht-vibrierten Tieren signifikant an. Die vibrierte Gruppe hat mit einer um 32 mg/cm<sup>3</sup> höheren Kortikalisdichte einen signifikanteren Vorteil gegenüber den nicht-vibrierten Tieren.

Die Gesamtquerschnittsfläche als auch der periostale Umfang bleiben bei den nicht-vibrierten Tieren annähernd gleich verglichen zum Ausgangswert vor der Orx. Bei den vibrierten Tieren hingegen sinkt sowohl die Fläche als auch der Umfang signifikant, gegenüber den intakten und den nicht-vibrierten Tieren. Der Unterschied zwischen den vibrierten und nicht-vibrierten Tieren ist signifikant.

Die Spongiosaquerschnittsfläche bleibt recht gleich während des Vibrationstrainings. Bei den nicht-vibrierten Tieren sinkt sie jedoch signifikant auf 8,917 mm<sup>2</sup> und entspricht somit nur noch 93,2% des Ausgangswertes.



Der endostale Umfang beträgt bei den intakten Tieren im Mittel 13,20 mm. Innerhalb von vier Wochen sinkt er in beiden Gruppen signifikant. Bei den vibrierten Tieren geht der Umfang um 11,61% zurück (auf 11,80 mm), in der nicht-vibrierten Gruppe um 5,39% auf 12,49 mm. Die Abnahme bei den vibrierten Tieren ist signifikant gegenüber den nicht-vibrierten Tieren.

### 3.4 Ergebnisse der absoluten Muskel- und Fettgewebsfläche und deren prozentuale Flächenanteile im Unterschenkelquerschnitt vier Wochen nach Orchidektomie unter Vibrationstraining

Es wurden die Auswirkungen einer vierwöchigen Vibrationstherapie (5 d/week für 15 min) auf die absolute und relative Muskel- und Fettgewebsfläche im Unterschenkelquerschnitt in Höhe der Metaphyse untersucht.

#### 3.4.1 Absolute Muskelfläche und Fettgewebsfläche mit prozentualen Muskelflächen und Fettgewebsflächenanteil im Unterschenkelquerschnitt in Höhe der Metaphyse

Knochenparameter/ Gruppen	praeorx	4 Wo n. orx + V	4 Wo n. orx non V
absolute Muskelfläche	262,8 ± 0,65	298,5 ± 2,469 ***	293,8 ± 4,16 ***
Muskelflächenanteil in %	89,56 ± 0,070	87,00 ± 0,371 ***	87,02 ± 0,342 ***
absolute Fläche paratibialen Fettes	30,71 ± 0,254	44,63 ± 1,38 ***	43,82 ± 1,31 ***
Fettgewebsflächenanteil in %	10,44 ± 0,069	13,00 ± 0,371	12,98 ± 0,342

**Tab. 5: Absolute Muskelfläche und Fettgewebsfläche mit prozentualen Muskelflächen- und Fettgewebsflächenanteil in Höhe der Metaphyse vor Orchidektomie und nach Orchidektomie mit/ohne Vibration**

Das Diagramm zeigt Mittelwerte ± SEM; praeorx: n = 180 Tiere, 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere, 4 Wo n. Orx non-V: n = 8 Tiere; \*\*\*p<0,0001 versus praeorx

Die praeorx intakten Tiere haben zu Beginn im Unterschenkelquerschnitt eine absolute Muskelfläche von 262,8 mm<sup>2</sup>, das entspricht einem prozentualen Muskelflächenanteil von 89,56%. Im Verlauf nimmt die Muskelfläche beider Gruppen signifikant zu. Bei den vibrierten Tieren um 13,6% mehr auf 298,5 mm<sup>2</sup> als bei der Gruppe ohne Vibration: Anstieg um 11,8% auf 293,8 mm<sup>2</sup>. Es fällt auf, dass trotz zunehmender Muskelfläche der prozentuale Muskelflächenanteil signifikant sinkt von 89,56% auf 87% bei den vibrierten und 87,02% bei

den nicht-vibrierten Tieren. Zwischen der vibrierten und der nicht-vibrierten Gruppe besteht kein signifikanter Unterschied.

Bezüglich des Fettgewebes kann festgestellt werden, dass vier Wochen nach Orx die absolute Fläche des paratibialen Fettdepots im Unterschenkelquerschnitt signifikant zugenommen hat. So lag diese zu Beginn bei 30,71 mm<sup>2</sup> (praeorx) und nahm dann bei den vibrierten Tieren um 45,4% zu auf 44,63 mm<sup>2</sup>, bei den nicht-vibrierten um 42,7% auf 43,82 mm<sup>2</sup>. Auch der prozentuale Fettgewebsflächenanteil am Gesamtschnitt hat signifikant zugenommen bei den Tieren vier Wochen nach Orx. Weder in der vibrierten, noch in der nicht-vibrierten Gruppe ist bei der Flächenberechnung, als auch in der prozentualen Berechnung keine Signifikanz feststellbar.

### **3.5 Ergebnisse der Knochenparameter der Tibia in Höhe der Metaphyse in den jeweiligen Obduktionsgruppen nach Trepanation (Trep) und Futterumstellung.**

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurden die Auswirkungen der verabreichten Testsubstanzen GEN und EQ, sowie sojafreiem Kontrollfutter auf den Erhalt der Knochendichte, weiterer Knochenparameter und der Frakturheilung nach Orx und Vibration untersucht. Die eingesetzten Testsubstanzen wurden in den jeweiligen Gruppen (den Obduktionsgruppen) unterschiedlich lang verabreicht. Dabei wurden die Knochenparameter nach zwei, drei und acht Wochen (entspricht der 1., 2. und 3. Obduktionsgruppe) mittels CT erfasst. Die Hälfte der Tiere der 3. Obduktionsgruppe erhielt zusätzlich in den letzten beiden Wochen ein weiteres Vibrationstraining. Die Knochenparameter der 1. und 2. Obd. sind in tabellarischer Form dargestellt, die Auswirkungen auf den Knochen nach achtwöchiger Einnahme und erneuter Vibration (3. Obd.) als Graph.

### 3.5.1 Spongiosadichte der Tibia in Höhe der Metaphyse

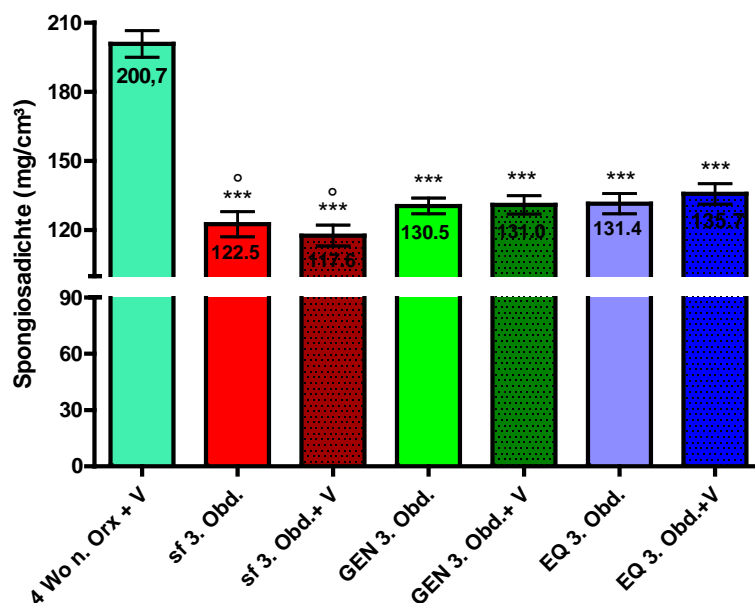
#### a.) Spongiosadichte nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation

Zeitpunkt/Gruppen	sf	GEN	EQ
4 Wo n. Orx + V	200,7 ± 5,79		
1. Obd.	145,6 ± 4,85 ***	141,3 ± 3,73 ***	139,2 ± 3,07 ***
2. Obd.	143,9 ± 3,56 ***	137 ± 3,10 ***	142,3 ± 4,2 ***

**Tab. 6: Spongiosadichte der 1. und 2. Obduktionsgruppe bzw. nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation**

Spongiosadichte der Tibia in Höhe der Metaphyse in mg/cm<sup>3</sup> der orx und vibrierten Tiere zwei und drei Wochen nach Futtertausch und Trepanation. Das Diagramm zeigt Mittelwerte ± SEM; 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere; in den einzelnen Wirkstoffgruppen: n = 10-12 Tiere; 3. Obd. + V: n = 6 Tiere; \*\*\*p<0,0001 versus 4 Wo n. Orx + V

#### b.) Spongiosadichte nach achtwöchiger Substanzapplikation



**Abb. 16: Spongiosadichte nach achtwöchiger Phytohormonapplikation**

Spongiosadichte der Tibia in Höhe der Metaphyse in mg/cm<sup>3</sup> der orx und vibrierten Tiere acht Wochen nach Futtertausch und Trepanation. Das Diagramm zeigt Mittelwerte ± SEM; 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere; in den einzelnen Wirkstoffgruppen: n = 10-12 Tiere; 3. Obd. + V: n = 6 Tiere; \*\*\*p<0,0001 versus 4 Wo n. Orx + V; °p<0,05 versus sf 1. und 2. Obd (hier nicht abgebildet, siehe Tab.6).

Die Tab. 6 und Abb. 16. zeigt die Spongiosadichte in der Metaphyse der Tibia in  $\text{mg}/\text{cm}^3$  2(a), 3(a) und 8(b) Wochen nach Futtertausch und Trepanation. In allen drei Obduktions- und Wirkstoffgruppen fiel die Spongiosadichte nach Futtertausch und Trepanation signifikant ab gegenüber den orx und vibrierten Tieren (4 Wo n. orx + V). Nach acht Wochen beträgt sie noch  $122,5 \text{ mg}/\text{cm}^3$  bzw.  $117,6 \text{ mg}/\text{cm}^3$  bei den sf-Tieren der 3. Obduktionsgruppe, die in den letzten zwei Wochen zusätzlich vibriert worden sind (dargestellt als sf 3. Obd. + V). In Prozenten haben die sf-Tiere zu diesem Zeitpunkt noch eine Spongiosadichte von 61,0% (sf 3. Obd.) bzw. 58,6% (sf 3. Obd. + V). Die Werte der GEN- und EQ-Tiere fallen ebenfalls signifikant ab, jedoch nach acht-wöchiger Umstellung tendenziell etwas weniger als bei den sf-Tieren. So beträgt die Spongiosadichte bei den GEN-Tieren dann  $130,5 \text{ mg}/\text{cm}^3$  bzw.  $131,0 \text{ mg}/\text{cm}^3$  bei den zusätzlich vibrierten. Dies entspricht 65% bzw. 65,3%.  $131,4 \text{ mg}/\text{cm}^3$  bzw.  $135,7 \text{ mg}/\text{cm}^3$  beträgt der Wert bei den EQ-Tieren (EQ 3. Obd.), das einem prozentualen Wert von 65,5% bzw. 67,6% entspricht. Insgesamt führt das zusätzliche Vibrationstraining der 3. Obd. in der sf-Gruppe zu einer Abnahme um 4%, unter GEN und EQ zu einer Zunahme um 0,38% (GEN) bzw 3,27% (EQ).

### 3.5.2 Kortikalisdichte der Tibia in Höhe der Metaphyse

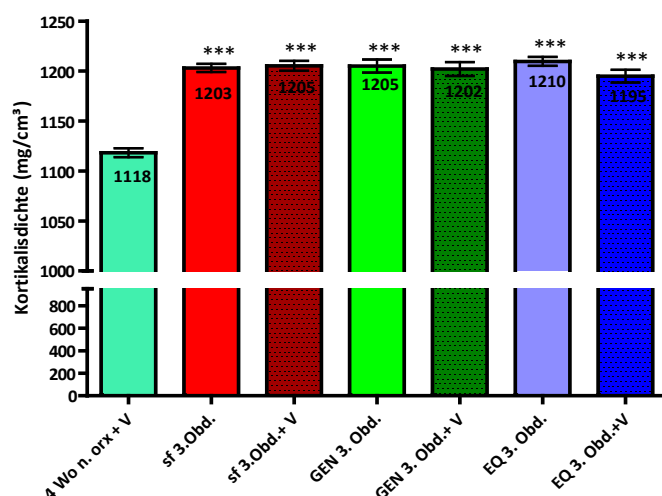
#### a.) Kortikalisdichte nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation

Gruppen	sf	GEN	EQ
<b>4 Wo n. Orx + V</b>	1118 ± 4,52		
<b>1. Obd.</b>	1127 ± 3,46	1146 ± 2,73 *** ## +	1135 ± 4,53 *
<b>2. Obd.</b>	1146 ± 4,48 **	1161 ± 3,54 *** #	1153 ± 4,53 ***

**Tab. 7: Kortikalisdichte der 1. und 2. Obduktionsgruppe bzw. nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation**

Kortikalisdichte der Tibia in Höhe der Metaphyse in  $\text{mg}/\text{cm}^3$  der orx und vibrierten Tiere zwei und drei Wochen nach Futtertausch und Trepanation. Die Tabelle zeigt Mittelwerte ± SEM; 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere; in den einzelnen Wirkstoffgruppen: n = 10-12 Tiere; 3. Obd. + V: n = 6 Tiere; \*\*\*p<0,0001 versus 4 Wo n. Orx + V, \*\*p<0,001 versus 4 Wo n. Orx + V; \*p<0,05 versus 4 Wo n. Orx + V; ## p<0,001 versus sf der gleichen Obd.gruppe; # p<0,05 versus sf der gleichen Obd.gruppe; + p<0,05 versus EQ der gleichen Obd.gruppe

## b.) Kortikalisdichte nach achtwöchiger Substanzapplikation

**Abb. 17: Kortikalisdichte nach achtwöchiger Phytohormonapplikation**

Kortikalisdichte der Tibia in Höhe der Metaphyse in  $\text{mg}/\text{cm}^3$  der orx und vibrierten Tiere acht Wochen nach Futtertausch und Trepanation. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM; 4 Wo n. Orx + V:  $n = 172$  Tiere; in den einzelnen Wirkstoffgruppen:  $n = 10-12$  Tiere; 3. Obd. + V:  $n = 6$  Tiere; \*\*\* $p < 0,0001$  versus 4 Wo n. Orx + V

Die Kortikalisdichte der orx und vibrierten Tiere steigt nach der Trepanation und dem Futterumtausch in allen Gruppen an (Tab. 7 und Abb. 17). Die mit GEN und EQ gefütterten Tiere zeigen einen signifikanten Anstieg in allen dreien Obduktionsgruppen gegenüber den Tieren vor Trepanation und Futtertausch. Die Kortikalisdichte der sf-Tiere ist erst nach drei und acht Wochen signifikant angestiegen. Nach zwei- und drei-wöchiger Behandlung mit GEN haben die Tiere mit  $1146 \text{ mg}/\text{cm}^3$  bzw.  $1161 \text{ mg}/\text{cm}^3$  eine signifikant höhere Kortikalisdichte als die sojafreien Kontrolltiere mit  $1127 \text{ mg}/\text{cm}^3$  bzw.  $1146 \text{ mg}/\text{cm}^3$ . Dies entspricht einer höheren Kortikalisdichte von 1,69% (1. Obd.) bzw. 1,31% (2. Obd.) gegenüber den sf-Tieren. Auch verglichen mit den EQ-Tieren haben die GEN-Tiere der 1. Obduktionsgruppe eine signifikant höhere Kortikalisdichte. Das zusätzliche Vibrationstraining der 3. Obd. führt in keiner der Futtergruppen zu einer wesentlichen Zu- oder Abnahme der Kortikalisdichte. Zwischen den einzelnen Testsubstanzen ist nach achtwöchiger Behandlung kein signifikanter Unterschied mehr feststellbar.

