

Aus der Arbeitsgruppe experimentelle Endokrinologie

(Prof. Dr. med. W. Wuttke)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Der Effekt von Dihydrotestosteron, 17β -Estradiol, Genistein und Equol auf den osteoporotischen Knochen der männlichen Ratte nach Trepanation dargestellt durch das pQCT

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Tassilo Christian Kunzmann
aus München

Göttingen, 2010

Dekan: Prof. Dr. med. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wuttke

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Wiese

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2011

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Allgemeine Grundlagen zu Knochenstruktur und Osteoporose	2
1.1.1 Aufbau und Physiologie des Knochens	2
1.1.2 Die Osteoporose	3
1.2 Osteoporose im Tierversuch	4
1.3 Diagnostik der Osteoporose	4
1.4 Therapie der Osteoporose speziell für den Mann	6
1.5 Frakturheilung und Heilungsproblematik bei Osteoporose	7
1.6 Steroidhormone im Allgemeinen	8
1.7 Sexualhormone und Knochen	9
1.7.1 Östrogene	9
1.7.2 Androgene und Androgenrezeptor	10
1.8 Der hormonelle Einfluss auf das Fettgewebe	11
1.9 Phytoöstrogene	11
1.9.1 Genistein	12
1.9.2 Equol	12
1.10 Fragestellungen für das Studienziel	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Versuchstiere	14
2.2 Zeitlicher Versuchsablauf	15
2.3 Testsubstanzen	16
2.4 Computertomographie (pQCT)	17
2.4.1. Messvorgang und Messprinzip	17
2.5 Orchidektomie (Orx)	20
2.6 Trepanation	20
2.7 Identifikation der Tiere	22
2.8 Tötung der Ratten und Serumanalyse	22
2.9 Statistische Auswertung	23
3. Ergebnisse	24
3.1 Futterverbrauch	24
3.2 Körpergewicht	26
3.3 Die Körpergewichtsdifferenzen der einzelnen Gruppen	27

3.4 Muskelfläche des Unterschenkels	28
3.5 Fettanteil am Unterschenkel	29
3.6 Knochenparameter	30
3.6.1 Ergebnisse der CT- Messung	30
3.6.1.1 Spongiosadichte	31
3.6.1.2 Endostale Fläche	32
3.6.1.3 Kortikalisdichte der Metaphyse	33
3.6.1.4 Kortikalisfläche der Metaphyse	34
3.6.1.5 Endostaler Umfang	35
3.6.1.6 Periostaler Umfang	36
3.6.1.7 Widerstandsmoment der Metaphyse	37
3.7 Serumparameter des Knochenstoffwechsels	37
3.7.1 Veränderung der Serum Cross- Laps	38
3.7.2 Veränderung des Serum- Osteokalzins	39
3.8 Veränderungen des Prostatagewichts	40
4. Diskussion	41
4.1 Futter, Futtermittelverbrauch und Körpergewicht	41
4.2 Die Trepanation - Überlegungen zur Auswirkung auf den Knochen	42
4.3 Knochenparameter	44
4.3.1 Die Wirkung der Futtersubstanzen auf den durch Trepanation irritierten osteoporotischen Knochen	45
4.4 Veränderungen der Muskelfläche und des Fettanteils durch Hormonmangel	52
4.4.1 Die Wirkung der Futtersubstanzen auf das paratibiale Fettdepot und die Muskelfläche	53
4.5 Beurteilung der Heilungsvorgänge durch die CT- Bilder	56
5. Zusammenfassung	58
6. Bilderanhang	60
6.1 Bilder von der Trepanation	60
6.2 CT- Schnittbilder der einzelnen Gruppen	61
7. Tabellenverzeichnis	66
8. Abbildungsverzeichnis	67
9. Literaturverzeichnis	69

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abt	Abteilung
AF	Aktivierungsfunktion
al.	alii
ALP	alkalische Phosphatase
AR	Androgenrezeptor
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa
cm	Zentimeter
DEXA	Dual- Energy-X-Ray-Absorptiometrie
DHT	Dihydrotestosteron
E2	17 β -Estradiol
EQ	Equol
ER	Östrogenrezeptoren
ER α	Östrogen- Rezeptor α
ER β	Östrogen- Rezeptor β
Fa.	Firma
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
Gen	Genistein
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
kg	Kilogramm
LH	luteinisierendes Hormon
mg	Milligramm
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPS	Mononukleäres Phagozytosesystem
ng	Nanogramm
Obd.	Obduktion
OC	Osteokalzin
orx	orchidektomiert

Orx	Orchidektomie
ovx	ovarektomiert
Ovx	Ovarektomie
pQCT	periphere quantitative Computertomographie
S.	Seite
SA	Standardabweichung
s.c.	subkutan
SD	Sprague- Dawley
SERM	selektiver Östrogenrezeptor-Modulator
SF	Sojafrei
SLC	Slice
Tab.	Tabelle
WHO	World- Health- Organisation
z.B.	zum Beispiel

Symbole:

%	Prozent
°	Grad

1. Einleitung

Osteoporose ist auch Männersache!

Unter Osteoporose versteht man eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine Beeinträchtigung der Mikroarchitektur des Knochens mit Anstieg der Knochenbrüchigkeit und erhöhter Frakturneigung charakterisiert ist (Konsensuskonferenz 1996).

Bis zum heutigen Zeitpunkt wird die Osteoporose häufig als „Frauenkrankheit“ eingestuft. Neue epidemiologische und klinische Daten widersprechen diesem Bild jedoch in vielerlei Hinsicht. Laut dem Bundesverband für Osteoporose treten etwa 20% aller Hüftfrakturen und nicht weniger als 30% aller Wirbelkörperfrakturen bei Männern auf (Internet: <http://www.bfo-aktuell.de/wot2003/6.html>). In einer anderen Studie betrug die Rohprävalenz der Osteoporose, die durch eine morphologisch und radiologisch nachweisbare osteoporotische Wirbelfraktur definiert wurde, bei Männern im Alter zwischen 50 und 79 Jahren 5,3% und bei Frauen im gleichen Altersspektrum 7,7% (Raspe et al. 1998).

Auch an den stets steigenden Behandlungskosten für pathologische Frakturen spiegelt sich die zunehmende Problematik wider. Bereits von 2000 bis 2007 waren die Kosten um 14 Mio. Euro gestiegen, wovon allein fast 4 Mio. beim männlichen Geschlecht lagen (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2006).

Ursache dieser rasanten Entwicklung ist nicht zuletzt das stetig zunehmende Alter der männlichen Bevölkerung. Als männliches Pendant zur postmenopausalen Osteoporose der älteren Frau wird oft die Andropause genannt. Der Hormonspiegelabfall ist nicht wie nach der Menopause plötzlich, sondern mit zunehmendem Alter schleichend (Vermeulen 2000). Der steigende Androgenmangel führt jedoch ebenfalls zur Osteoporose und deren Folgeerkrankungen.

Die nachfolgend abgebildeten Alterspyramiden in Abb.1 vergleichen in einer Hochrechnung bis 2050 die Entwicklung der Altersstruktur über 100 Jahre. Deutlich zeigt sich ein Zuwachs an über 70 jährigen Männern, die zur Risikogruppe zählen.

Dies verdeutlicht, dass die Osteoporose auch beim männlichen Geschlecht einen immer größeren Stellenwert einnimmt.