### 3.5.3 Gesamtquerschnittsfläche der Tibia in Höhe der Metaphyse

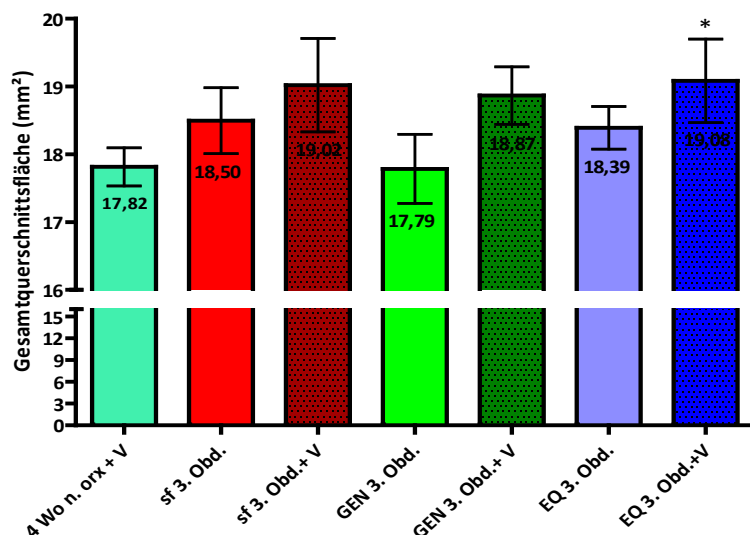
#### a.) Gesamtquerschnittsfläche nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation

Gruppen	sf	GEN	EQ
4 Wo n. Orx + V	17,82 ±		
1. Obd.	19,64 ± 0,316 **	18,89 ± 0,293 *	18,80 ± 0,277 *
2. Obd.	19,41 ± 0,295 **	18,83 ± 0,268 *	18,56 ± 0,282 #

**Tab. 8: Gesamtquerschnittsfläche der 1. und 2. Obduktionsgruppe bzw. nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation**

Gesamtquerschnittsfläche der Tibia in Höhe der Metaphyse in mm<sup>2</sup> der orx und vibrierten Tiere zwei und drei Wochen nach Futtertausch und Trepanation. Die Tabelle zeigt Mittelwerte ± SEM; 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere; in den einzelnen Wirkstoffgruppen: n = 10-12 Tiere; \*\*p<0,001 versus 4 Wo n. Orx + V; \*p<0,05 versus 4 Wo n. Orx + V; # p<0,05 versus sf der gleichen Obd.gruppe

#### b.) Gesamtquerschnittsfläche nach achtwöchiger Substanzapplikation



**Abb. 18: Gesamtquerschnittsfläche nach achtwöchiger Phytohormonapplikation**

Gesamtquerschnittsflächen der Tibia in Höhe der Metaphyse in mm<sup>2</sup> der orx und vibrierten Tiere 2(a), 3(a) und 8(b) Wochen nach Futtertausch und Trepanation. Das Diagramm zeigt Mittelwerte ± SEM; 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere; in den einzelnen Wirkstoffgruppen: n = 10-12 Tiere; 3. Obd. + V: n = 6 Tiere; \*p<0,05 versus 4 Wo n. Orx + V

Die Gesamtquerschnittsfläche der Tibia in Höhe der Metaphyse ist in Tab. 8 und Abb. 18 dargestellt. Zwei Wochen nach Trepanation und Futterumstellung ist sie in allen Tiergruppen signifikant größer gegenüber den Tieren 4 Wo n. Orx +V, wobei bei den sf-Tieren eine größere Flächenzunahme ermittelt werden konnte als bei den GEN- und EQ-Tieren. Dies setzt sich auch in der 2. und 3. Obduktionsgruppe fort. Im Verlauf wird die Fläche dann wieder kleiner, so dass nach 8 Wochen, bis auf bei den EQ-Tieren mit zusätzlichem Vibrationstraining, keine Signifikanz mehr gegenüber der Ausgangsgröße (4 Wo n. Orx +V) feststellbar ist. Das zusätzliche Vibrationstraining der 3. Obd. führt in allen Gruppen zu einer Zunahme des Gesamtquerschnitts. Unter sf-Ernährung ist die Querschnittsfläche um 3% größer, unter GEN um 6%, unter EQ um 4%. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Testsubstanzen lässt sich drei Wochen nach Futterumstellung zwischen den EQ- und sf-Tieren der 2. Obduktionsgruppe feststellen.

### 3.5.4 Spongiosaquerschnittsfläche der Tibia in Höhe der Metaphyse

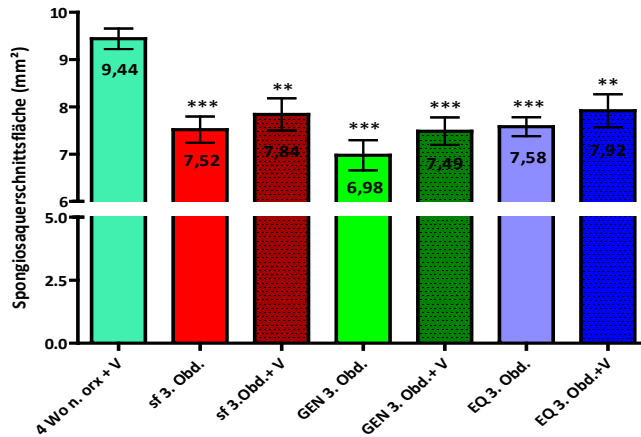
#### a.) Spongiosaquerschnittsfläche nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation

Gruppen	sf	GEN	EQ
<b>4 Wo n. Orx + V</b>	9,441 ± 0,216		
<b>1. Obd.</b>	8,363 ± 0,23 *	8,307 ± 0,171 **	8,040 ± 0,173 ***
<b>2. Obd.</b>	8,183 ± 0,191 **	7,922 ± 0,169 ***	7,792 ± 0,165 ***

**Tab. 9: Spongiosaquerschnittsfläche der 1. und 2. Obduktionsgruppe bzw. nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation**

Spongiosaquerschnittsfläche der Tibia in Höhe der Metaphyse in mm<sup>2</sup> der orx und vibrierten Tiere zwei und drei Wochen nach Futtertausch und Trepanation. Die Tabelle zeigt Mittelwerte ± SEM; 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere; in den einzelnen Wirkstoffgruppen: n = 10-12 Tiere; \*\*\*p<0,0001 versus 4 Wo n. Orx + V, \*\*p<0,001 versus 4 Wo n. Orx + V; \*p<0,05 versus 4 Wo n. Orx + V

## b.) Spongiosaquerschnittsfläche nach achtwöchiger Substanzapplikation



**Abb. 19: Spongiosaquerschnittsfläche nach achtwöchiger Phytohormonapplikation**

Spongiosaquerschnittsfläche der Tibia in Höhe der Metaphyse in mm<sup>2</sup> der orx und vibrierten Tiere 8(b) Wochen nach Futtertausch und Trepanation. Das Diagramm zeigt Mittelwerte ± SEM; 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere; in den einzelnen Wirkstoffgruppen: n = 10-12 Tiere; 3. Obd. + V: n = 6 Tiere; \*\*\*p<0,0001 versus 4 Wo n. Orx +V; \*\*p<0,001 versus 4 Wo n. Orx + V; \*p<0,05 versus 4 Wo n. Orx + V

Betrachtet man die Spongiosaquerschnittsfläche in Tab. 9 und Abb. 19 der orx und vibrierten Tiere so nimmt diese von 9,44 mm<sup>2</sup> im weiteren Versuchszeitraum bei allen Gruppen signifikant und kontinuierlich ab. Im Mittel besitzen die sf-Tiere nach acht Wochen eine Spongiosafläche von 7,68 mm<sup>2</sup>. Prozentual gesehen hat die Fläche um 18,6% abgenommen. Die Abnahme beträgt bei den GEN-Tieren 17,9%, bei den EQ-Tieren ist die Abnahme mit 23,4% am größten. Ein signifikanter Unterschied in den Futtergruppen besteht nicht. Es ist eine Tendenz zu einer größeren Spongiosafläche bei den zusätzlich vibrierten Tieren der 3. Obduktionsgruppe festzustellen. Prozentual gesehen beträgt die Zunahme unter sf 4,26%, unter GEN 7,31%, unter EQ 4,49%.



### 3.5.5 Kortikalisquerschnittsfläche der Tibia in Höhe der Metaphyse

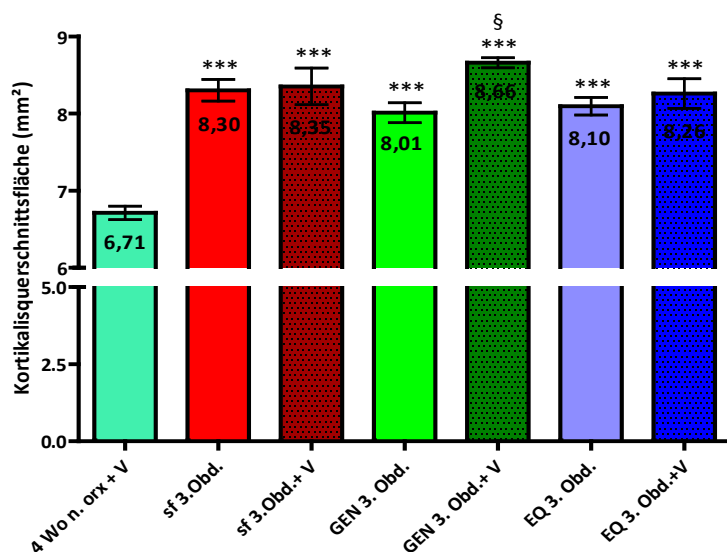
#### a.) Kortikalisquerschnittsfläche nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation

Gruppen	sf	GEN	EQ
4 Wo n. Orx + V	6,713 ± 0,0881		
1. Obd.	7,929 ± 0,12 ***	7,589 ± 0,0822 *** #	7,751 ± 0,098 ***
2. Obd.	8,063 ± 0,092 ***	7,955 ± 0,0615 ***	7,909 ± 0,0756 ***

**Tab. 10: Kortikalisquerschnittsfläche der 1. und 2. Obduktionsgruppe bzw. nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation**

Kortikalisquerschnittsfläche der Tibia in Höhe der Metaphyse in mm<sup>2</sup> der orx und vibrierten Tiere zwei und drei Wochen nach Futtertausch und Trepanation. Die Tabelle zeigt Mittelwerte ± SEM; 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere; in den einzelnen Wirkstoffgruppen: n = 10-12 Tiere; \*\*\*p<0,0001 versus 4 Wo n. Orx + V, # p<0,05 versus sf der gleichen Obd.gruppe

#### b.) Kortikalisquerschnittsfläche nach achtwöchiger Substanzapplikation



**Abb. 20: Kortikalisquerschnittsfläche nach achtwöchiger Phytohormonapplikation**

Kortikalisquerschnittsfläche der Tibia in Höhe der Metaphyse in mm<sup>2</sup> der orx und vibrierten Tiere 8(b) Wochen nach Futtertausch und Trepanation. Das Diagramm zeigt Mittelwerte ± SEM; 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere; in den einzelnen Wirkstoffgruppen: n = 10-12 Tiere; 3. Obd. + V: n = 6 Tiere; \*\*\*p<0,0001 versus 4 Wo n. Orx +V; § p<0,05 versus GEN 3. Obd

Abb. 20 zeigt die Kortikalisquerschnittsfläche der orx und vibrierten Tiere in der Tibia in Höhe der Metaphyse in den jeweiligen Obduktionsgruppen. In allen Obduktions- und Futtergruppen ist eine Signifikanz in der Zunahme der Kortikalisquerschnittsfläche festzustellen.

Die Kombination aus Vibrationstraining und GEN führt in der 3. Obd. zu einer um 8,1% größeren Kortikalisquerschnittsfläche verglichen zur reinen GEN-Einnahme. Bei den sf und EQ-Tieren beträgt der Größenunterschied 0,6% (sf) bzw. 2 % EQ.

### 3.5.6 Periostaler Umfang der Tibia in Höhe der Metaphyse

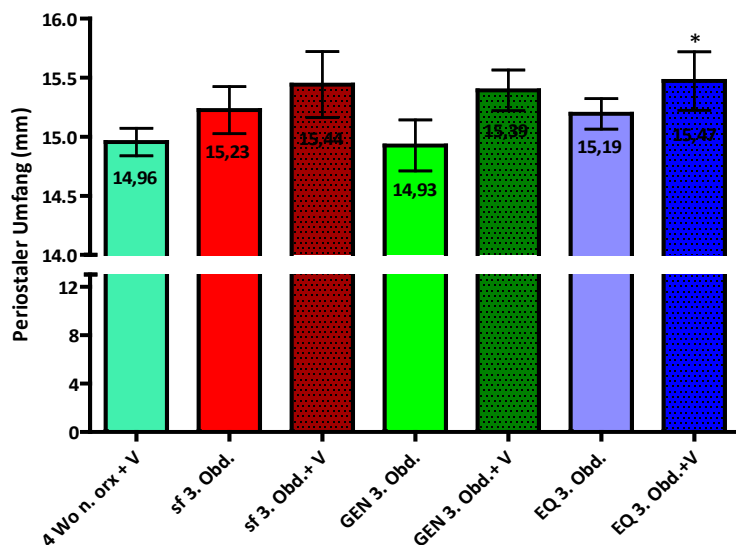
#### a.) Periostaler Umfang nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation

Gruppen	sf	GEN	EQ
<b>4 Wo n. Orx + V</b>	14,96 ± 0,117		
<b>1. Obd.</b>	15,70 ± 0,127 **	15,40 ± 0,119 *	15,36 ± 0,114 *
<b>2. Obd.</b>	15,61 ± 0,12 **	15,38 ± 0,11 *	15,26 ± 0,116 #

**Tab. 11: Periostaler Umfang der 1. und 2. Obduktionsgruppe bzw. nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation**

Periostaler Umfang der Tibia in Höhe der Metaphyse in mm der orx und vibrierten Tiere zwei und drei Wochen nach Futtertausch und Trepanation. Die Tabelle zeigt Mittelwerte ± SEM; 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere; in den einzelnen Wirkstoffgruppen: n = 10-12 Tiere; \*\*p<0,001 versus 4 Wo n. Orx + V; \*p<0,05 versus 4 Wo n. Orx + V  
# p<0,05 versus sf der gleichen Obd.gruppe

## b.) Periostaler Umfang nach achtwöchiger Substanzapplikation



**Abb. 21: Periostaler Umfang nach achtwöchiger Phytohormonapplikation**

Periostaler Umfang der Tibia in Höhe der Metaphyse in mm der orx und vibrierten Tiere 8(b) Wochen nach Futtertausch und Trepanation. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM; 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere; in den einzelnen Wirkstoffgruppen: n = 10-12 Tiere; 3. Obd. + V: n = 6 Tiere; \*\*p<0,001 versus 4 Wo n. Orx + V; \*p<0,05 versus 4 Wo n. Orx + V; # p<0,05 versus sf der gleichen Obd.gruppe

Tab. 11 und Abb. 21 zeigt den periostalen Umfang der orx und vibrierten Tiere in der Metaphyse der Tibia in den jeweiligen Obduktionsgruppen. In allen Obduktionsgruppen ist eine leichte Zunahme des Umfangs von max. 0,74 mm zu beobachten, die zwei und drei Wochen nach Futterumstellung signifikant ist, ausgenommen die EQ-Tiere der 3. Obd.. Zu Beginn haben die Tiere der sf-Gruppe einen höheren periostalen Umfang verglichen zu den GEN- und EQ-Tieren. Nach acht Wochen Behandlung mit unterschiedlichem Futter ist kaum noch eine Differenz zu erkennen, z.T. wird der Umfang wieder etwas kleiner. Jedoch haben nun die zusätzlich vibrierten Tiere der EQ-Gruppe einen signifikant höheren Umfang gegenüber den Tieren 4 Wo nach Orx + V. Insgesamt haben die zusätzlich vibrierten Tiere der 3. Obduktionsgruppe tendenziell einen höheren periostalen Umfang im Vergleich zu den jeweiligen Futtergruppen der 3. Obd. ohne zusätzliche Vibration.