Derzeit gibt es, trotz wachsender Bedeutung für das männliche Geschlecht, nur für postmenopausale Frauen eine allgemein vereinbarte WHO- Nomenklatur (Pfeilschifter 2006).

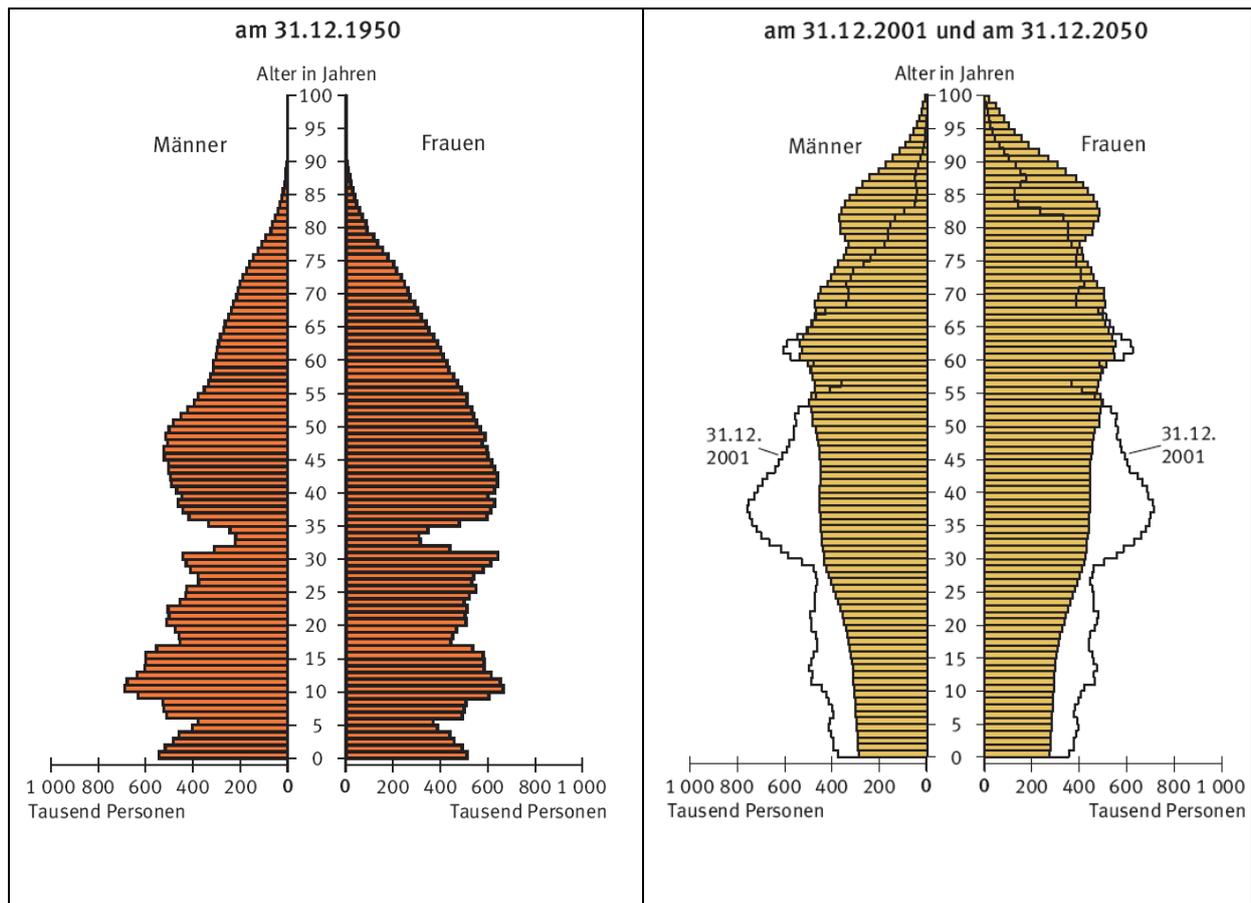


Abb.1 Altersentwicklung der Bundesrepublik Deutschland ab 1950 hochgerechnet bis 2050:

https://www-ec.destatis.de/csp/shop/sfg/bpm.html.cms.cBroker.cls?cmspath=struktur_vollanzeige.csp&ID=1019440

Diese wurde 1994 von einem Expertenkomitee formuliert. Nach dem dort entwickelten T-Score spricht man von einer Osteoporose, wenn die mittels Dual X-ray Absorptiometrie (DXA) gemessene Knochendichte im Bereich der Lendenwirbelsäule $-2,5$ SA unter dem Mittelwert eines jungen Normkollektivs liegt. Messwerte zwischen -1 und $-2,5$ SA sprechen für eine Osteopenie (WHO 1994).

1.1 Allgemeine Grundlagen zu Knochenstruktur und Osteoporose

1.1.1 Aufbau und Physiologie des Knochens

Der Knochen ist ein besonders hartes Stützgewebe. Alle Wirbeltiere stützen ihren Körper von innen durch ein Skelett, das aus vielen Knochen gebildet wird. Gleichzeitig werden innere Organe von Knochen geschützt. Durch einen dauerhaften Umbau, das so genannte „Remodeling“, kann sich der Knochen den jeweiligen Anforderungen gut anpassen.

In den ersten beiden Lebensdekaden unterliegt das Skelett einem Knochen-„Modeling“. In dieser Zeit sind die Wachstumsfugen noch offen und es kommt zum Wachstum und zur Formgebung des Knochens. Ein wichtiger Gesichtspunkt für diese Arbeit ist, dass das Modeling auch immer an der Frakturheilung beteiligt ist (Compston 2001).

Die zellulären Knochenbestandteile sind für diese Umbauvorgänge verantwortlich. Diese bestehen aus knochenbildenden Zellen, den Osteoblasten, den aus ihnen hervorgehenden Osteozyten und den knochenabbauenden Zellen, den Osteoklasten.

Die Osteoblasten synthetisieren und sezernieren die organischen Komponenten der nicht verkalkten Knochenmatrix (Osteoid), die aus Kollagen Typ I, Proteoglykanen und Glykoproteinen besteht. Des Weiteren sind Osteoblasten bei der Hartszubstanzbildung beteiligt.

Osteozyten entstehen aus Osteoblasten. Sie sind die „ruhenden“ Zellen des Knochens, die im Rahmen der Ossifikation eingemauert wurden. Über Fortsätze verbunden können sie mit Hilfe von Signalstoffen kommunizieren. Weiterhin geben sie Kalziumphosphat in den Extrazellulärraum ab, das für den Verkalkungsprozess benötigt wird.

Die mehrkernigen Osteoklasten sind sehr große, bewegliche Zellen, die den mineralisierten Knochen resorbieren. Sie gehören zum mononukleären Phagozytosesystem (MPS) und entstehen durch Verschmelzung mehrerer Makrophagen (Zanner 2002).

Ständig findet ein Auf- und Abbau (Remodeling) statt, so dass etwa alle zehn Jahre das komplette Skelettsystem erneuert ist. Bei jungen Erwachsenen sind Aufbau und Abbau ausbalanciert. Mit zunehmendem Alter verschiebt sich jedoch das Gleichgewicht zu Gunsten der Osteoklasten und es kann zur Osteoporose kommen (Deutzmann et al. 2003).

Makroskopisch gliedert sich der Knochen in die randständige Kortikalis und die innen liegende Spongiosa. Die Kortikalis, auch Kompakta genannt, ist der belastungsstabilste Bereich mit einem charakteristischen Aufbau aus Osteonen (Havers-Systeme).