### 3.5.7 Endostaler Umfang der Tibia in Höhe der Metaphyse

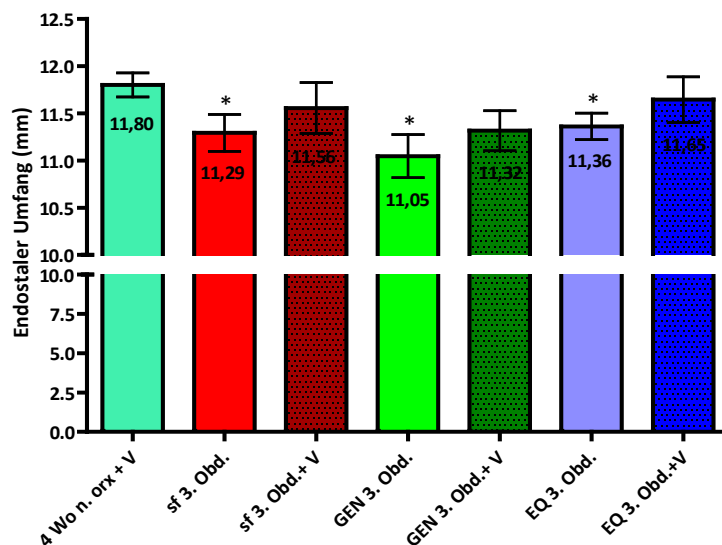
#### a.) Endostaler Umfang nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation

Gruppen	sf	GEN	EQ
<b>4 Wo n. Orx + V</b>	11,80 ± 0,127		
<b>1. Obd.</b>	12,11 ± 0,145	11,90 ± 0,121	11,77 ± 0,123
<b>2. Obd.</b>	11,93 ± 0,124	11,68 ± 0,125	11,56 ± 0,125 #

**Tab. 12: Endostaler Umfang der 1. und 2. Obduktionsgruppe bzw. nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation**

Endostaler Umfang der Tibia in Höhe der Metaphyse in mm der orx und vibrierten Tiere zwei und drei Wochen nach Futtertausch und Trepanation. Die Tabelle zeigt Mittelwerte ± SEM; 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere; in den einzelnen Wirkstoffgruppen: n = 10-12 Tiere; # p<0,05 versus sf der gleichen Obd.gruppe

#### b.) Endostaler Umfang nach achtwöchiger Substanzapplikation



**Abb. 22: Endostaler Umfang nach achtwöchiger Phytohormonapplikation**

Endostaler Umfang der Tibia in Höhe der Metaphyse in mm der orx und vibrierten Tiere 8(b) Wochen nach Futtertausch und Trepanation. Das Diagramm zeigt Mittelwerte ± SEM; 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere; in den einzelnen Wirkstoffgruppen: n = 10-12 Tiere; 3. Obd. + V: n = 6 Tiere; \*p<0,05 versus 4 Wo n. Orx + V

Kurz nach Trepanation und Futtertausch nimmt der endostale Umfang bei den GEN-Tieren und der sf-Kontrollgruppe zu, bei den EQ-Tieren nimmt er ab wie in Tab. 12 gezeigt. Nach achtwöchiger Substanzapplikation ist in allen drei Futtergruppen der Umfang kleiner

geworden Abb. 22. Bei den Tieren der 3. Obduktionsgruppe, welche nicht zusätzlich vibriert worden sind, ist die Abnahme gegenüber den Tieren 4 Wo nach Orx +V signifikant. Sie beträgt max. 0,75 mm bei den GEN-Tieren und entspricht somit einer Abnahme von 6,36% verglichen zu den Tieren vor Trep (4 Wo n. orx +V).

### **3.6 Ergebnisse der absoluten Muskel- und Fettgewebsfläche und deren prozentuale Flächenanteile im Unterschenkelquerschnitt in den jeweiligen Obduktionsgruppen nach Trepanation (Trep) und Futterumstellung**

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurden die Auswirkungen der verabreichten Testsubstanzen GEN und EQ, sowie sf Kontrollfutters, auf die absolute und relative Muskel- und Fettgewebsfläche im Unterschenkelquerschnitt in Höhe der Metaphyse nach Orx, Vibration und Trepanation untersucht. Die eingesetzten Testsubstanzen wurden in den jeweiligen Gruppen (den Obduktionsgruppen) unterschiedlich lang verabreicht. Dabei wurden die Parameter nach zwei, drei und acht Wochen (entspricht der 1., 2. und 3. Obduktionsgruppe) mittels CT erfasst. Die Hälfte der Tiere der 3. Obduktionsgruppe erhielt zusätzlich in den letzten beiden Wochen ein weiteres Vibrationstraining. Zum einen werden im Folgenden sowohl absolute Querschnittsflächen des Muskels oder paratibialen Fettes als auch prozentuale Flächenanteile am Unterschenkelquerschnitt gezeigt. Die Ergebnisse der 1. und 2. Obd. sind in tabellarischer Form dargestellt, die Auswirkungen nach achtwöchiger Einnahme und erneuter Vibration (3. Obd.) als Graph.

### 3.6.1 Absolute Muskelfläche und prozentualer Muskelflächenanteil im Unterschenkelquerschnitt in Höhe der Metaphyse

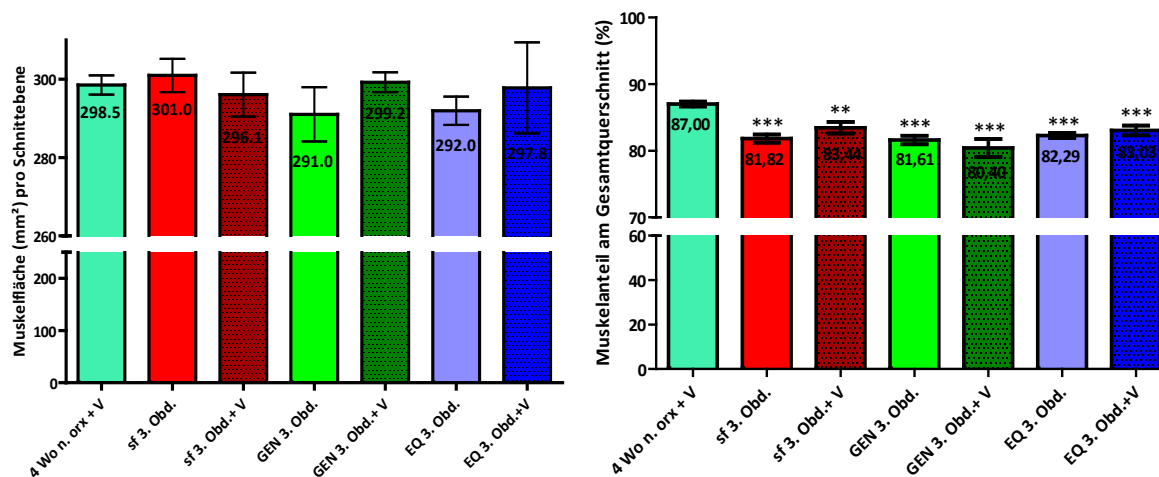
#### Muskelfläche und -anteil nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation

Knochenparameter/ Gruppen	sf	GEN	EQ
absolute Muskelfläche 4 Wo n. Orx + V	298,5 ± 2,47		
Muskelflächenanteil in % 4 Wo n. Orx + V	87 ± 0,38		
absolute Muskelfläche 1. Obd.	297,7 ± 3,56	309,2 ± 3,0 ** #	301,8 ± 3,2 ** #
Muskelflächenanteil in % 1. Obd.	86,23 ± 0,24 *	85,45 ± 0,25 *** #	84,44 ± 0,44 * #
absolute Muskelfläche 2. Obd.	310,9 ± 4,78 *	301,9 ± 2,48 *	306,3 ± 2,9 *
Muskelflächenanteil in % 2. Obd.	84,77 ± 0,31 *	84,84 ± 0,25 *	84,53 ± 0,37 *

**Tab. 13: Muskelfläche und Muskelflächenanteil der 1. und 2. Obduktionsgruppe bzw. nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation**

Absolute Muskelfläche und prozentualer Muskelflächenanteil im Unterschenkelquerschnitt in Höhe der Metaphyse der orx und vibrierten Tiere zwei und drei Wochen nach Futtertausch und Trepanation. Die Tabelle zeigt Mittelwerte ± SEM; 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere; in den einzelnen Wirkstoffgruppen: n = 10-12 Tiere; \*\*\*p<0,0001 versus 4 Wo n. Orx + V, \*\*p<0,001 versus 4 Wo n. Orx + V; \*p<0,05 versus 4 Wo n. Orx + V; # p<0,05 versus sf der gleichen Obd.gruppe

#### a.) Muskelfläche und -anteil nach achtwöchiger Substanzapplikation



**Abb. 23: Absolute Muskelfläche und Muskelflächenanteil nach achtwöchiger Phytohormonapplikation**

Absolute Muskelfläche im Unterschenkelquerschnitt in mm<sup>2</sup> in Höhe der Metaphyse der orx und vibrierten Tiere 8 (b) Wochen nach Futtertausch und Trepanation und Prozentualer Muskelflächenanteil in %. Das Diagramm zeigt Mittelwerte ± SEM; 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere; in den einzelnen Wirkstoffgruppen: n = 10-12 Tiere; 3. Obd. + V: n = 6 Tiere; \*\*\*p<0,0001 versus 4 Wo n. Orx + V; \*\*p<0,001 versus 4 Wo n. Orx + V

Sowohl die Muskelfläche der orx, vibrierten und trepanierten Tiere nach Futtertausch als auch der prozentuale Muskelflächenanteil im Unterschenkelquerschnitt in Höhe der Metaphyse ist in Tab. 13 und Abb. 23 gezeigt. Zunächst steigt die absolute Muskelfläche von 298,5 mm<sup>2</sup> an auf max. 309,2 mm<sup>2</sup> (GEN 1. Obd.), Ausnahme bilden die sf-Tieren der 1. Obduktionsgruppe. Betrachtet man hingegen den prozentualen Anteil, so sinkt dieser nach drei Wochen signifikant von 87% auf 84,84% (GEN 2. Obd.) Es ist festzustellen, dass nach acht Wochen sowohl prozentual als auch in absoluten Werten der Muskelanteil bzw. die Fläche weniger geworden ist. In allen Obduktionsgruppen ist der prozentuale Anteil signifikant gegenüber den Tieren 4 Wo nach Orx +V gesunken. Zwischen den einzelnen Testsubstanzen lässt sich nur ein signifikanter Unterschied zu Beginn feststellen. GEN führt nach zwei Wochen zu einer signifikant höheren Muskelfläche gegenüber den sf-Tieren. Prozentual gesehen ist der Anteil bei den GEN- und EQ-Tiere signifikant unter der der sf-Gruppe.

### 3.7 Absolute Fläche des paratibialen Fettes und prozentualer Fettgewebsflächenanteil im Unterschenkelquerschnitt in Höhe der Metaphyse

#### a.) Fläche des paratibialen Fettes und Fettgewebsflächenanteil nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation

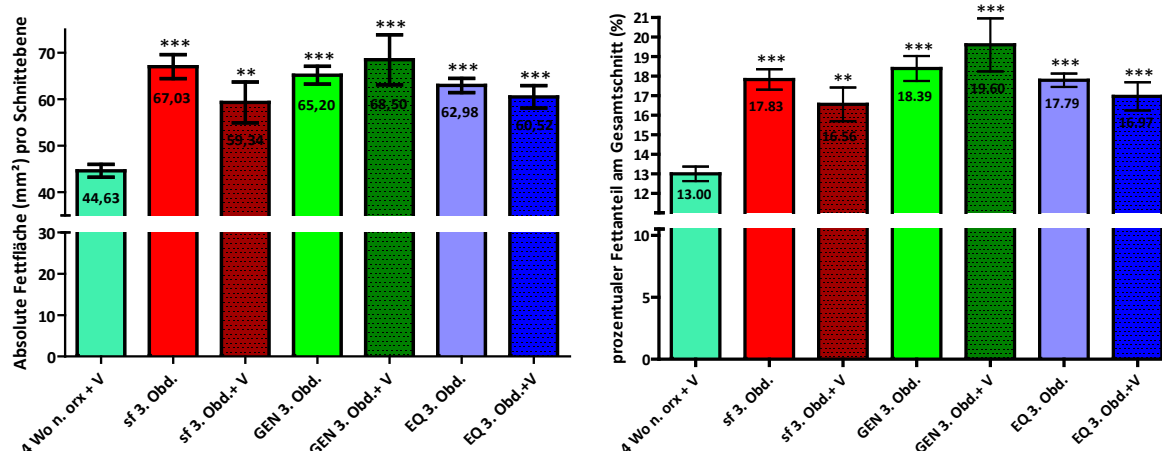
Knochenparameter/ Gruppen	sf	GEN	EQ
absolute Fläche paratibialen. Fettes 4 Wo n. Orx + V	44,63 ± 1,38		
Fettgewebesflächenanteil in % 4 Wo n. Orx + V	13,00 ± 0,37		
absolute Fläche paratibialen Fettes 1. Obd.	47,76 ± 0,96	52,71 ± 1,2 *** #	55,65 ± 1,67 *** ##
Fettgewebesflächenanteil in % 1. Obd.	13,77 ± 0,24	14,57 ± 0,24 ** ##	15,56 ± 0,44 ** ##
absolute Fläche paratibialen Fettes 2. Obd.	56,72 ± 1,3 ***	53,96 ± 1,0 ***	56,17 ± 1,6 ***
Fettgewebesflächenanteil in % 2. Obd.	15,23 ± 0,31 ***	15,13 ± 0,24 ***	15,47 ± 15,47 ***

**Tab. 14: Fläche des paratibialen Fettes und Fettgewebsflächenanteil der 1. und 2. Obduktionsgruppe bzw. nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation**

Absolute Fläche des paratibialen Fettes und prozentualer Fettgewebsflächenanteil im Unterschenkelquerschnitt in Höhe der Metaphyse der orx und vibrierten Tiere zwei und drei Wochen nach Futtertausch und Trepanation. Die Tabelle zeigt Mittelwerte ± SEM; 4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere; in den einzelnen Wirkstoffgruppen: n = 10-12 Tiere; \*\*\*p<0,0001 versus 4 Wo n. Orx + V, \*\*p<0,001 versus 4 Wo n. Orx + V; ## p<0,001 versus sf der gleichen Obd.gruppe; # p<0,05 versus sf der gleichen Obd.gruppe



### b.) Fläche des paratibialen Fettes und Fettgewebsflächenanteil nach achtwöchiger Substanzapplikation



**Abb. 24: Absolute Fläche des paratibialen Fettes nach achtwöchiger Phytohormonapplikation**

Absolute Fläche des paratibialen Fettes im Unterschenkelquerschnitt in mm<sup>2</sup> in Höhe der Metaphyse der orx und vibrierten Tiere 8(b) Wochen nach Futtertausch und Trepanation und prozentualer Fettgewebsflächenanteil in %. Das Diagramm zeigt Mittelwerte ± SEM;

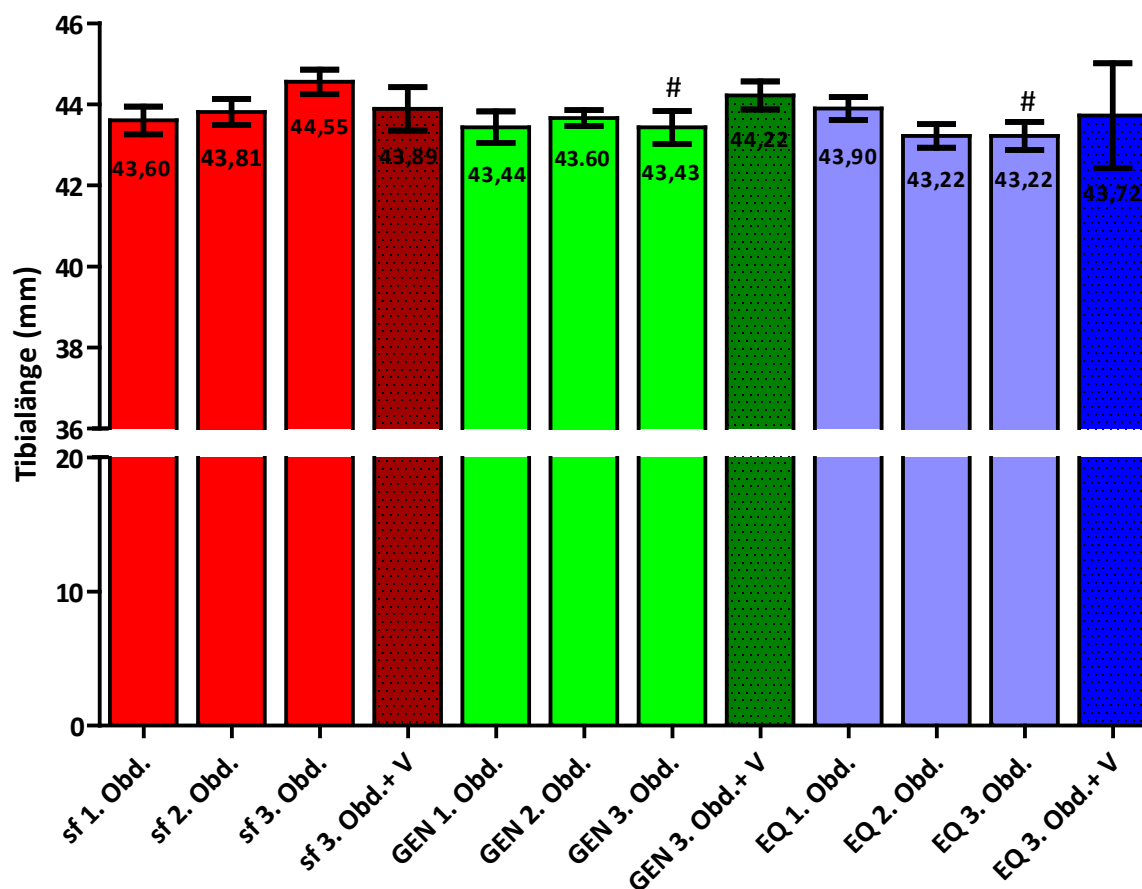
4 Wo n. Orx + V: n = 172 Tiere; in den einzelnen Wirkstoffgruppen: n= 10-12 Tiere;

3. Obd. + V: n = 6 Tiere; \*\*\*p<0,0001 versus 4 Wo n. Orx +V; \*\*p<0,001 versus 4 Wo n. Orx + V;

## p<0,001 versus sf der gleichen Obd.gruppe

Betrachtet man in Tab. 14 und Abb. 24 die Fläche des paratibialen Fettes in Höhe der Metaphyse im Unterschenkelquerschnitt, so kann eine signifikante Zunahme in allen drei Obduktions- und Behandlungsgruppen gegenüber den Tieren 4 Wo n. Orx +V sowohl in absoluten Werten als auch bei den Werten des prozentualen Fettgewebsflächenanteils festgestellt werden. Ausgehend von einem prozentualen Anteil von 13% bei den Tieren vor Trep und Futterumtausch (4 Wo n. Orx +V) steigt der Anteil innerhalb von acht Wochen auf 17-19,6% an. Eine weitere Signifikanz ist in der 1. Obduktionsgruppe die Zunahme der Fettgewebsfläche und des prozentualen Anteils bei den Tieren der GEN- und EQ-Gruppe gegenüber den sf-Tieren. Signifikanzen zwischen den vibrierten und zusätzlich vibrierten Tieren der 3. Obduktionsgruppe gab es keine.

### 3.8 Tibiallänge



**Abb. 25: Tibiallänge nach zwei, drei- und achtwöchiger Phytohormonapplikation**

Tibiallänge in mm der orx und vibrierten Tiere 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch und Trepanation. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM; in den einzelnen Wirkstoffgruppen: n = 10-12 Tiere; 3. Obd. + V: n = 6 Tiere; # p<0,05 versus sf der gleichen Obd.gruppe

Nach Tötung und Präparation wurden die Tibiae in den einzelnen Obduktionsgruppen vermessen, daher besteht nur ein Vergleich zwischen den Obduktions- und Behandlungsgruppen und kein Vergleich mit den Tieren 4 Wo n. Orx +V. In Abb. 25 wird deutlich, dass im Mittel die sf-Tiere der 3. Obd. mit 44,55 mm die längste Tibia aufweisen. Dazu signifikant kürzer sind in der gleichen Obduktionsgruppe die Tibiae der Tiere, die mit GEN und EQ gefüttert wurden. Durchschnittlich die kürzeste Tibia mit 43,22 mm haben die EQ-Tiere der 2. und 3. Obduktion. Zwischen den vibrierten und zusätzlich vibrierten Tieren der 3. Obduktionsgruppe konnte keine Signifikanz festgestellt werden.

### **3.9 Beobachtung der Tiere während des Vibrationstrainings**

Um die Gesundheit der Versuchstiere und die Umsetzung des Experimentes zu gewährleisten, standen die Tiere während der 15-minütigen Vibrationsphase unter ständiger Kontrolle und Beobachtung. Insgesamt haben sich die Tiere schnell an das Vibrationstraining gewöhnt. Zu Beginn des Versuches verweilten die Tiere meist in einer Ecke des Käfigs. Dabei legten sich die Tiere oft an bzw. aufeinander, wurden jedoch durch die Vibration schnell wieder auf die Bodenplatte zurück geschüttelt, so dass ein fast dauerhafter Kontakt der Hinterbeine mit der Vibrationsplatte gewährleistet werden konnte. Schon nach wenigen Tagen zeigten sich die Ratten neugierig und erkundungsfreudig, sie stellten sich auf die Hinterläufe, richteten sich auf, waren aktiv und immer in Bewegung. Die Versuchstiere wurden regelmäßig durch einen Tierarzt kontrolliert, der den Ratten Gesundheit attestierte, ohne Stresssymptome oder eine zu intensive körperliche Anstrengung feststellen zu können.

## 4 Diskussion

Wie einleitend erwähnt, spielen auch beim Mann Östrogene die entscheidende Rolle im Knochenhaushalt. Sie wirken sich günstig auf den Mineralgehalt des Knochens aus, schützen vor Knochenabbau und können so Osteoporose verhindern. Auf Grund ihrer Ähnlichkeit zum  $17\beta$ -Estradiol untersuchten wir Phytoöstrogene an männlichen orchidektomierten Ratten.

Die vorliegende Arbeit erstreckte sich über einen Zeitraum von insgesamt vier Monaten. Es wurden zunächst die Auswirkungen von Vibrationstraining auf die Knochenparameter der orx proximalen Rattentibia als auch die Wirkung auf die Muskel- und Fettgewebsfläche paratibial untersucht. Im Anschluss wurde der Einfluss der Phytohormone GEN und EQ, sowie erneutes Vibrationstraining, auf die Knochendefektheilung des osteoporotischen Knochens beobachtet.

Der Einsatz von Ganzkörpervibration als präventive Maßnahme bei Osteoporose zeigte schon in internationalen Studien knochenstärkende Effekte (Blottner et al. 2006; Rubin et al. 2006; Flieger et al. 1998). Im ersten Teil des Versuchs erhielten die Tiere kurz nach Orx ein vierwöchiges Vibrationstraining. Wir konnten bestätigen, dass diese etablierte Methode eine Möglichkeit darstellt, den eintretenden Verlust der Spongiosadichte nach erfolgter Orx zu verhindern. Im zweiten Teil unseres Versuchs untersuchten wir die Knochendefektheilung bei Osteoporose. Dabei ist es von hohem wissenschaftlichem Interesse, Möglichkeiten zu finden, die Heilung eines osteoporotischen Knochens positiv zu beeinflussen. Dabei gelten Phytoöstrogene als eine Möglichkeit, knochenprotektiv und -stärkend auf den osteoporotischen Knochen zu wirken (Fanti et al. 1998; Mathey et al. 2007; Rachon et al. 2007a; Kolios et al. 2009). Wir verabreichten die Phytohormone Genistein (GEN) und Equol (EQ), sowie sojafreies Kontrollfutter(sf) und untersuchten den Erhalt der Knochendichte und weitere Parameter während des osteoporotischen Knochenheilungsprozesses. Die eingesetzten Testsubstanzen wurden in den jeweiligen Gruppen unterschiedlich lange verabreicht. Dabei wurden die Knochenparameter nach zwei, drei und acht Wochen mittels qCT erfasst. Die Hälfte der Tiere der 3. Obduktionsgruppe erhielt zusätzlich in den letzten beiden Wochen ein weiteres Vibrationstraining.

#### **4.1 Futteraufnahme, Körpergewicht**

Bis zum Zeitpunkt der Trepanation erhielten alle Versuchstiere sf-Pellet-Futter. Anschließend wurden die Tiere in gleich große Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe erhielt weiterhin das sojafreie und somit hormoninaktive Futter, in den anderen Gruppen wurde jeweils genistein- oder equolhaltiges Futter verabreicht. Sowohl der Futtermittelverbrauch als auch die Gewichtsentwicklung der Tiere wurde in regelmäßigen Abständen protokolliert.

Im ersten Teil des Versuchs - nach Orx und während des vierwöchigen Vibrationsstrainings - sinkt die Futteraufnahme der Tiere in der ersten Woche zunächst stark, dann nur noch leicht. Ähnlich dazu nehmen die Tiere auch in der ersten Woche des Trainings stark an Gewicht ab, dann nehmen sie jedoch stetig zu. Die Einbuße beider Parameter in der ersten Woche ist signifikant und kann durch zwei Aspekte erklärt werden. Eine Orchidektomie als solche verursacht sowohl reduzierte Futteraufnahme als auch Gewichtsabnahme (Erben et al. 2000; Borst und Conover 2006). Weiter kann eine gewisse Anpassungsreaktion an das Vibrationsstraining sich in vermindertem Appetit äußern, die auch Katch et al. (1979) bei männlichen Ratten feststellten, welche ein intensives Sportprogramm im Laufrad absolvierten (Katch et al. 1979).

Nach Trepanation und Futterumstellung fällt die durchschnittliche Futteraufnahme in allen drei Futtergruppen leicht ab. Betrachtet man die Körpergewichtsentwicklung, so nehmen die Tiere stetig an Gewicht zu. Die GEN- und EQ-Tiere auf ähnlichem Niveau wie die sf-Kontrollgruppe. Eine appetitmindernde östrogenartige Wirkung seitens der Phytoöstrogene, wie sie bei ovx SD-Ratten zu erkennen war (Rachon et al. 2007b), konnte nicht beobachtet werden. Die Wirkung scheint geschlechtsspezifisch zu sein.

#### **4.2 Betrachtung der Knochenparameter vier Wochen nach Orchidektomie und Vibrationstraining**

Mithilfe des qCT haben wir die Auswirkungen eines vierwöchigen Vibrationsstrainings auf die proximale Metaphyse der Tibia an orx männlichen Ratten untersucht. Dieser Bereich zeigte sich schon in anderen Versuchen sowohl sensibel gegenüber mechanischer Stimulation (Rubin et al. 2002) als auch geeignet für die Darstellung des entwickelten Knochenverlustes nach Orx (Wronski et al. 1985). Wir konnten in unserer Studie die schon in anderen Studien festgestellte knochenerhaltende Wirkung des Ganzkörpervibrationstrainings bestätigen (Slatkovska et al. 2010; Verschueren et al. 2004). Die Orx führte innerhalb von vier Wochen

zu einem signifikanten Knochenverlust der Spongiosadichte um 16,9%. Dieser Knochenverlust konnte signifikant durch das Vibrationstraining verhindert werden, so dass die vibrierten Tiere 99,5% der Spongiosadichte aufwiesen, die sie vor der Orx besaßen. Ähnliche Ergebnisse erzielten Flieger et al. (1998) mit ovx weiblichen Ratten, bei denen sie nach einer fünfwöchigen Vibrationstherapie eine um 14,1% signifikant höhere Knochendichte (BMD) feststellen konnten, verglichen zu den nicht-vibrierten ovx Tieren, gemessen mit DXA. Bei den, verglichen zur Kontrolle, höheren Dichtewerten handelt es sich jedoch nicht um Knochenneusynthese (Modeling), sondern vielmehr um den Erhalt der bestehenden Knochenstruktur, da mechanische Stimulation den durch Östrogenentzug erhöhten Knochenstoffwechsel hemmen kann (Frost 1992). Auch unsere Ergebnisse spiegeln dies wider. Vibration führt annähernd zum kompletten Erhalt der Spongiosadichte (zu 99,5%), verglichen mit den Werten vor Orx. Insgesamt gibt es wenige Studien über die Auswirkung von Vibration bei männlichen orx Tieren. Da unsere Ergebnisse mit denen von Flieger et al. (1998) kongruieren, scheint Vibration auch bei männlichen orx Tieren knochenprotektiv zu sein.