Die Spongiosa befindet sich von Kortikalis umrahmt im Knocheninneren. Sie ist in schwammartigen Knochenbälkchen organisiert und verstärkt in den belasteten Skelettabschnitten die mechanische Festigkeit. Das blutbildende Knochenmark befindet sich zwischen den Knochenbälkchen (Jundt 2008).

1.1.2 Die Osteoporose

Wie einleitend beschrieben, handelt es sich bei der Osteoporose um eine systemische Skeletterkrankung, die bei niedriger Knochenmasse und Beeinträchtigung der

Mikroarchitektur mit einem erhöhten Frakturrisiko einhergeht. Man unterscheidet je nach Pathogenese drei verschiedene Formen (primäre, sekundäre und idiopathische Osteoporose). Erstere wird auch als senile Osteoporose bezeichnet, da sie gehäuft bei Frauen nach der Menopause und bei Männern ab dem 70. Lebensjahr auftritt.

Die idiopathische Form ist äußerst selten und meist bei jungen Menschen zu finden.

Eine sekundäre Osteoporose hat verschiedene Entstehungsursachen. Dabei unterscheidet man endokrine Ursachen wie Hyperkortisolismus, Hypogonadismus oder Hyperthyreose von iatrogen-medikamentösen wie einer Kortison-Langzeittherapie. Auch das Malabsorptionssyndrom und die Immobilisation werden zu dieser Form gezählt (Herold et al. 2005).

1.2 Osteoporose im Tierversuch

Im Tierversuch ist es möglich, durch eine Ovariectomie (Ovx) oder eine Orchidektomie (Orx) einen Östrogen- bzw. einen Androgenmangel zu erzeugen. Es kommt wie beim Menschen nach der Meno-/Andropause durch einen erhöhten Knochenstoffwechsel zu vermehrtem Knochenabbau. Die Ratte eignet sich gut als Versuchstier, da schon nach kurzer Zeit signifikante Knochenveränderungen festgestellt werden können.

Die meisten Untersuchungen zur Osteoporose sind an ovx-Ratten durchgeführt worden (Wronski et al. 1988, Vanderschueren et al. 1993). In einigen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass auch die männliche Ratte ein gutes Modell für die Osteoporose des Mannes ist. So zeigte die trabekuläre Dichte der Tibia einer 3 Monate alten männlichen Ratte nach Orx eine Abnahme um mehr als 30%, was einer deutlichen Osteoporose entspricht (Stürmer et al. 2006).

1.3 Diagnostik der Osteoporose

Oft lässt sich die Osteoporose schon durch die Anamnese und körperliche Untersuchung erkennen. Die Patienten klagen über dauerhafte Rückenschmerzen, welche auf Spontanfrakturen zurückzuführen sind. Bei der körperlichen Untersuchung fallen dann häufig ein Rundrücken oder tannenbaumartige Hautfalten entlang der Wirbelsäule auf. Auch die Abnahme der Körpergröße seit dem 25. Lebensjahr um mindestens 4 cm kann ein wichtiger Hinweis sein.

Durch die apparative Diagnostik kann der Grad der Osteoporose eingeschätzt werden. Die gängigsten Untersuchungen sind hierbei die Dual- X- ray- Absorptiometrie (DXA), die periphere quantitative Computertomographie (pQCT) und der quantitative Ultraschall (QUS). Goldstandard der Osteoporosedagnostik ist die DXA-Untersuchung. Grund dafür ist die geringe Strahlenbelastung bei zugleich international anerkannter Standardisierung (Kanis 2002).

Für die Beurteilung peripherer Strukturparameter des Knochens wird oft die QUS-Untersuchung eingesetzt. Sie ist kostengünstig und erzeugt keine Strahlenbelastung. Für sie gibt es keine Standardisierung und es besteht keine Möglichkeit, Hauptfrakturorte wie Wirbelsäule und Hüfte zu untersuchen.

Die pQCT- Untersuchung spielt in unserer Studie eine große Rolle, da mit ihr getrennt die Knochendichte von Spongiosa und Kortikalis von peripheren Knochenabschnitten untersucht werden kann. Nachteil dieser Untersuchung sind verhältnismäßig hohe Kosten bei stärkerer Strahlenbelastung (Guglielmi und Lang 2002).

Als weitere Untersuchungsmöglichkeit ist die Serundiagnostik zu nennen. Mit ihrer Hilfe kann der Verlauf von Knochenveränderungen gut nachvollzogen werden. Tabelle 1 zeigt die wichtigsten Serumparameter:

Tab. 1 Parameter für die Serundiagnostik der Osteoporose

Normwerte der Abteilung für Endokrinologie UMG Göttingen.

Osteokalzin- Bestimmung durch das Elecsys- System (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Serum- Cross- Lap- Bestimmung durch ELISA (Osteometer, Bio Tech AIS, Dänemark).

B- ALP- Bestimmung durch Farbttest nach statistischer Methode (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Serummarker	Normalwerte	
	Mann	männliche Ratte
Osteokalzin (OC)	um 26,3 ng/ml	1,5- 11.0 ng/ml
B-ALP (knochenspezifische alkalische Phosphatase)	15-41,3 U/l	2,8-12,0 U/ml
Cross-Laps	um 0,3 ng/ml	6,0-65,0 nmol/l

Osteokalzin ist ein hochspezifischer Marker für die Osteoblastenaktivität und spiegelt den Knochenaufbau wider (Seidlova- Wuttke et al. 2003 a, b).

Über die knochenspezifische ALP kann das Maß des Knochenabbaus bestimmt werden. Durch spezifische Verfahren können die Isoenzyme aufgetrennt werden, so dass zwischen der ALP des Knochens und der in anderen Geweben (z.B. Leber, Niere, Plazenta) unterschieden werden kann (Spelsberg et al. 1999; Seidlova- Wuttke et al. 2003 a, b)

Auch die Ausscheidung von Pyridinolderivaten im Urin gibt Hinweis auf Knochenabbauprozesse. Es handelt sich hierbei um die sogenannten Cross-Laps, die bei der Vernetzung von Kollagen- Typ- I- Molekülen im Knochen eine Rolle spielen (Garnero und Delmas 1999). Auch über die Cross-Laps im Serum kann der Knochenabbau bestimmt werden. Diese sind C-terminale Telopeptide und ebenfalls Abbauprodukte des Kollagens.

1.4 Therapie der Osteoporose speziell für den Mann

Neben einer Prophylaxe wie Kalzium- und Vitamin- D- haltige Ernährung, ausreichende körperliche Bewegung etc. steht eine Reihe von medikamentösen Therapien zur Verfügung:

In Studien zeigten sich die Alendronate z.B. (Fosamax®) als eine sehr effektive Behandlungsmöglichkeit der männlichen Osteoporose. Alendronate sind potentere Bisphosphonate, welche die Osteoklastenaktivität hemmen. Durch Alendronatgabe konnte die Frakturrate und die Deformation von Wirbelkörpern vermindert werden.

Andere Studien zeigten, dass die Kombination von Fluoriden und Etidronaten eine Abnahme osteoporotischer Frakturen bewirken kann. Ihr Wirkmechanismus in Kombination ist jedoch weitgehend unbekannt.

Die Kalzitinin-Verabreichung erfolgt heutzutage meist nur bei Unverträglichkeit der Alendronate.