Vier Wochen nach Orx konnten wir sowohl in der Vibrationsgruppe als auch in den nicht-vibrierten Tieren eine signifikante Zunahme der Kortikalisdichte feststellen. Dies kann sicherlich durch das voranschreitende Wachstum der Tiere begründet werden und die Tatsache, dass sich Osteoporose eher im spongiösen Knochen manifestiert (Bartl et al. 2003). Da die vibrierten Tiere zusätzlich einen signifikanteren Vorteil gegenüber den nicht-vibrierten aufwiesen, kann auch hier eine knochenstärkende Wirkung auf die kortikalen Knochenanteile durch das Vibrationstraining beobachtet werden. Zu demselben Schluss kam Rubinacci et al. (2008b), die ovx SD-Ratten über einen Zeitraum von zwei Monaten 20 min/d an 5 days/week bei 30 Hz vibrierten (Rubinacci et al. 2008b).

Ferner gibt es Studienergebnisse, die lediglich die Auswirkungen auf den spongiösen Knochen beobachteten. Rubin untersuchte dazu den proximalen Femur von weiblichen Schafen. Die Tiere erhielten über ein Jahr für 20 min/d eine Vibration mit 30 Hz. Lediglich im spongiösen, jedoch nicht im kortikalen Knochen konnte eine signifikante Verbesserung der Dichte festgestellt werden. Grund für den ausbleibenden Effekt in der Kortikalis könnte die höhere metabolische Aktivität des spongiösen Knochens bei einer größeren Oberfläche sein (Rubin et al. 2006). Abweichend von uns wurden die Tiere zuvor nicht gonadektomiert. Andere Studien konnten bei Vibrationsexperimenten an intakten Tieren oder gesunden

jungen Menschen weder auf spongiösen noch kortikalen Knochen knochenstärkende Auswirkungen ermitteln (Rubinacci et al. 2008b; Torvinen et al. 2003). Dies legt nahe, dass sowohl Knochenalter als auch Hormonstatus die Adaptation auf mechanische Stimuli beeinflussen. Ebenfalls kann die unterschiedliche Körperhaltung der Versuchstiere auf der Vibrationsplatte die Effekte von mechanischen Stimuli manipulieren. Ratten und Mäuse bewegen sich meist frei, im Gegensatz zu Schafen, die mehr still stehen (Rubinacci et al. 2008a). Ferner sind differierende Ergebnisse durch unterschiedlich gewählte Frequenzen denkbar. Die Sensibilität der Knochenzellen für mechanische Stimuli scheint frequenzspezifisch zu sein (Judex et al. 2007), denn diese Studie konnte bei einer Frequenz von 90 Hz, jedoch nicht bei 45 Hz signifikante Knochenbildungsraten in weiblichen ovx Ratten feststellen. Ein weiterer gemessener Parameter (Strain gage Signals = Dehnungsmessung) erreichte bei 45 Hz ausbleibend, bei 90 Hz das Signifikanzniveau.

In der vorliegenden Studie sank der endostale Umfang in beiden Gruppen (Vibration und Nichtvibration) signifikant nach Orx. Nicht zu erwarten war die noch stärkere signifikante Reduktion bei den vibrierten Tieren gegenüber den nicht-vibrierten. Man würde logisch vermuten, dass die Werte des endostalen Umfanges sich analog der Spongiosaquerschnittsfläche verhalten. Unsere Ergebnisse spiegeln dies jedoch nur zum Teil wider. Es kommt die Frage auf, wie der signifikant erniedrigte endostale Umfang der vibrierten Tiere zu der tendenziell höheren Spongiosaquerschnittsfläche passt, verglichen mit den nicht-vibrierten Tieren. Der endostale Umfang wird mittels eines Ringmodells durch die Computersoftware errechnet. Als Grundlage dienen die Daten der Querschnittsflächen für Spongiosa und Kortikalis. Dabei wird ein Kreis konstruiert, dessen Fläche ( $A = r^2 \times \pi$ ) der Spongiosafläche entspricht. Über die mathematische Formel ( $U = 2 \times \pi \times r$ ) wird aus dem konstruierten Kreis der endostale Umfang berechnet. Ursache für die nicht kongruenten Ergebnisse von Spongiosafläche und endostalem Umfang könnte also die Anwendung eines mathematischen Näherungsmodells (Ringmodell) sein und nicht die manuelle Messung des Umfanges. Schlussfolgernd gewinnen die Daten der Querschnittsfläche mehr an Relevanz, als die lediglich aus der Näherung ermittelten Umfangsdaten.

Der periostale Umfang wurde entsprechend dem endostalen Pendant mittels Ringmodell eruiert. Da er die Gesamtquerschnittsfläche der Tibia umfasst, spiegelt er ihre Wachstumsentwicklung wider. Bei einer divergenten Größenentwicklung von Spongiosa- und Kortikalisfläche ist dies für die Interpretation von Bedeutung. Hierbei kann der

periostale Umfang, helfen eine Aussage darüber zu machen, welche Flächenänderung den größeren Einfluss auf den Gesamtquerschnitt hatte. In der Gruppe 4 Wo n. Orx + V wird der periostale Umfang signifikant kleiner gegenüber den praeorx und den Tieren 4 Wo n. Orx non-V. Bei den Tieren ohne Vibrationstraining steigt der periostale Umfang leicht. Die Ergebnisse der Gesamtquerschnittsberechnung spiegeln exakt das Gleiche wider. Bei den vibrierten Tieren wächst die Kortikalisquerschnittsfläche signifikant, bei sinkendem periostalen Umfang und einer annähernd gleich bleibenden Spongiosafläche. Die Kortikalisdichte ist ebenfalls angestiegen. Man kann mutmaßen, dass der kortikale Knochenanteil an Größe zugenommen hat. Er ist kompakter und dichter geworden. Dies könnte als Versuch des Knochens gedeutet werden, den, durch Orx verursachten, spongiösen Knochenverlust auszugleichen (Rubinacci et al. 2008a). Im Unterschied dazu versuchen die Tiere ohne Vibrationstraining ihren Verlust an Knochenfestigkeit durch Zunahme der Gesamtknochenquerschnittsfläche ebenfalls hauptsächlich an der kortikalen Seite auszugleichen, jedoch ohne dabei kompakter zu werden.

### **4.3 Betrachtung der Knochenparameter nach Trepanation und Behandlung mit Genistein und Equol**

Ein weiterer Fokus unserer Arbeit lag auf der computertomografischen Untersuchung der strukturellen Veränderungen der trepanierten und vibrierten Knochen in Abhängigkeit der getesteten Substanzen GEN und EQ im Vergleich zu einer phytohormonfreien Ernährung (sf). Wie einleitend beschrieben (siehe 1.5), erhofft man sich durch den Einsatz von Phytohormonen östrogenähnliche knochenstärkende Wirkungen bei geringem Nebenwirkungsprofil (Picherit et al. 2000; Bitto et al. 2008). Die Untersuchung der Knochenparameter erfolgte nach zwei-, drei- oder achtwöchiger Substanzeinnahme (1.- 3. Obduktionsgruppe). Darüber hinaus ist unsere Studie insofern interessant, da wir das Vibrationstraining prophylaktisch als auch therapeutisch verwendet haben. Im oben beschriebenen ersten Versuchsabschnitt erhielten die Tiere unmittelbar nach Orx, parallel zur entwickelnden Knochenminderung und vor der Gabe der Phytohormone, Vibrationstraining. Im zweiten hier folgenden achtwöchigen Versuchsabschnitt führten wir nach dem gesetzten Knochendefekt in der Kortikalis der Tibia (Trepanation) am Ende der Studie (in Woche 7 und 8 der 3. Obduktionsgruppe), bei der Hälfte der Tiere, das Vibrationstraining therapeutisch durch, bei gleichzeitiger Phytohormontherapie. Unser



Studienmodell ist durch seine Kombination an einflussreichen Faktoren wie der Orx, Vibration, Trepanation und Phytoöstrogene reichlich komplex, so dass der Vergleich mit anderen Studienmodellen nur bedingt möglich ist, da diese oft nur ein oder zwei Parameter miteinander kombinieren. Statt männlicher wurden oft weibliche Versuchstiere gewählt. Eine weitere Schwierigkeit besteht in den unterschiedlich gewählten Knochenanalysemethoden. Andere Arbeitsgruppen verwenden neben histomorphologischen Methoden, Biege-Stress Tests oder messen Knochenparameter mittels DXA, die im Gegensatz zu unseren durchgeführten qCT Analysen nicht zwischen Spongiosa- und Kortikalisdichte differenziert, sondern lediglich die gesamte Knochenmassendichte bestimmt.

#### Auswirkung auf die Spongiosadichte durch Phytohormone

Die Spongiosadichte der Tiere ist, unabhängig von dem eingesetzten Futter, innerhalb von zwei Wochen deutlich abgesunken (um ca. 30 %). Bis zur achten Woche (3. Obd.) ist eine weitere Abnahme zu verzeichnen, jedoch nur um durchschnittlich weitere zehn Prozent. Vergleicht man die Spongiosadichte zwischen den einzelnen Substanzen so ist sie unter EQ und GEN höher als unter sf, wenn auch nur tendenziell. Die sf-Tiere hingegen weisen zu diesem Zeitpunkt einen so starken Dichteverlust auf, welcher Signifikanzniveau gegenüber der kürzeren sf-Ernährung erreicht. Dies kann immerhin als ein positiver Effekt der Phytoöstrogene gewertet werden. Sie verlangsamen das Fortschreiten der Osteoporose. Vielleicht hätte es einer längeren Applikationsdauer oder einer höheren Dosis bedurft, um signifikant gegenüber den sf-Kontrolltieren zu sein. Positive Wirkungen auf die Knochendichte konnten andere Arbeitsgruppen nach einer Langzeitbehandlung über drei Monate beobachten (Picherit et al. 2000; Sehmisch et al. 2008). EQ kann die Spongiosadichte tendenziell besser halten als GEN. Picherit et al. (2000) und die Arbeitsgruppe um Kolios (Kolios et al. 2009) erzielten mit EQ ebenfalls bessere Ergebnisse als mit GEN, jedoch ist der herangezogene Vergleich auf Grund folgender Unterschiede im Studienmodell nur teilweise gerechtfertigt. Picherit et al. (2000) untersuchte die Substanzen an ovx induzierten osteoporotischen weiblichen Ratten, ohne Vibration und Trepanation.

#### Auswirkung der Trepanation und der Phytohormone auf die Kortikalis der Tibia

Im Rahmen der Trepanation wurde die Kortikalis mit einem Bohrer penetriert.

Die als nächstes in der CT2-Messung erhobenen Daten zur Kortikalisdichte zeigen nach zwei, drei und acht Wochen eine kontinuierliche Zunahme der Dichte gegenüber den Werten vor der Trepanation. Diese Zunahme ist nach zwei und drei Wochen unter GEN signifikant höher

gegenüber sf. Nach acht Wochen hat sich die kortikale Dichte in allen Gruppen auf einen Mittelwert um  $1203,5 \text{ mg/cm}^3$  angeglichen. Die insgesamt steigende kortikale Dichte lässt sich am ehesten durch das Wachstum der Ratten erklären. Die Knochendefektheilung betreffend, stellt sich jedoch die Frage, welche Bedeutung die z.T. signifikant höhere Kortikalisdichte unter GEN der ersten beiden Obduktionsgruppen hat, also zwei und drei Wochen nach Setzen des Defekts?

Laut Khussar et al. (2001) findet bei Ratten ab dem 28. posttraumatischen Tag die 4. Phase des Knochenheilungsprozesses, die Remodelingphase des Knochens statt, welche mit der Umwandlung von Geflecht- in Lamellenknochen beginnt (siehe auch 1.1.4). Lamellenknochen ist stärker mineralisiert als Geflechtknochen und weist somit eine höhere Dichte auf, welche im qCT erfasst werden kann. Die höheren Dichtewerte nach bereits zwei- und dreiwöchiger Behandlung gegenüber sf deuten darauf hin, dass GEN in der Lage ist die Mineralisation des Knochens während der Knochendefektheilung schon früher auslösen zu können und den Heilungsprozess beschleunigen. Die histologische Auswertung der vorliegenden Studie unterstützt diese These (Thole 2014), die ebenfalls unter Phytohormongabe eine raschere Umwandlung von Geflecht- in stärker mineralisierten Lamellenknochen feststellte.

Auch die Arbeitsgruppe um Kolios et al. (2009) befasste sich mit der Frakturheilung an ovx osteoporotischen Ratten unter Phytoöstrogengabe. Unter EQ kam es dabei zu einer verbesserten Heilung, sichtbar an der höheren biomechanischen Stabilität sowie der verstärkten periostalen Kallusbildung. In unserer Studie zeigte sich besonders unter GEN die stärkste Zunahme der kortikalen Dichte. Andere Studien hingegen demonstrierten unter GEN bei In-vitro Untersuchungen osteoklasteninhibierende Wirkungen (Yamagishi et al. 2001). Dies könnte den Prozess der Frakturheilung negativ beeinflussen. Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen von Fanti et al. (1998), der unter GEN in ovx Tieren eine verbesserte Knochenbildungsrate bei gesteigerter Osteoblastenzahl messen konnte. Obgleich ohne Trepanation, konnten auch andere Arbeitsgruppen unter Behandlung mit GEN eine Reduzierung des Ovx induzierten Knochenverlustes beobachten (Fanti et al. 1998; Mathey et al. 2007), wenn auch in diesen Studien GEN z.T. s.c. appliziert wurde, als auch die Behandlung unmittelbar nach Ovx begonnen wurde. Die Arbeitsgruppen von Ishimi et al. (2002) und Sehmisch et al. (2008) begannen ebenfalls umgehend nach Ovx bzw. der Orx männlicher Mäuse. GEN konnte hier vor allem spongiösen Knochendichteverlust aufhalten,

weniger auf die Kortikalis wirken (Ishimi et al. 2002; Sehmisch et al. 2008). Zwar erfolgte der Beginn unserer Phytoöstrogengabe nicht unmittelbar nach Orx, sondern vier Wochen später. Man könnte einen schon einsetzten Knochendichteverlust vermuten. Doch die zu 99,6% erhaltene Spongiosadichte der orx und vibrierten Tiere (siehe Abb. 15) spricht für einen nicht osteoporotischen Knochen, so dass analog zu vielen anderen Studien die Phytohormongabe auch bei uns als präventive Maßnahme betrachtet werden kann.

Anhand unserer Ergebnisse und verdeutlicht durch die angeführten Studien, kann bezüglich des Osteoporoseschutzes des kortikalen Knochens GEN insbesondere in der frühen Phase nach Ovx/Orx bessere Ergebnisse erzielen als zu einem späteren Zeitpunkt. GEN eignet sich daher am ehesten als Osteoporoseprophylaxe, bevor bereits massiver Knochendichteverlust eingetreten ist. Vielleicht könnte auch eine höhere GEN-Dosis dazu beigetragen dauerhaft und nicht nur kurzfristig zu wirken.

#### Auswirkung der Kombination aus Phytoöstrogenen und Vibration

Im letzten Teil des Versuches untersuchten wir die Kombination aus Phytohormonen und therapeutischem Vibrationstraining während des Heilungsprozesses. Das zusätzliche Vibrationstraining zeigte den Trend, relativ unabhängig von der gewählten Art des Futters, sich tendenziell auf die Querschnittsflächen und Knochenumfänge auszuwirken; bei recht ähnlichen Dichtewerten. Es liegen Studien vor, wie sich reines Vibrationstraining auf die Knochenheilung bei osteoporotischen Ratten auswirkt. Ein Vibrationstraining mit 30-50 Hz, beginnend fünf Tage nach Fraktur, kann die endostale Kallusdichte und -mineralisation verbessern und den Verschluss des Bruchspaltes fördern (Komrakova et al. 2013; Shi et al. 2010). Unsere parallel mit Phytohormonen behandelten Versuchstiere erhielten in Woche 7 und 8 der Knochendefektheilung Vibrationstraining. Zu diesem Zeitpunkt befand sich der Knochen, anders als bei den obig genannten Studien, bereits in der Remodelingphase (Khussar et al. 2001; Komrakova et al. 2009), bei der Osteoklasten ursprüngliche Knochenreste resorbieren und Osteoblasten Knochen neu bilden. In vitro konnte gezeigt werden, dass Vibration Osteoblastenkulturen zu stimulieren vermag (Tanaka et al. 2003), so kann auch in dieser Phase der Knochenheilung ein positiver Effekt durch Vibration vermutet werden. Chow et al. (2011) konnten in ihren Studien durch achtwöchiges Vibrationstraining, eingesetzt fünf Tage nach Fraktur, verbessertes Remodeling in der Knochenheilung osteoporotischer weiblicher Ratten ermitteln. Sie zogen diesen Schluss aus der schnelleren Reduktion der Kallusfläche und -weite. Die Analyse des Kallus war nicht Gegenstand unserer

Arbeit, obgleich man evtl. vermuten kann, dass er in den Querschnittsflächen und Umfangsmessungen enthalten ist. Diese waren in unserer Studie nicht signifikant kleiner, eher größer in den zusätzlich vibrierten Tieren. Usui et al. (1989) konnten ebenfalls den Nachweis eines größeren Kallus durch Vibration in einem Kaninchen Osteotomiemodel erbringen. Nimmt man nun an, dass der Kallus in den Querschnittsflächen enthalten ist, so kann in unserem Ergebnis des größeren Knochens ebenfalls eine Verbesserung der Knochenstärke durch Umfangzunahme gesehen werden. In weiterführenden Studien sollte, sowohl der gewählte Zeitpunkt der Vibration variiert, als auch die Messung von Kallusparametern erwogen werden. Wie schon erwähnt, führt in unserer Studie die erneute Vibration zu einem verstärkten Größenwachstum des osteoporotischen Knochens. Dies können wir, gemessen an der Zunahme des Gesamtquerschnitts, feststellen. Dabei beträgt die Flächenzunahme unter sf ca. 3%, 6% unter GEN und 4% unter EQ. Während dies unter sojafreier Ernährung mit einer Abnahme der Spongiosadichte einhergeht, bewirken GEN und EQ eine Zunahme der Spongiosadichte. Grund hierfür könnte die Kombination aus mechanischer Stimulation und Phytoöstrogeneinnahme sein. GEN und EQ können mit dem ER $\alpha$  interagieren, der auf Osteoblasten, -klasten und -cyten exprimiert wird. Mechanische Stimulation fördert die Expression von ER $\alpha$ , es resultiert eine verstärkte Zellantwort (Lee, Karla C L und Lanyon 2004). In der sf-Kontrollgruppe konnte kein Effekt durch die Vibration beobachtet werden. Eine reduzierte Antwort der älteren Osteoblasten auf mechanische Stimulation auf Grund von Hormonmangel kann diskutiert werden (Turner et al. 1995). Der in unserer Arbeit ermittelte Anstieg in der Fläche, als auch in der Dichte unter Substitution von GEN und EQ lässt vermuten, dass der Knochen stabiler ist, als bei reiner Größenzunahme mit Dichteverlust (sf-Gruppe). Bezüglich der Kortikalis zeigten sich unter sf Kost und EQ keine wesentlichen Veränderungen der Dichte und Fläche. Vergleicht man schließlich GEN-Tiere mit und ohne zusätzliche Vibration, so trat bei den vibrierten Tieren eine signifikante Flächenzunahme von 8% bei gleichbleibender Dichte auf. Wu et al. (2006) konnten ebenfalls in Ihren Studien feststellen, dass die Kombination aus GEN und Sport - im Sinne eines Laufradtrainings - den Knochendichte- und Flächenverlust bei orx männlichen Mäusen besser verhindern kann als jeder Faktor für sich allein. Gerade die Kombination aus GEN und Vibration scheint dem älteren Knochen zu helfen, sensibel für mechanische Stimuli zu bleiben. Fasst man zusammen, so wird durch die im qCT ermittelten Parameter des durch Trepanation irritierten osteoporotischen Knochens sichtbar, dass die kombinierte Therapie

aus GEN und Vibration dem Knochen die größte Stabilität verleiht. In nachfolgenden Untersuchungen sollten zur Verifizierung die biomechanische Qualität des Knochens mit Hilfe von Biege-Stress-Tests durchgeführt werden.

#### **4.4 Veränderungen der Muskel- und Fettgewebsfläche sowie der prozentualen Flächenanteile vier Wochen nach Orchidektomie und Vibrationstraining**

Neben den Veränderungen im Knochen haben wir die Auswirkungen von Orx und Vibrationstraining auf die Muskelfläche und ein paratibiales Fettdepot mittels pQCT beobachtet. In unserem Versuch hat sich die absolute Muskelfläche, gemessen im Unterschenkelquerschnitt, innerhalb von vier Wochen zwar signifikant vergrößert, jedoch sinkt der relative muskuläre Anteil gemessen am Gesamtquerschnitt. Der prozentuale Fettgewebsflächenanteil hingegen steigt, besonders in Höhe der Metaphyse, die Fläche des paratibialen Fettes vergrößert sich ebenfalls. Die Zunahme beider Flächen (Muskel und Fett) ist sicherlich dem Wachstum zuzuschreiben. Interessant hingegen ist die Abnahme von relativen Muskelflächenanteilen bei gleichzeitiger Zunahme des Fettgewebsanteils nach vierwöchigem Vibrationstraining. In einer Querschnittsstudie konnte ebenfalls bei Männern zwischen Muskelmasse (gemessen in kg) und dem Testosteronspiegel eine signifikante Korrelation festgestellt werden (Baumgartner et al. 1999). Zusätzlich führt Androgenverlust zu einer verstärkten Fettansammlung, die sich auf Grund der hohen Hormonsensibilität gut paratibial in männlichen und weiblichen Ratten beobachten lässt (Seidlová-Wuttke et al. 2003; Seidlová-Wuttke et al. 2006). Das von uns gemessene höhere Fettdepot in Höhe der Metaphyse kann auch von Vorteil sein, da es als Schutzpolster fungiert bei Stürzen des osteoporotischen Knochens. Ebenso weiß man, dass adipöse Menschen eine niedrigere Inzidenz für Hüftfrakturen unter Osteoporose haben. Dabei scheinen einerseits durch das erhöhte Körpergewicht der verstärkte Druck auf den Knochen von Vorteil zu sein, andererseits die im Fettgewebe produzierten Östrogene (Zarrabeitia et al. 2007).

In unserer Arbeit konnten wir keine Auswirkung durch das Vibrationstraining auf die absolute Querschnittsflächen oder den prozentualen Flächenanteil von Muskel und Fett erkennen. In der internationalen Literatur finden sich dazu unterschiedliche Ergebnisse. In einer Studie mit älteren Frauen erzielte zehn-wöchiges Vibrationstraining eine Hypertrophie der Oberschenkelmuskulatur mit Vergrößerung der Querschnittsfläche (Machado et al.

2010). Weiter konnte Bogaerts et al. (2007) bei älteren Männern nach einjährigem Vibrationstraining einen Anstieg der Muskelmasse messen, sowie eine verbesserte Muskelstärke. Im Gegensatz dazu mangelte es bei Verschueren an signifikanten Ergebnissen in Bezug auf den Muskel, gemessen an den Extensoren des Kniegelenkes postmenopausaler Frauen, die über ein Zeitraum von sechs Monaten dreimal wöchentlich mit einer Frequenz von 35-40 Hz vibriert worden waren. Wobei jedoch zu bemerken ist, dass es sich um Muskelstärkemessung mittels eines Dynamometers handelt. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich in der Messung der Fettmasse durch DXA (Verschueren et al. 2004). In einem weiteren Versuch den Maddalozzo et al. (2008) an intakten sieben Monate alten weiblichen Fischer-Ratten durchführte, erzielte Vibrationstraining, über 12 Wochen an fünf Tagen die Woche für 30 min mit einer Stärke von 30-50 Hz eine signifikante Reduktion der Fettmasse. Jedoch wurde bei dieser Studie das gesamte Körperfett gemessen, wohin gegen bei uns das paratibiale Fettdepot Gegenstand der Untersuchung war. Analog zu uns, konnte auch diese Arbeitsgruppe keine eindeutigen Auswirkungen auf die Muskulatur durch Vibration erkennen.

Abschließend ist zu bemerken, dass Vibrationstraining keine einheitlichen Wirkungen auf das Fettdepot oder die Muskulatur ausübt. Da in den bisherigen Versuchen, oft an intakten weiblichen Tieren, sehr verschiedene Muskel und Fettparameter mit unterschiedlichen Verfahren analysiert worden sind, scheinen noch einige Folgestudien unter standardisierten Bedingungen nötig zu sein, um dieses Themengebiet transparent zu machen.

#### **4.5 Veränderungen der Muskelfläche und des Fettanteils nach Trepanation und Behandlung mit Genistein und Equol**

Nach Abschluss des vierwöchigen Vibrationstrainings wurden die Muskelfläche und Fettparameter der orx und dann trepanierten Tiere unter Behandlung mit GEN und EQ ebenfalls nach zwei, drei und acht Wochen mittels qCT untersucht. Im ersten Abschnitt hatten die Tiere nach Orx durch den Wegfall der Geschlechtshormone signifikant an paratibialem Fett zugenommen. Der Gewinn an Fettgewebe war progredient und setzte sich auch unter GEN und EQ signifikant fort, sowohl in absoluter, als auch in prozentualer Fläche. Dieses Ergebnis bleibt jedoch hinter unseren Erwartungen zurück, da wir von GEN und EQ mit ihren östrogenähnlichen Eigenschaften ebenfalls die für Östrogen typische antiadipöse Wirkung vermutet haben. In unserer Arbeitsgruppe konnte Sebastian Papenberg bei

gleichem Versuchsaufbau unter Behandlung mit E2 die weitere Zunahme des Fettes verhindern (Dissertation S. Papenberg 2011). Daraus kann man schlussfolgern, dass auch in männlichen orx Tieren die Regulierung des Fettgewebes über Östrogenrezeptoren abläuft. Auch eine weitere Studie konnte an männlichen orx Tieren antiadipöse Eigenschaften beobachten (Vandenput et al. 2002). In der Arbeitsgruppe von Rachon et al. (2007b) und Uesugi et al. (2001) konnten EQ als auch GEN zeigen, dass sie in gonadektomierten Tieren in ähnlichem Maße wie E2 die Fettzunahme unterbinden können. Phytoöstrogene scheinen also doch ihrem Ruf östrogenähnlich zu wirken gerecht zu werden, allerdings ist nicht zu vernachlässigen, dass in diesen Studien das intraabdominale Fettdepot analysiert wurde und nicht das paratibiale (Rachon et al. 2007b; Uesugi et al. 2001).

## 5 Zusammenfassung

Osteoporose ist eine Erkrankung, die pathophysiologisch gekennzeichnet ist durch eine abnehmende Knochendichte, welche zunächst den spongiösen Knochen, im Verlauf dann auch die kortikalen Anteile betrifft.

Bekannt ist, dass Ganzkörpervibrationstraining sowohl in Tiermodellen als auch beim Menschen positiv auf den Erhalt der Knochendichte wirkt. In unserem ersten Teil der Studie wurden 172 männliche Sprague-Dawley-Ratten unmittelbar nach Orx über vier Wochen je fünf Tage/Woche für 15 min bei 25-30 Hz vibriert. Dabei konnten wir, gemessen durch periphere quantitative Computertomographie, den Erhalt der Spongiosadichte durch präventives Vibrationstraining bestätigen.

Nicht bekannt war bisher der Nutzen einer supportiven Phytohormontherapie im Anschluss an ein Vibrationstraining. Daher applizierten wir im zweiten Versuchsabschnitt Genistein und Equol für zwei, drei oder acht Wochen und analysierten mittels quantitativer Computertomographie relevante Knochenparameter. Sojafrei ernährte Tiere stellten die Kontrollgruppe dar. Nach Beendigung des Vibrationstrainings entwickelten alle Tiergruppen Osteoporose. Die Substitution von Genistein und Equol konnte die kontinuierliche Abnahme der Spongiosadichte tendenziell verlangsamen.

Da der osteoporotische Knochen häufig eine Fraktur erleidet, war es für uns interessant, die Auswirkung der Phytohormongabe während einer Knochendefektheilung zu untersuchen. Wir lösten daher einen experimentellen Knochendefekt durch Trepanation der kortikalen Tibia aus und applizierten Genistein und Equol für zwei, drei oder acht Wochen. Nach zwei- und dreiwöchiger Applikation stieg die kortikale Dichte, verglichen zur sojafreien Gruppe unter Genistein, signifikant an. Nach acht Wochen hatte sich die kortikale Dichte in der sojafreier-nährten Kontrollgruppe auf das Niveau der mit Phytohormonen substituierten Tiere angeglichen. Dies deutet darauf hin, dass Genistein die Mineralisation des Knochens nach Setzen des Knochendefekts in der Kortikalis beschleunigt. Gestützt wird die Aussage durch die histologische Auswertung der Studie, welche unter Genistein und Equol eine beschleunigte Knochenheilung im Sinne einer rascheren Umwandlung von Geflecht- in stärker mineralisierten Lamellenknochen feststellte.

Weiteres Ziel war, die Kombination aus Phytohormonen und therapeutischem Vibrationstraining während des Heilungsprozesses zu untersuchen. Dazu wurden die Tiere



sechs Wochen nach Setzen des Knochendefekts für zwei Wochen nach dem obigen Schema erneut vibriert. Das zusätzliche Vibrationstraining führte zu einem verstärkten Größenwachstum des osteoporotischen Knochens, gemessen an der Zunahme des Gesamtquerschnitts. Während dies unter sojafreier Ernährung mit einer Abnahme der Spongiosadichte einhergeht, ließ sich unter Substitution mit Genistein und Equol eine Zunahme der Spongiosadichte beobachten, so dass von einer erhöhten Stabilität des Knochens auszugehen ist. Bezüglich der Kortikalis zeigten sich unter sojafreier Kost und unter Equolsubstitution keine wesentlichen Veränderungen der Dichte und Fläche. Unter Genistein hingegen trat eine signifikante Flächenzunahme von 8% bei gleichbleibender Dichte gegenüber den Genistein-substituierten, nicht zusätzlich vibrierten Tieren auf.