Eine Hormontherapie mit Androgenen wird derzeit kontrovers diskutiert. Männer mit altersbedingtem Androgenmangel profitierten von der Testosteron-Therapie (T-Propionate). Hier zeigte sich ein Anstieg der Knochendichte im Bereich der lumbalen Wirbelkörper. Allerdings geht die Therapie mit großen Risiken einher, wie z.B. die Entwicklung einer benignen Prostatahyperplasie oder die Entstehung eines Prostatakarzinoms (Stock et al. 2004).

Deshalb konzentriert sich die Suche verstärkt auf Stoffe mit gleicher Wirkungseigenschaft bei geringeren Nebenwirkungen. Ein Hoffnungsträger sind pflanzliche Mittel wie beispielsweise die Phytoöstrogene, welche in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

1.5 Frakturheilung und Heilungsproblematik bei Osteoporose

Bei der Frakturheilung wird die primäre von der sekundären Form unterschieden. Die primäre findet bei stabiler Fixation beider Bruchenden und gleichzeitig guter Durchblutung ohne Kallusbildung statt (Henne-Bruns et al. 2003).

Die sekundäre Heilungsform findet sich bei instabiler Bruchsituation oder bei Knochenläsionen. Sie geht mit Kallusbildung einher und verläuft in Stadien, die in Tabelle 2 aufgezeigt sind. Studien an männlichen Wistar-Ratten zeigten ein schnelleres Durchlaufen der Heilungsstadien als beim Menschen (Kussar et al. 2001). Diese sind in Tabelle 3 dargestellt.

Frakturen bei Osteoporose gehen oft mit orthopädischen Komplikationen oder Funktionseinschränkungen einher (Barrois et al. 1993). In Experimenten an osteoporotischen und gesunden weiblichen Ratten zeigten die Frakturen gleiche Heilungsdauer. Es bestand jedoch eine geringere mechanische Festigkeit des neu gebildeten osteoporotischen Knochens (Augat et al. 2004). Eine Erklärung für die mindere Stabilität der neu gebildeten Knochen ist die geringere TGF- β - Sekretion osteoporotischer Osteoblasten (Neidlinger-Wilke et al. 1995). TGF- β gehört zu der Familie der regulierenden Wachstumsfaktoren. Darüber wird der Umfang der Osteoblasten-Differenzierung gesteuert (Löffler und Petrides 2003).

Andere Experimente zeigten in histologischen Untersuchungen deutlich dünnere Knochenneubildungen um Implantate osteoporotischer Tiere als bei gesunden (Du et al. 2009).

Tab. 2 Vergleich der Heilungsstadien der sekundären Knochenheilung beim Menschen nach Bohndorf et al. (2006) mit denen der männlichen Wistar- Ratte nach Kussar et al. (2001)

Zeit der Heilungsstadien		
Mensch	männliche Ratte	Stadien
Erste Tage	1.-7. Tag	Hämatom als Folge der Zerreißung des Knochens, des Periosts, des Knochenmarks und der umgebenden Weichteile „Entzündungsphase“ Aktivierung und Einstrom verschiedener Zellarten
Bis 3.-4. Woche	nach 14 Tagen	„Granulationsphase“ Bindegewebige Umbildung des Hämatoms durch proliferierendes Gewebe mit Kollagenfasern und Kapillareinsprossung Differenzierung und Einwanderung von Osteoblasten (Knochenbildung), Chondroblasten (Knorpelbildung) Bildung eines weichen Kallus
Ab 3.-4. Woche Bis 3.-4. Monat	ab 3. Woche	„Kallushärtung“ Mineralisation der Grundsubstanz Bildung von Geflechtknochen
Ab 4. Monat	ab 28-42 Tagen	„Modeling und Remodeling“ Umbau des Geflechtknochens in lamellären Knochen (Modeling) Wiederherstellung der normalen Knochenkontur und des Markraums (Remodeling)

1.6. Steroidhormone im Allgemeinen

Die Steroidhormone sind Abkömmlinge des Cholesterins und besitzen wie dieses ein Sterangerüst. Sie lassen sich in fünf Gruppen einteilen: Östrogene, Androgene, Gestagene, Glukokortikoide und Mineralokortikoide. Strukturell unterscheiden sie sich vor allem durch den Einbau von Hydroxyl- oder Carboanhydrilgruppen (Norman und Henry 2003). Ihre Biosynthese findet in den Keimdrüsen und in der Nebenniere statt. Zwischenprodukt ihrer Synthese ist immer das Progesteron. Auf Grund ihrer geringen Polarität zählen die Steroidhormone zu den lipophilen Hormonen. Da sie sich nicht in ausreichendem Umfang im Blut lösen können, sind sie auf hydrophile Transporter wie Albumin angewiesen. Die Zellmembran stellt für sie aufgrund der lipophilen Eigenschaft kein Hindernis dar (Löffler und Petrides 2003). Der Abbau läuft über die Leber ab. Hier werden sie glukuronidiert oder sulfatiert und danach über die Nieren und den Darm ausgeschieden (Cheng et al. 1998).

1.7 Sexualhormone und Knochen

Es ist gut bekannt, dass Sexualhormone großen Einfluss auf den Knochen haben. Hierbei spielen 17 β -Estradiol (E2) und Testosteron (T) die wichtigste Rolle. Sie üben auf die Homöostase des Skelettsystems starken Einfluss aus und erhöhen so die Stärke des Knochens. Diese Eigenschaften werden im klinischen Alltag beispielsweise zur Behandlung der postmenopausalen Osteoporose genutzt (Niethard und Pfeil. 2003).

1.7.1 Östrogene

Östrogene sind C-18 Steroide, die durch Abspaltung eines Kohlenstoffatoms aus den C-19-Steroiden hervorgehen. Bei der Frau werden Östrogene vor allem in den Thecainterna- und Zona- Granulosazellen der heranreifenden Follikel gebildet. Geringere Mengen entstehen auch in der Nebenniere, dem Fettgewebe, der Leber und in den Testes des Mannes. Bei beiden Geschlechtern wird die Ausschüttung über die Hypothalamus-Hypophysenachse geregelt (negative Rückkopplung). Die Ausscheidung erfolgt nach Inaktivierung und Glukuronidierung durch die Leber über die Nieren (Bühling et al. 2004).

Über die beiden Östrogenrezeptoren ER α und ER β vermitteln sie ihre Wirkung. Beide Rezeptoren kommen in verschiedenen Geweben mit unterschiedlicher Ausprägung vor. Speziell für den Knochen zeigten Studien an Knockout- Mäusen, dass die Rezeptoren unterschiedliche Effekte bei männlichen und weiblichen Individuen vermitteln. So spielt der ER α für die Männchen eine wesentlich größere Rolle im Hinblick auf Knochenerhaltung und Frakturheilung (Sims et al. 2002).

Die Wichtigkeit der Östrogene für das Knochenskelett des Mannes ist schon länger bekannt. Sie regulieren den Epiphysenschluss, steigern die Knochendichte und senken den Knochenabbau (Orwoll 2003). Außerdem fördern sie die Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten und hemmen gleichzeitig Osteoklasten (Compston 2001). Deutlich zeigte sich der Effekt von E2 auf den männlichen Knochen in Tierexperimenten mit Aromatasehemmern. Hier fiel trotz gesteigerter Testosteronkonzentrationen die Spongiosadichte stark ab und konnte nur durch eine E2-Behandlung erhalten werden (Vanderschueren et al. 2000 a). Die E2-Behandlung bei kastrierten Ratten erhält die spongiösen und kortikalen Knochenanteile (Vandenput et al. 2002) Außerdem zeigte sich bei geringerer E2-Konzentration ein deutlich höheres Frakturrisiko (Mellström et al. 2008).