Damit erscheint anhand der mittels qCT gewonnenen Daten bei einem durch Trepanation irritierten osteoporotischen Knochen eine supportive Therapie mit Genistein und zusätzliche Vibrationstherapie den Knochen am besten zu stabilisieren. In weiteren Studien wäre es sinnvoll, dies mit Hilfe physikalischer Biege-Stress-Tests zu bestätigen.

In der internationalen Literatur herrscht keine Einigkeit über die Auswirkung von Vibration und Phytohormonen auf das Muskel- und Fettgewebe. Wir erhofften uns durch die Anwendung muskelstärkende sowie durch die Phytohormone östrogenähnliche, antiadipöse Effekte festzustellen. Die Erwartungen wurden jedoch in unseren Messungen der Muskelflächen und des paratibialen Fettes nicht erfüllt. In Folgestudien sollte die in vielen anderen Studien verwendete Analyse der Muskelmasse und -stärke sowie des Gesamtkörperfettes in Erwägung gezogen werden.

## 6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Röhrenknochen.....	8
Abb. 2: Räumliche Darstellung der Spongiosa eines Lamellenknochens .....	9
Abb. 3: Substantia compacta mit Darstellung eines Osteon.....	10
Abb. 4: Schematische Darstellung von Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten .....	11
Abb. 5: Strukturformel Genistein .....	20
Abb. 6: Strukturformel Equol .....	21
Abb. 7: Tierhaltungsraum.....	24
Abb. 8: zeitlicher Versuchsablauf .....	26
Abb. 9: SwingVibe Ganzkörper-Vibrationsgerät.....	29
Abb. 10: Das qCT-Gerät .....	30
Abb. 11: Trepanation der Metaphyse .....	32
Abb. 12: Futteraufnahme der Tiere in den Versuchswochen 1-4 unter Vibrationstraining und den Wochen 4-12 während der Phytohormonapplikation.....	34
Abb. 13: Entwicklung des Körpergewichts nach zwei- drei- und achtwöchiger Phytohormonapplikation .....	36
Abb. 14: Delta Körpergewicht der 3. Obduktionsgruppe zwischen Trepanation/Futtertausch und Obduktion .....	37
Abb. 15: Spongiosadichte vor Orchidektomie und nach Orchidektomie mit/ohne Vibration.....	39
Abb. 16: Spongiosadichte nach achtwöchiger Phytohormonapplikation .....	43
Abb. 17: Kortikalisdichte nach achtwöchiger Phytohormonapplikation.....	45
Abb. 18: Gesamtquerschnittsfläche nach achtwöchiger Phytohormonapplikation .....	46
Abb. 19: Spongiosaquerschnittsfläche nach achtwöchiger Phytohormonapplikation .....	48
Abb. 20: Kortikalisquerschnittsfläche nach achtwöchiger Phytohormonapplikation.....	49
Abb. 21: Periostaler Umfang nach achtwöchiger Phytohormonapplikation .....	51
Abb. 22: Endostaler Umfang nach achtwöchiger Phytohormonapplikation.....	52
Abb. 23: Absolute Muskelfläche und Muskelflächenanteil nach achtwöchiger Phytohormonapplikation .....	54
Abb. 24: Absolute Fläche des paratibialen Fettes nach achtwöchiger Phytohormonapplikation .....	57
Abb. 25: Tibiallänge nach zwei-, drei- und achtwöchiger Phytohormonapplikation .....	58

---

Tab. 1: Gruppeneinteilung und Behandlung vor Trepanation (1.Versuchsabschnitt).....	27
Tab. 2: Gruppeneinteilung und Behandlung der 104 vibrierten Tiere nach Trepanation (2.Versuchsabschnitt) .....	28
Tab. 3: Durchschnittliche Futterraufnahme und aufgenommene Substanzmenge vor und nach Trepanation und Futtertausch .....	34
Tab. 4: Knochenparameter vor Orchidektomie und nach Orchidektomie mit/ohne Vibration .....	40
Tab. 5: Absolute Muskelfläche und Fettgewebsfläche mit prozentualem Muskelflächen- und Fettgewebsflächenanteil in Höhe der Metaphyse vor Orchidektomie und nach Orchidektomie mit/ohne Vibration .....	41
Tab. 6: Spongiosadichte der 1. und 2. Obduktionsgruppe bzw. nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation .....	43
Tab. 7: Kortikalisdichte der 1. und 2. Obduktionsgruppe bzw. nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation .....	h44
Tab. 8: Gesamtquerschnittsfläche der 1. und 2. Obduktionsgruppe bzw. nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation.....	46
Tab. 9: Spongiosaquerschnittsfläche der 1. und 2. Obduktionsgruppe bzw. nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation.....	47
Tab. 10: Kortikalisquerschnittsfläche der 1. und 2. Obduktionsgruppe bzw. nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation.....	49
Tab. 11: Periostaler Umfang der 1. und 2. Obduktionsgruppe bzw. nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation .....	50
Tab. 12: Endostaler Umfang der 1. und 2. Obduktionsgruppe bzw. nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation .....	52
Tab. 13: Muskelfläche und Muskelflächenanteil der 1. und 2. Obduktionsgruppe bzw. nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation.....	54
Tab. 14: Fläche des paratibialen Fettes und Fettgewebsflächenanteil der 1. und 2. Obduktionsgruppe bzw. nach zwei- und dreiwöchiger Substanzapplikation .....	56

## 7 Literaturverzeichnis

Abd Jalil MA, Shuid AN, Muhammed N (2012): Role of Medicinal Plants and Natural Products on Osteoporotic Fracture Healing. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM) 2012, Article ID, 7 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/714512> (aufgerufen am 10. Januar 2015)

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

Andlauer W, Kolb J, Furst P (2000): Isoflavones from tofu are absorbed and metabolized in the isolated rat small intestine. *J Nutr* 130, 3021–3027

Augat P, Simon U, Liedert A, Claes L (2005): Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporos Int* 16 Suppl 2, S36-43

Baron R, Kneissel M (2013): WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 19, 179–192

Bartl R, Bartl C, Mutschler W (2003): Diagnostik und Therapie der Osteoporose. *Der Unfallchirurg* 106, 526–541

Baumgartner RN, Waters DL, Gallagher D, Morley JE, Garry PJ (1999): Predictors of skeletal muscle mass in elderly men and women. *Mechanisms of Ageing and Development* 107, 123–136

Bennetts HW, Underwood EJ (1951): The oestrogenic effects of subterranean clover (*trifolium subterraneum*); uterine maintenance in the ovariectomised ewe on clover grazing. *Aust J Exp Biol Med Sci* 29, 249–253

Benninghoff A, Drenckhahn D: Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1: Zelle, Gewebe, Entwicklung, Skelett- und Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. 16., völlig neu bearb. Auflage; Urban & Fischer, München 2002

Berchtold R (Begründer): Berchtold Chirurgie. Hrsg. V. Bruch H-P, Trentz O; 5., vollst. aktualisierte und überarb. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer, München u.a. 2006

Binkley N (2006): Osteoporosis in men. *Arq Bras Endocrinol Metab* 50, 764–774

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

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, 261–271

Bogaerts A, Delecluse C, Claessens AL, Coudyzer W, Boonen S, Verschueren, Sabine M P (2007): Impact of whole-body vibration training versus fitness training on muscle strength and muscle mass in older men: a 1-year randomized controlled trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62, 630–635

Borst SE, Conover CF (2006): Orchiectomized Fischer 344 male rat models body composition in hypogonadal state. *Life Sci* 79, 411–415

- Bosco C, Iacovelli M, Tsarpela O, Cardinale M, Bonifazi M, Tihanyi J, Viru M, Lorenzo A de, Viru A (2000): Hormonal responses to whole-body vibration in men. *Eur J Appl Physiol* 81, 449–454
- Cave NJ, Backus RC, Marks SL, Klasing KC (2007): Oestradiol and genistein reduce food intake in male and female overweight cats after gonadectomy. *N Z Vet J* 55, 113–119
- Chao, Edmund Y S, Inoue N, Koo, Terry K K, Kim YH (2004): Biomechanical considerations of fracture treatment and bone quality maintenance in elderly patients and patients with osteoporosis. *Clin Orthop Relat Res*, 12–25
- Chin K, Ima-Nirwana S (2012): Sex Steroids and Bone Health Status in Men. *Int J Endocrinol* 2012, 1–7
- Chow DH, Leung K, Qin L, Leung AH, Cheung W (2011): Low-magnitude high-frequency vibration (LMHFV) enhances bone remodeling in osteoporotic rat femoral fracture healing. *J. Orthop. Res.* 29, 746–752
- Compston JE (2001): Sex steroids and bone. *Physiol Rev* 81, 419–447
- Di Leo C, Tarolo GL, Bestetti A, Tagliabue L, Del Sole A, Aliberti G, Cestaro B, Pepe L (2000): Osteoporosis and phytoestrogens: an assessment of bone mineral density via quantitative peripheral computed tomography in milk-egg-vegetarian women in the premenopause. *Radiol Med* 99, 250–257
- Dixon R (2002): Genistein. *Phytochemistry* 60, 205–211
- Drake MT, Khosla S (2012): Male Osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 41, 629–641
- DVO Leitlinie Osteoporose 2009 Langfassung URL: [http://www.osteoporose-portal.de/uploads/PDF's Arzt/DVO-Leitlinie Langfassung 15.10.2009.pdf](http://www.osteoporose-portal.de/uploads/PDF's%20Arzt/DVO-Leitlinie%20Langfassung%2015.10.2009.pdf). Aufgerufen am 10.07.15
- DVO Leitlinie Osteoporose 2014 Kurzfassung und Langfassung. URL: [http://www.dv-osteologie.org/uploads/Leitlinie2014/DVO-Leitlinie Osteoporose2014 Kurzfassung und Langfassung18.09.2014.pdf](http://www.dv-osteologie.org/uploads/Leitlinie2014/DVO-Leitlinie%20Osteoporose2014%20Kurzfassung%20und%20Langfassung18.09.2014.pdf) Aufgerufen am 11.01.15
- Erben RG (2001): Skeletal effects of androgen withdrawal. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1, 225–233
- 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
- Estai MA, Suhaimi FH, Das S, Fadzilah FM, Alhabshi, Sharifah Majedah Idrus, Shuid AN, Soelaiman I (2011): Piper sarmentosum enhances fracture healing in ovariectomized osteoporotic rats: a radiological study. *Clinics* 66, 865–872
- Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, Malluche HH (1998): The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos Int* 8, 274–281
- Ferretti JL, Cointy GR, Capozza RF, Capiglioni R, Chiappe MA (2001): Analysis of biomechanical effects on bone and on the muscle-bone interactions in small animal models. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1, 263–274
- Fitzpatrick LA (2002): Secondary Causes of Osteoporosis. *Mayo Clin Proc* 77, 453–468

- Flieger J, Karachalios T, Khaldi L, Raptou P, Lyritis G (1998): Mechanical stimulation in the form of vibration prevents postmenopausal bone loss in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 63, 510–514
- Fonseca D, Ward WE (2004): Daidzein together with high calcium preserve bone mass and biomechanical strength at multiple sites in ovariectomized mice. *Bone* 35, 489–497
- Frost HM (1992): The role of changes in mechanical usage set points in the pathogenesis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 7, 253–261
- Frost HM, Jee WS (1992): On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner* 18, 227–236
- Gasser JA (1995): Assessing bone quantity by pQCT. *Bone* 17, 145S-154S
- Gennari L, Bilezikian JP (2007): Osteoporosis in men: Pathophysiology and treatment. *Curr Rheumatol Rep* 9, 71–77
- Grifka J, Kuster M: *Orthopädie und Unfallchirurgie: Für Praxis, Klinik und Facharztprüfung* (SpringerLink Bücher); Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg 2011
- Hadji P, Klein S, Goethe H (2013): Epidemiologie der Osteoporose: Bone Evaluation Study. *Deutsches Ärzteblatt* 110, 52–57
- Hausler B, Gothe H, Gol D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D (2007): Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. *Osteoporos Int* 18, 77–84
- Helterbrand JD, Higgs, R E Jr, Iversen PW, Tysarczyk-Niemeyer G, Sato M (1997): Application of automatic image segmentation to tibiae and vertebrae from ovariectomized rats. *Bone* 21, 401–409
- Hertrampf T, Degen GH, Kaid AA, Laudenschow U, Seibel J, Di Virgilio, Ana Laura, Diel P (2006): Combined effects of physical activity, dietary isoflavones and 17beta-estradiol on movement drive, body weight and bone mineral density in ovariectomized female rats. *Planta Med* 72, 484–487
- Hou NN, Zhu YM, Huang HF (2006): The expression of estrogen receptor alpha and beta in the intervention of different estrogens in rat bone metabolism. *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao* 39, 289–296
- Internetquelle: URL: <http://www.phytochemicals.info/pictures/phytochemicals/genistein.gif> (aufgerufen am 12.01.2015)
- Ishimi Y: Soybean Isoflavones in Bone Health; In: *Food Factors for Health Promotion*; hrsg. v. Yoshikawa T. (Forum of Nutrition); Karger. Basel 2009, 104–116
- Ishimi Y, Yoshida M, Wakimoto S, Wu J, Chiba H, Wang X, Takeda K, Miyaura C (2002): Genistein, a soybean isoflavone, affects bone marrow lymphopoiesis and prevents bone loss in castrated male mice. *Bone* 31, 180–185
- Jankovich JP (1972): The effects of mechanical vibration on bone development in the rat. *J Biomech* 5, 241–250
- Judex S, Lei X, Han D, Rubin C (2007): Low-magnitude mechanical signals that stimulate bone formation in the ovariectomized rat are dependent on the applied frequency but not on the strain magnitude. *J Biomech* 40, 1333–1339

- Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15, 175–191
- Katch VL, Martin R, Martin J (1979): Effects of exercise intensity on food consumption in the male rat. *Am J Clin Nutr* 32, 1401–1407
- Khosla S, Melton, L Joseph 3rd, Riggs BL (2002): Clinical review 144: Estrogen and the male skeleton. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1443–1450
- Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG (2012): Estrogen and the skeleton. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 23, 576–581
- Khussar PI, Piirsoo AO, Miartson AA, Toom AA, Khaviko TI, Khussar IP (2001): Post-traumatic repair of the tibia in rats. *Morfologija* 120, 84–91
- Kolios L, Sehmisch S, Daub F, Rack T, Tezval M, Stuermer K, Stuermer E (2009): Equol but not Genistein Improves Early Metaphyseal Fracture Healing in Osteoporotic Rats. *Planta Med* 75, 459–465
- Komrakova M, Werner C, Wicke M, Nguyen BT, Sehmisch S, Tezval M, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Effect of daidzein, 4-methylbenzylidene camphor or estrogen on gastrocnemius muscle of osteoporotic rats undergoing tibia healing period. *J Endocrinol* 201, 253–262
- Komrakova M, Sehmisch S, Tezval M, Ammon J, Lieberwirth P, Sauerhoff C, Trautmann L, Wicke M, Dullin C, Stuermer KM et al. (2013): Identification of a Vibration Regime Favorable for Bone Healing and Muscle in Estrogen-Deficient Rats. *Calcif Tissue Int* 92, 509–520
- Kostelac D, Rechkemmer G, Briviba K (2003): Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. *J Agric Food Chem* 51, 7632–7635
- Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshioka M, Honjo H, Urabe M, Kitajima I, Semba I, Hirasawa Y (1999): Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *J Steroid Biochem Mol Biol* 68, 197–202
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997): Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863–870
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag, P T, van der Burg, B, Gustafsson JA (1998): Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252–4263
- Kunzmann T (2010): Der Effekt von Dihydrotestosteron, 17 $\beta$ -Estradiol, Genistein und Equol auf den osteoporotischen Knochen der männlichen Ratte nach Trepanation dargestellt durch das pQCT, Med. Diss. Göttingen
- Lagari VS, Levis S (2010): Phytoestrogens and bone health. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 17, 546–553
- Lang-Roth R, Karow T: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis 2012. 20. Auflage; Karow, Pulheim 2012