1.7.2 Androgene und Androgenrezeptor

Das wichtigste Androgen ist das Testosteron. Es wird in den Leydigzellen des Hodens nach Stimulation durch das luteinisierende Hormon (LH) synthetisiert. Die Ausschüttung wird durch negative Rückkopplung kontrolliert.

Beim weiblichen Geschlecht findet die Testosteronproduktion in den Granulosaluteinzellen der Ovarien, in der Plazenta, in Geweben mit Aromataseaktivität wie dem Fettgewebe und in der Nebenniere statt. Die Androgenausscheidung erfolgt nach Glukuronidierung und Sulfatierung über Leber und Niere.

Testosteron kann durch die 5- α -Reduktase zu Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt werden, das eine fast dreifach stärkere biologische Aktivität als Testosteron besitzt. Beide aktivieren den Androgenrezeptor, der ubiquitär im Organismus beider Geschlechter vorkommt.

Bei Androgenmangel kommt es zu einem Knochendichteverlust einhergehend mit Muskulaturverlust und Fettleibigkeit (Erben 2001; Janssens und Vanderschueren 2000 b). Durch ihre Substitution konnte im Tierversuch die Knochenresorption reduziert, Muskulatur aufgebaut und Fett reduziert werden (Vanderschueren et al. 2000 b).

Androgene stimulieren Osteoblasten, sind für das Längenwachstum der Knochen verantwortlich und fördern die metaphysäre Ossifikation (Compston 2001). Weiterhin verursachen sie eine Zunahme der Kortikalisdichte (Vanderschueren et al. 2004)

Testosteron kann über das peripher vorkommende Enzym Aromatase zu 17 β -Estradiol umgewandelt werden und über diesen Weg den ER α und ER β stimulieren.

Die isolierte Wirkung auf den Androgenrezeptor kommt über die Reduktion des Testosterons zu Dihydrotestosteron (DHT) durch die 5 α Reduktase zustande. DHT als reduzierter Metabolit des Testosterons kann nicht mehr über die Aromatase zu Estradiol umgewandelt werden und die beiden Östrogenrezeptoren stimulieren.

1.8 Der hormonelle Einfluss auf das Fettgewebe

Mit zunehmendem Alter und der damit korrelierenden Androgenabnahme kommt es beim Mann zu einer Zunahme des abdominellen Fettgewebes (Jankowska et al. 2000). In gleicher Weise zeigt sich bei postmenopausalen Frauen durch die geringere Hormonproduktion in den Ovarien eine verstärkte abdominell konzentrierte Fettverteilung. Die Ursache hierfür ist neben den verminderten Östrogenen auch ein Mangel an männlichen Geschlechtshormonen (Blouin et al. 2003; Lovejoy 2003).

Im Unterschenkel von Ratten wurde ein Fettdepot lokalisiert, das sehr sensibel auf die Anwesenheit und Abwesenheit von Estradiol reagiert (Seidlova- Wuttke et al. 2003a). Dies ist so, da es einerseits eine hohe Aktivität der Aromatase besitzt (Wüster et Ziegler, 1999) und andererseits die Estrogenrezeptoren ER α und ER β exprimiert.

Mit Hilfe der pQCT- Messung (XCT 2000, Startec Medizintechnik GmbH) ist es möglich, das paratibiale Fettdepot der Ratte zu ermitteln und zu berechnen. Durch diese Methode kann der Einfluss von Östrogenen und Phytoöstrogenen auf den Fettanteil in vivo sehr genau bestimmt werden.

Bei männlichen Ratten zeigte sich, ähnlich wie beim Menschen, dass durch einen Androgenmangel eine Abnahme des Fettstoffwechsels ausgelöst wird, der zu einer erhöhten Fettspeicherung führt (Hansson et al.1991). Im Tierversuch konnte durch Substitution von Androgenen eine Aktivierung der Lipolyse beobachtet werden. Dabei erhöhte sich der Fettumsatz und die Tiere waren weniger adipös. Gleiches zeigte die Gabe von Östrogenen bei kastrierten männlichen Ratten. Hier wurde eine Fettreduzierung bei gleichzeitigem Muskelaufbau beobachtet (Vandenput et al. 2002).

1.9 Phytoöstrogene

Der Vergleich zwischen asiatischer und westlicher Welt im Hinblick auf Brust-, Kolon- und Prostatakarzinome brachte den Phytoöstrogenen große Aufmerksamkeit (Adlercreutz und Mazur 1997). Man führte die niedrigere Erkrankungsinzidenz von Asiaten auf die Einnahme von Sojaprodukten zurück. Diese besitzen phytoöstrogene Wirkung und gehören in asiatischen Breiten zu den Hauptnahrungsmitteln (Stephens 1997). Zahlreiche Daten zeigen für die Phytoöstrogene eine protektive Wirkung gegen kardiovaskuläre Erkrankungen, Tumorerkrankungen und postmenopausale Beschwerden (Tham et al. 1998). Aber auch eine knochenerhaltende Wirkung wird beschrieben (Wuttke et al. 2003, 2007; Seidlova-Wuttke et

al. 2008; Sugiyama et al. 2006; Lee et al. 2004; Khalil et al. 2005). So ist es ihnen möglich, auf Grund der strukturellen Verwandtschaft zu 17 β -Estradiol ebenfalls Wirkungen über die zellkernständigen Östrogenrezeptoren zu vermitteln.

Chemisch teilt man die Phytoöstrogene in vier Hauptgruppen ein: Isoflavone, Flavonoide, Stilbene und Lignane (Cos et al. 2003). Besondere Aufmerksamkeit bezüglich der hormonellen Wirkung wird den Isoflavonen Genistein, Coumestrol, Daidzein und seinem Abkömmling Equol (EQ) geschenkt.

1.9.1 Genistein

Genistein (Gen) gehört zur Gruppe der Isoflavone. Es bildet zusammen mit Daidzein das wichtigste Isoflavon aus der Sojapflanze.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von Genistein auf den Knochenstoffwechsel nicht ganz unbedeutend ist.

So konnte eine zweijährige Genistein-Gabe bei postmenopausalen Frauen das Frakturrisiko senken und gleichzeitig den Knochenstoffwechsel steigern (Mirani et al. 2007). Auch bei ovx Mäusen war der Effekt von Genistein auf den Knochen sichtbar. Es zeigte sich eine deutlich bessere Knochenerhaltung unter Genistein-Gabe, die mit einer erhöhten Osteoblastenzahl einherging (Fanti et al. 1998). Ebenfalls konnte 2005 von Pan et al. unter Genistein-Gabe eine Steigerung der Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten gezeigt werden. Auch für männliche Mäuse wurde ein positiver Einfluss auf den Knochen durch Genistein beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass ähnlich wie bei der E2-Gabe der Knochenstoffwechsel stimuliert wird, ohne einen Effekt auf die Samenbläschen auszuüben (Ishimi et al. 2002). In Frakturversuchen an ovx Ratten zeigte sich unter Genistein-Gabe die Bildung eines härteren Kallus (Kolios et al. 2009).

In der internationalen Literatur lassen sich nahezu keine Studien über eine Genistein-Behandlung der orx Ratten finden. Die Dissertationsarbeit von Alexander Schuldt (2007) beschreibt jedoch eine milde knochenerhaltende Wirkung bei günstiger Knochenarchitektur und Bruchfestigkeit.

1.9.2 Equol

Da Equol (EQ) als Substanz nicht direkt in Pflanzen enthalten ist, kann es im eigentlichen Sinne nicht zu den klassischen Phytoöstrogenen gezählt werden. EQ ist vielmehr ein metabolisches Produkt aus intestinalen Bakterien. Eine Anzahl von Bakterien aus dem menschlichen und tierischen Darm sind in jüngster Zeit isoliert worden, die das Phytoöstrogen Daidzein in EQ metabolisieren können (Setchell et al. 2002; Tamura et al. 2007; Minamida et al. 2008; Jin et al. 2008; Maruo et al. 2008).

Das metabolisierte EQ kommt in den Formen R-EQ und S-EQ vor. Im Tierversuch hat sich gezeigt, dass die S-Form eine Bindungsaffinität zu ER β besitzt, die mit der von Genistein vergleichbar ist (Muthyala et al. 2004). Da nur ein Drittel der Menschheit fähig ist, Daidzein in Equol umzuwandeln, kann nur bei einem Teil der Konsumenten von daidzeinhaltigen Sojaprodukten ein positiver Effekt auf die Gesundheit gefunden werden (Decroos et al. 2005; Setchell et al. 2002; Rowland et al. 2000).

In einigen Studien kann unter Equol- Einfluss eine knochenprotektive Wirkung beobachtet werden. Die ovx Ratten profitierten in der 2009 erschienenen Arbeit von Legette et al. von einer reinen Equol- Gabe. Dabei konnte eine leichte knochenerhaltende Wirkung beobachtet werden. Weiterhin zeigte die Equol- Gabe im Versuch an ovx-Mäusen eine Reduktion des Knochenverlustes ohne östrogene Nebenwirkung auf den Reproduktionstrakt (Fujoka et al. 2004). In jüngsten Studien konnte gezeigt werden, dass durch Equol die Frakturheilung verbessert wird. Dies zeigten Kolios et al. in einer 2009 erschienenen Arbeit.

1.10 Fragestellungen für das Studienziel

1. Entsteht bei den männlichen Ratten sechs Wochen nach Orx eine Osteopenie oder Osteoporose?
2. Welche Wirkung können E2, DHT und die Phytoöstrogene Gen und EQ auf den durch Trepanation irritierten osteoporotischen Knochen ausüben?
3. Welches der gegebenen Steroide hat die größte Wirkung auf den Knochen?
4. Welche Auswirkungen hat die Gabe von E2, DHT und den Phytoöstrogenen Gen und EQ auf das paratibiale Fettdepot und die Muskulatur?
5. Inwieweit lassen sich Heilungsprozesse auf den pQCT- Bildern nachvollziehen?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Unter der Anleitung und Aufsicht von Herrn Prof. Dr. med. W. Wuttke und Frau Dr. med., MU Dr. D. Seidlova-Wuttke wurde der Tierversuch an 180 männlichen Sprague-Dawley (SD)- Ratten durchgeführt (Züchter der Tiere: Winkelmann, Borchon, Deutschland).

Die Tiere waren unter Standardbedingungen bei einer Raumtemperatur von 23° Celsius (C), einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55% und einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Zyklus gehalten worden. Futter und Wasser stand den Tieren jederzeit zur freien Verfügung. In Makron®-Käfigen Typ 4 der Fa. Techniplast Deutschland aus Hohenpeißenberg wurden je 4 Tiere gehalten.

Direkt nach Ankunft der Tiere waren diese für 3 Wochen mit sojafreiem (SF) Futter gefüttert worden (V 1355, R-Z, ssniff, phytoöstrogenarm). Bei Tierversuchen mit Östrogen- und östrogenähnlichen Substanzen ist dies in der Eingewöhnungsphase ein etabliertes Standardverfahren (Seidlova-Wuttke et al. 2008).

Gesetzliche Bestimmungen:

Für das Tierexperiment lag eine Versuchstiergenehmigung der Bezirksregierung Braunschweig mit dem Aktenzeichen G 43.08 vor.

2.2 Zeitlicher Versuchsablauf

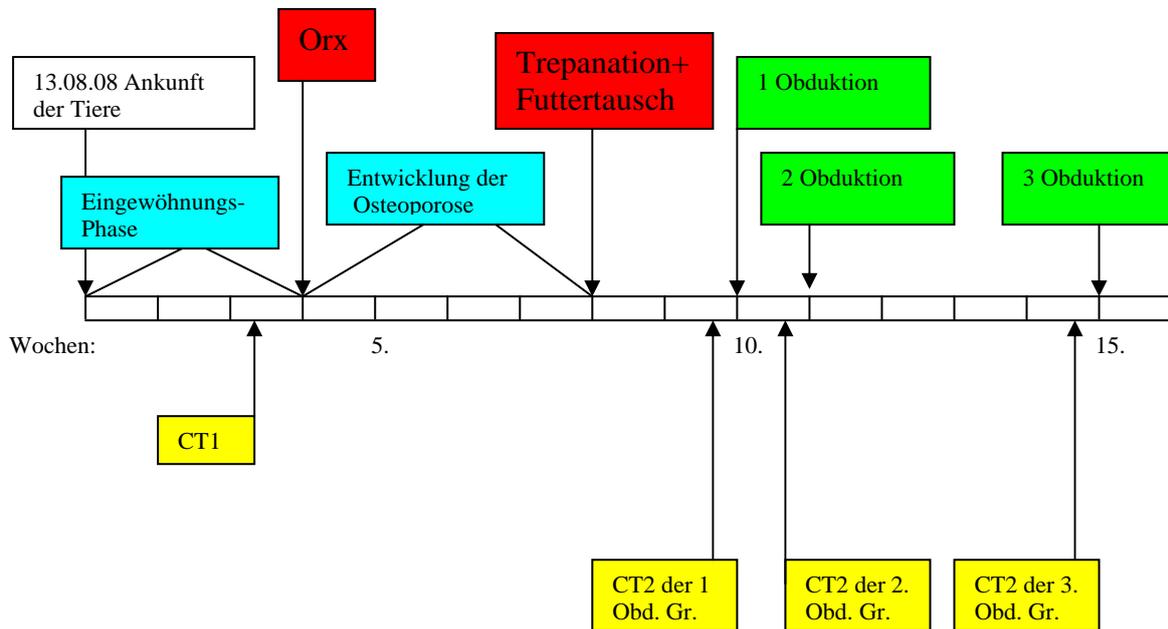


Abb. 2 Zeitlicher Versuchsablauf

Nach Ankunft im Alter von drei Monaten schloss sich eine dreiwöchige Eingewöhnungsphase an. Nach drei Wochen wurde die Tibia der Ratten zum ersten Mal mittels pQCT gemessen. Anschließend erfolgte die subkutane Versorgung mit Transpondern. Um eine Androgenentzugs-Osteoporose zu erzeugen, wurden alle Tiere in Woche vier orchidektomiert.

In den darauf folgenden vier Wochen konnte sich die Osteoporose entwickeln. Danach erfolgten ab Woche sieben die Knochen- Trepanation und der Futtertausch. Die Obduktionen mit den jeweilig vorausgegangenen CT- Messungen waren zwei, drei und acht Wochen nach Trepanation.

2.3 Testsubstanzen

Ab dem Zeitpunkt der Trepanation erfolgte die Applikation der Testsubstanzen. Bis dahin erhielten die Tiere SF Pellet- Futter der Fa. ssniff.