- Lee, KC, Lanyon LE (2004): Mechanical loading influences bone mass through estrogen receptor alpha. *Exerc Sport Sci Rev* 32, 64–68
- Leitlinie Osteoporose: siehe DVO-Leitlinie
- Löffler G: Biochemie und Pathobiochemie (Springer-Lehrbuch), 8. Auflage; Springer Medizin Verlag, Berlin 2006
- Lüllmann-Rauch R: Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen, 2., komplett überarb. Auflage; Thieme, Stuttgart [u.a.] 2006
- Machado A, García-López D, González-Gallego J, Garatachea N (2010): Whole-body vibration training increases muscle strength and mass in older women: a randomized-controlled trial. *Scand J Med Sci Sports* 20, 200–207
- Malizos KN, Papatheodorou LK (2005): The healing potential of the periosteum molecular aspects. *Injury* 36 Suppl 3, S13-9
- Manolagas SC (2000): Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21, 115–137
- Mathey J, Mardon J, Fokialakis N, Puel C, Kati-Coulibaly S, Mitakou S, Bennetau-Pelissero C, Lamothe V, Davicco MJ, Lebecque P et al. (2007): Modulation of soy isoflavones bioavailability and subsequent effects on bone health in ovariectomized rats: the case for equol. *Osteoporos Int* 18, 671–679
- Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y (2001): Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol Pharm Bull* 24, 351–356
- Mosekilde L, Vestergaard P, Rejnmark L (2013): The pathogenesis, treatment and prevention of osteoporosis in men. *Drugs* 73, 15–29
- Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, Swain M, Mason RS, Murrell GA, Diwan AD, Diamond T (2001): Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone* 28, 80–86
- Neidlinger-Wilke C, Stalla I, Claes L, Brand R, Hoellen I, Rübenacker S, Arand M, Kinzl L (1995): Human osteoblasts from younger normal and osteoporotic donors show differences in proliferation and TGFβ-release in response to cyclic strain *J Biomech* 28, 1411–1418
- Oseni T, Patel R, Pyle J, Jordan V (2008): Selective Estrogen Receptor Modulators and Phytoestrogens. *Planta Med* 74, 1656–1665
- Oxlund BS, Ortoft G, Andreassen TT, Oxlund H (2003): Low-intensity, high-frequency vibration appears to prevent the decrease in strength of the femur and tibia associated with ovariectomy of adult rats. *Bone* 32, 69–77
- Ozturk A, Ilman AA, Saglam H, Yalcinkaya U, Aykut S, Akgoz S, Ozkan Y, Yanik K, Kivcak B, Yalcin N et al. (2008): The effects of phytoestrogens on fracture healing: experimental research in New Zealand white rabbits. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 14, 21–27
- 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



- Pelletier G (2000): Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histol Histopathol* 15, 1261–1270
- Piccone CM, Brazeau GA, McCormick KM (2005): Effect of oestrogen on myofibre size and myosin expression in growing rats. *Exp. Physiol.* 90, 87–93
- Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP (2000): Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr* 130, 1675–1681
- Piekarski K, Munro M (1977): Transport mechanism operating between blood supply and osteocytes in long bones. *Nature* 269, 80–82
- Pilsakova L, Rieckensky I, Jagla F (2010): The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. *Physiol Res* 59, 651–664
- Rachon D, Seidlová-Wuttke D, Vortherms T, Wuttke W (2007a): Effects of dietary equol administration on ovariectomy induced bone loss in Sprague-Dawley rats. *Maturitas* 58, 308–315
- Rachon D, Vortherms T, Seidlová-Wuttke D, Wuttke W (2007b): Effects of dietary equol on body weight gain, intra-abdominal fat accumulation, plasma lipids, and glucose tolerance in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Menopause* 14, 925–932
- Rickard DJ, Monroe DG, Ruesink TJ, Khosla S, Riggs BL, Spelsberg TC (2003): Phytoestrogen genistein acts as an estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptors alpha and beta. *J Cell Biochem* 89, 633–646
- Riggs BL, Khosla S, Melton, L Joseph 3rd (2002): Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 23, 279–302
- Rubin C, Turner AS, Mallinckrodt C, Jerome C, McLeod K, Bain S (2002): Mechanical strain, induced noninvasively in the high-frequency domain, is anabolic to cancellous bone, but not cortical bone. *Bone* 30, 445–452
- Rubin C, Judex S, Qin Y (2006): Low-level mechanical signals and their potential as a non-pharmacological intervention for osteoporosis. *Age Ageing* 35 Suppl 2, ii32-ii36
- Rubinacci A, Marenzana M, Cavani F, Colasante F, Villa I, Willnecker J, Moro GL, Spreafico LP, Ferretti M, Guidobono F et al. (2008): Ovariectomy Sensitizes Rat Cortical Bone to Whole-Body Vibration. *Calcif Tissue Int* 82, 316–326
- Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG (2008): Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19, 459–466
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U: *Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*. Thieme, Stuttgart [u.a.] 2005
- Seeman E (2013): Age- and Menopause-Related Bone Loss Compromise Cortical and Trabecular Microstructure. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 68, 1218–1225
- Sehmisch S, Hammer F, Christoffel J, Seidlová-Wuttke D, Tezval M, Wuttke W, Stuermer K, Stuermer E (2008): Comparison of the Phytohormones Genistein, Resveratrol and 8-Prenylnaringenin as Agents for Preventing Osteoporosis. *Planta Med* 74, 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, 1999–2008
- Sehmisch S, Erren M, Kolios L, Tezval M, Seidlová-Wuttke D, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2010): Effects of isoflavones equol and genistein on bone quality in a rat osteopenia model. *Phytother Res* 24 Suppl 2, S168-74
- Seidlová-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T, Wuttke W (2003): Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: comparison with estradiol-17beta. *Eur J Endocrinol* 149, 351–362
- Seidlová-Wuttke D, Stürmer KM, Stürmer EK, Sehmisch S, Wuttke W (2006): Contrasting effects of estradiol, testosterone and of a black cohosh extract on density, mechanical properties and expression of several genes in the metaphysis of the tibia and on fat tissue of orchidectomized rats. *International Symposium on phytomedicines in gynecology* 55, Supplement 1, S64
- Seidlová-Wuttke D, Prella K, Fritzemeier K, Wuttke W (2008): Effects of estrogen receptor alpha- and beta-selective substances in the metaphysis of the tibia and on serum parameters of bone and fat tissue metabolism of ovariectomized rats. *Bone* 43, 849–855
- Setchell K D R, 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
- Shi H, Cheung W, Qin L, Leung AH, Leung K (2010): Low-magnitude high-frequency vibration treatment augments fracture healing in ovariectomy-induced osteoporotic bone. *Bone* 46, 1299–1305
- Shor D, Sathyapalan T, Atkin SL, Thatcher NJ (2012): Does equol production determine soy endocrine effects? *Eur J Nutr* 51, 389–398
- Silbernagl S, Despopoulos A: Taschenatlas der Physiologie. 6., korr. Auflage; Thieme, Stuttgart, New York 2003
- Slatkovska L, Alibhai, S M H, Beyene J, Cheung AM (2010): Effect of whole-body vibration on BMD: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int* 21, 1969–1980
- Spaniel-Borowski K: Anatomie. (Duale Reihe); Thieme, Stuttgart 2007
- Stock H, Schneider A, Strauss E (2004): Osteoporosis: a disease in men. *Clin Orthop Relat Res* 425, 143–151
- Tanaka SM, Li J, Duncan RL, Yokota H, Burr DB, Turner CH (2003): Effects of broad frequency vibration on cultured osteoblasts. *J Biomech* 36, 73–80
- Thole S: Die Wirkung von Sexual- und Phytohormonen auf das Remodelling des osteoporotischen Knochens der orchiektomierten Ratte nach Trepanation und Vibration, Med. Diss. Göttingen 2014
- Torvinen S, Kannus P, Sievanen H, Jarvinen, Tero A H, Pasanen M, Kontulainen S, Nenonen A, Jarvinen, Teppo L N, Paakkala T, Jarvinen M et al. (2003): Effect of 8-month vertical whole body vibration on bone, muscle performance, and body balance: a randomized controlled study. *J Bone Miner Res* 18, 876–884

- Turner CH, Takano Y, Owan I (1995): Aging changes mechanical loading thresholds for bone formation in rats. *J Bone Miner Res* 10, 1544–1549
- Uesugi T, Toda T, Tsuji K, Ishida H (2001): Comparative study on reduction of bone loss and lipid metabolism abnormality in ovariectomized rats by soy isoflavones, daidzin, genistin, and glycitin. *Biol Pharm Bull* 24, 368–372
- Usui Y, Zerwekh JE, Vanharanta H, Ashman RB, Mooney V (1989): Different effects of mechanical vibration on bone ingrowth into porous hydroxyapatite and fracture healing in a rabbit model. *J Orthop Res* 7, 559–567
- Vandenput L, Boonen S, van Herck E, Swinnen JV, Bouillon R, Vanderschueren D (2002): Evidence from the aged orchidectomized male rat model that 17beta-estradiol is a more effective bone-sparing and anabolic agent than 5alpha-dihydrotestosterone. *J Bone Miner Res* 17, 2080–2086
- Verschueren SMP, Roelants M, Delecluse C, Swinnen S, Vanderschueren D, Boonen S (2004): Effect of 6-Month Whole Body Vibration Training on Hip Density, Muscle Strength, and Postural Control in Postmenopausal Women: A Randomized Controlled Pilot Study. *J Bone Miner Res* 19, 352–359
- Walsh WR, Sherman P, Howlett CR, Sonnabend DH, Ehrlich MG (1997): Fracture healing in a rat osteopenia model. *Clin Orthop Relat Res*, 218–227
- Watts NB, Adler RA, Bilezikian JP, Drake MT, Eastell R, Orwoll ES, Finkelstein JS (2012): Osteoporosis in Men: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 97, 1802–1822
- Welsch U: Sobotta Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie, 2., völlig überarb. Auflage; Urban & Fischer in Elsevier, München [u.a.] 2006
- WHO (1994): Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 843, 1–129
- Wilks DC, Winwood K, Gilliver SF, Kwiet A, Chatfield M, Michaelis I, Sun LW, Ferretti JL, Sargeant AJ, Felsenberg D et al. (2009): Bone mass and geometry of the tibia and the radius of master sprinters, middle and long distance runners, race-walkers and sedentary control participants: A pQCT study. *Bone* 45, 91–97
- Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA (1985): Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 37, 324–328
- Wronski TJ, Cintron M, Dann LM (1988): Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 43, 179–183
- 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* (1985) 94, 335–342
- Wu J, Oka J, Tabata I, Higuchi M, Toda T, Fuku N, Ezaki J, Sugiyama F, Uchiyama S, Yamada K et al. (2006): Effects of isoflavone and exercise on BMD and fat mass in postmenopausal Japanese women: a 1-year randomized placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res* 21, 780–789

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

Yamagishi T, Otsuka E, Hagiwara H (2001): Reciprocal control of expression of mRNAs for osteoclast differentiation factor and OPG in osteogenic stromal cells by genistein: evidence for the involvement of topoisomerase II in osteoclastogenesis. *Endocrinology* 142, 3632–3637

Yamaguchi M (2012): Nutritional factors and bone homeostasis: synergistic effect with zinc and genistein in osteogenesis. *Mol Cell Biochem* 366, 201–221

You L, Temiyasathit S, Lee P, Kim CH, Tummala P, Yao W, Kingery W, Malone AM, Kwon RY, Jacobs CR (2008): Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone* 42, 172–179

Zarrabeitia MT, Hernandez JL, Valero C, Zarrabeitia A, Amado JA, Gonzalez-Macias J, Riancho JA (2007): Adiposity, estradiol, and genetic variants of steroid-metabolizing enzymes as determinants of bone mineral density. *Eur J Endocrinol* 156, 117–122

## DANK

Herrn Prof. Dr. med. W. Wuttke danke ich ganz herzlich für die Bereitstellung des Themas, für die großzügige Arbeitsmöglichkeit in seiner Abteilung und für die sehr freundliche und wissenschaftliche Betreuung während dieser Zeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Priv. Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke für die herzliche und hilfsbereite Zusammenarbeit während der gesamten Studie sowie für die unermüdliche und ausführliche Beantwortung all meiner Fragen.

Danken möchte ich an dieser Stelle auch meinem Kommilitonen Sebastian Papenberg. Das gemeinsame Arbeiten an diesem Experiment brachte stets eine nette Arbeitsatmosphäre und anregende Diskussionen.

## LEBENS LAUF

Am 24.01.1985 wurde ich, Sara Barbara Henze, als drittes Kind von Barbara Henze (geb. Schulz) und dem Pastor Klaus Henze in Kyritz geboren.

1991 besuchte ich für ein halbes Jahr die Grundschule in Berlin-Marzahn. Danach wechselte ich 1992 auf die Gemeinschaftsgrundschule in Schnellenbach (Oberbergischer Kreis). Anschließend besuchte ich von 1995-1999 die Leopold-Goes-Realschule in Runderoth. Nach einem weiteren Umzug besuchte ich von 1999-2001 die Gunzelin-Realschule in Peine. Ich setzte meine schulische Ausbildung am Gymnasium am Silberkamp in Peine von 2001-2004 fort und erlangte die allgemeine Hochschulreife.

Nach dem Abitur arbeitete ich von 2004-2005 als Au-Pair in einer neuseeländischen Familie. 2006 nahm ich das Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen auf. Nach zwei Semestern wechselte ich 2007 nach Göttingen und begann dort im zweiten Semester das Studium der Humanmedizin. Im Frühjahr 2009 habe ich unter der Leitung von Prof. Dr. med. W. Wuttke mit den experimentellen Versuchen zu meiner Promotion begonnen. Im Sommer 2010 ist mein Sohn geboren worden. Nach einem Semester Pause setzte ich das Studium 2011 fort und schloss im Frühjahr 2013 das Medizinstudium erfolgreich mit dem Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Anschließend kümmerte ich mich um die Fertigstellung meiner Promotion. Zudem wurde in dem Zeitraum meine Tochter geboren.

Seit Februar 2015 arbeite ich als Assistenzärztin in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe in Rendsburg.