Tab. 3 Applikation der Testsubstanzen

Gruppe	Futterart bis Trepanation	Futterart ab Trepanation (8 Wochen nach Orx)
SF	SF	Phytoöstrogenarmes Futter V1355 ssniff
DHT	SF	Dihydrotestosteronhaltiges Futter (1g/kg)
E2	SF	Östradiolbenzoathaltiges Futter (10mg/kg)
GEN	SF	Genisteinhaltiges Futter (1g/kg)
EQ	SF	Equolhaltiges Futter (400mg/kg)

Reine Substanzaufnahme pro Tier pro Gruppe:

Tab. 4 Durchschnittliche Substanzaufnahme über den gesamten Versuchszeitraum

Gruppe	1. Obd. Gr.	2. Obd. Gr.	3. Obd. Gr.
SF	-	-	-
DHT	883,33 mg	1556,66 mg	5635 mg
E2	5,02 mg	10,60 mg	41,63 mg
GEN	966,66 mg	1600 mg	5425 mg
EQ	440 mg	649,33 mg	2256 mg

Tab. 5 Durchschnittliche Substanzaufnahme pro Tag

Gruppe	1. Obd. Gr.	2. Obd. Gr.	3. Obd. Gr.
SF	-	-	-
DHT	15,77 mg	18,52 mg	20,12 mg
E2	0,11 mg	0,12 mg	0,14 mg
GEN	17,25 mg	19,04 mg	19,37 mg
EQ	7,85 mg	7,72 mg	8,05 mg

2.4 Computertomographie (pQCT)

Mittels eines speziellen vollautomatischen peripheren quantitativen CT-Gerätes (pQCT, STRATEC, Pforzheim), welches extra für Kleintiere entwickelt und nur für diese zugelassen ist (Helterbrand et al. 1997), wurden die Knochenparameter für diesen Versuch erhoben.

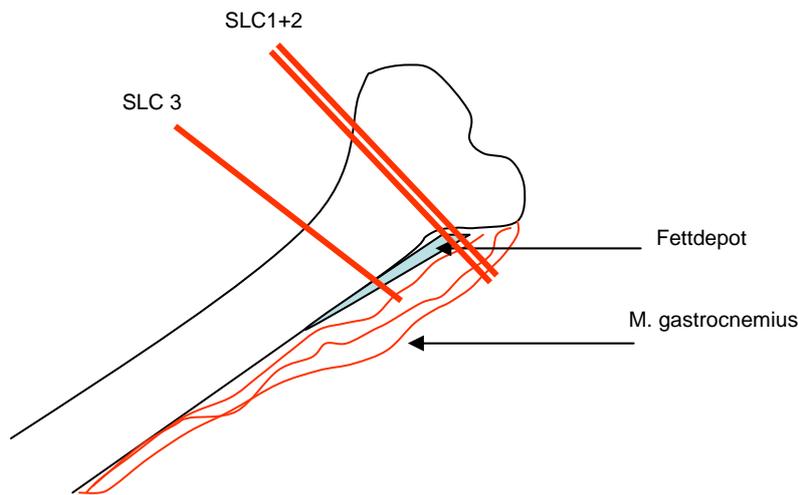


Abb. 3 Verteilung von Muskel- und Fettgewebe an den verschiedenen tibialen Messebenen (eigene Skizze)

2.4.1. Messvorgang und Messprinzip

Über die gerätespezifische Software (pQCT 5.40 Stratec Inc. Pforzheim, Deutschland) ist es möglich, das CT-Gerät zu bedienen und die nach dem Scan gewonnenen Messdaten auszuwerten.

Um Bewegungsartefakte auszuschließen, wurden die Tiere für die gesamte Dauer des Messvorgangs mit einer Isoflurane- Inhalationsnarkose (Forane®, Abbott) narkotisiert. Im Anschluss legten wir die Tiere in Rechtsseitenlage auf den Untersuchungsschlitten. Dort wurde ihr linker Hinterlauf in einen dafür speziell entwickelten Trichter, der am Ende des Untersuchungsschlittens angebracht war, fixiert. Nachfolgend wurde der

Untersuchungsschlitten in den passgenauen CT-Tisch eingeschoben.



Abb. 4 Positionierung der narkotisierten Ratte für die CT- Messung

Die Positionierung erfolgte mittels einer roten Laser-Linie, welche den Strahlenweg beschrieb.

Mit der Durchführung eines Übersichtsscans (SV-Scan) (Abb.5) wurde die Epiphyse der Tibia lokalisiert. Nachdem diese erfasst worden war, wurde manuell der gewünschte Messbereich mittels einer Referenzlinie markiert. Von der Referenzlinie ausgehend führten wir drei Messungen nach distal durch. Zwei waren im Bereich der Metaphyse und eine im Bereich der Diaphyse lokalisiert.

Nach abgeschlossenem Messvorgang waren die Tiere für die Aufwachphase in einem separaten Käfig unter ständiger Beobachtung.

Das Messprinzip des Tomographen stellt eine gefilterte Rückprojektion dar. Hierbei wird ein Absorptionsprofil erstellt. Dieses entsteht durch Absorption von Röntgenstrahlen, deren Strahlengang durch ein Objekt gerichtet ist. Da aus verschiedenen Winkeln geröntgt wird, entstehen viele Absorptionsprofile. Diese werden zu objektgetreuen Querschnittsbildern berechnet. Auf einem Übersichtsscan (SV- Scan) kann der genaue Messort mit Hilfe einer manuell verschiebbaren Referenzlinie bestimmt werden (siehe Abb. 5).

Das zu messende Objekt wird in 1mm dünnen Schichten mäanderförmig gescannt. Hierbei wird das Objekt über einen Winkelbereich von 180° vermessen. Das Messsystem dreht sich

nach jedem Linearscan um 12° im Halbkreis, wobei der Strahlengang 90° zur Knochenachse verläuft. Da der Winkelabstand Detektor- Quelle $1,0^\circ$ beträgt ist es möglich, dass nach 15 Scanpositionen 180 Winkelschnitte für die CT- Bildauswertung zur Verfügung stehen. Es entsteht ein farblich kodiertes digitales Rasterbild. Je nach Dichte und Mineralgehalt kommen verschiedene Gewebe unterschiedlich hell zur Darstellung (siehe Abb. 5).

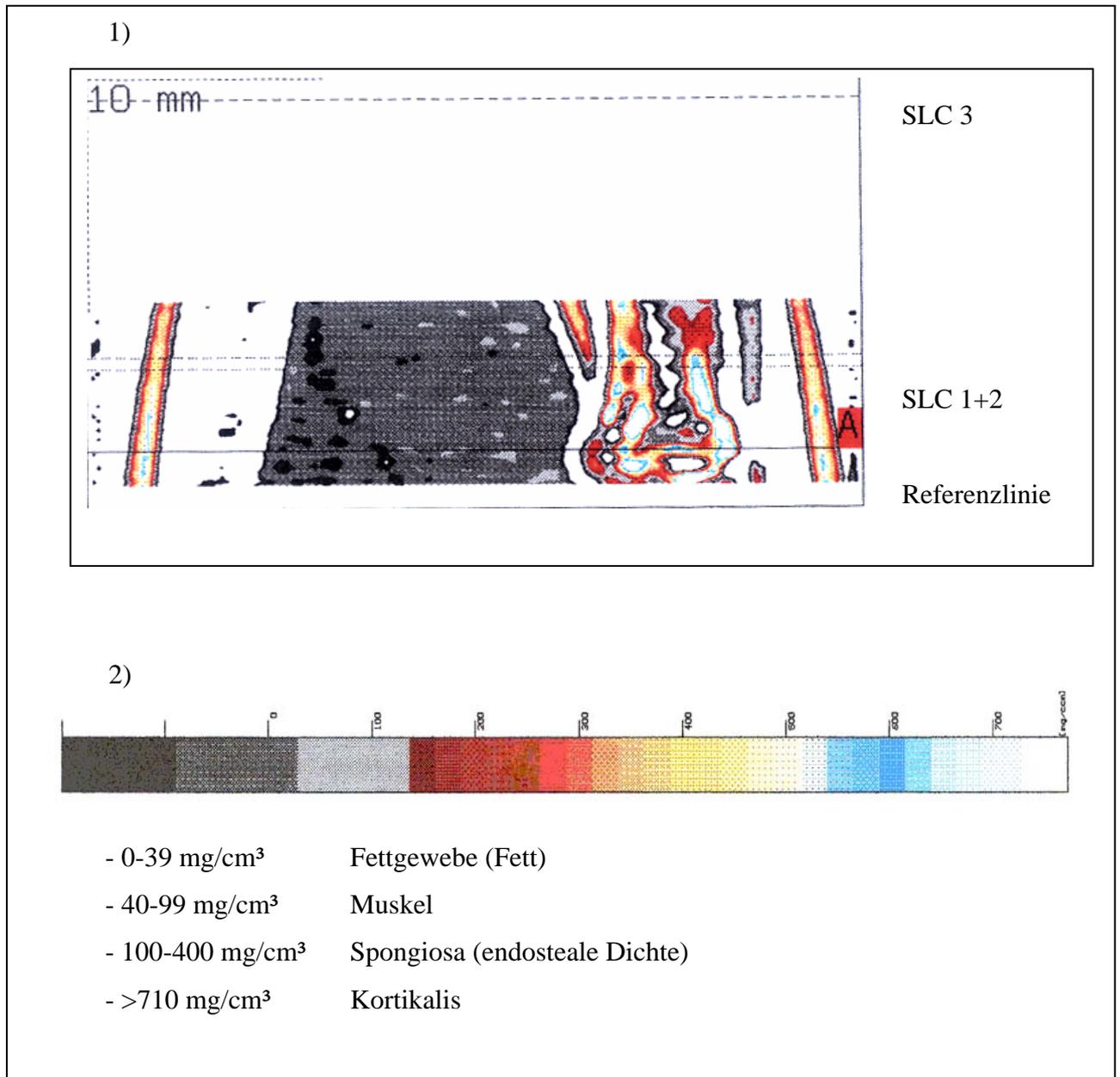


Abb. 5 1. Übersichtsscan. Im Abstand von 3,75mm, 4,25mm und 15mm von der Referenzlinie entfernt erfolgen drei Messebenen (pQCT-Ausdruck); (SLC = Slice bzw. Schichtebene). 2. Dichtescala der erfassten Strukturen

Die gewonnenen Messdaten werden im Computer ausgewertet, wobei im ersten Schritt zwischen Knochen und Weichteilgewebe differenziert wird. Der Grenzwert für die Knochendichte ist hier auf $280\text{mg}/\text{cm}^3$ festgelegt. Im zweiten Schritt wird mit einem Grenzwert von $400\text{mg}/\text{cm}^3$ der Knochen in Spongiosa und Kortikalis unterteilt. Zusätzlich können noch weitere Parameter des Knochens und des umliegenden Gewebes wie z.B. das Widerstandsmoment und paratibiales Fettdepot bestimmt werden.

2.5 Orchidektomie (Orx)

Unter Inhalationsnarkose mit Isoflurane werden die Hoden aufgesucht. Nachfolgend wurde die Skrotalhaut direkt über dem getasteten Hoden medial inzidiert und das darunter liegende viszerale Peritoneum durchtrennt. Nach Freipräparation des Hodens wurde der Duktus Epididymis und dessen Blutversorgung ligiert und abgetrennt.

Die kontralaterale Seite wurde in gleicher Weise operiert. Nachdem die Blutstillung abgeschlossen war, erfolgte der Verschluss aller eröffneten Strukturen mit sterilem Nahtmaterial.

Zur postoperativen Schmerztherapie verabreichte man den Tieren s.c. Rimadyl® (Fa-Pfizer).

2.6 Trepanation

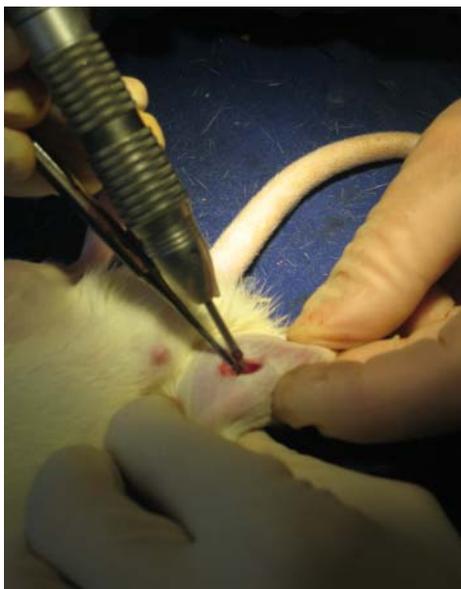


Abb. 6 Trepanation der Metaphyse

Vier Wochen nach Orx wurden die Tiere unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. med. G. Wiese (Abt. für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie) trepaniert.

Die Anästhesie erfolgte mit Isoflurane. Zur Analgesie wurden 0,1 ml pro 500 g Körpergewicht Metacam (Fa. Boeringer) s.c. verabreicht. Zur perioperativen Infektionsprophylaxe wurden bei Trepanations-Vorbereitung 0,1 ml/kg Körpergewicht Amoxicillin (Fa. Hostamox) i.m. appliziert.

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

Unter sterilen Bedingungen wurde 3 mm unterhalb des Kniegelenks auf der Vorderkante der Tibia eine ca. 8- 10 mm lange Haut- und Periostinzision mit einem 15er Skalpell vorgenommen. Mit Hilfe eines Raspatoriums nach Partsch konnte nun die mediale Knochenfläche der Tibia freipräpariert werden. Im nachfolgenden Schritt wurde mit einem Knochenbohrer (1,5 mm Durchmesser) ein Bohrloch durch die gesamte Metaphyse angelegt. Während des Bohrens erfolgte ein ständiges Spülen und Kühlen mittels isotoner NaCl-Lösung. Abschließend wurde die Hautwunde einschichtig mit einem 4-0 monophilen Kunststofffaden verschlossen und die Haut nochmals mit Kodan® (Schülke & Mayr) desinfiziert.

Am ersten und zweiten Tag nach der Operation erhielten die Tiere zur Schmerzprophylaxe 0,2 ml Metacam® s.c. (Fa. Boeringer).

Um nach der Obduktion das gewonnene Knochenmaterial fluoreszenzmikroskopisch auswerten zu können, wurden den Tieren in Isoflurane- Narkose folgende Substanzen verabreicht:

Sieben Tage nach Orx Tetrazyklinhydrochlorid 95% (Sigma) (25mg/kg KG in 0,9% NaCl) und sieben Tage nach der Trepanation Alizarin- Komplexon (Merk) (30 mg/kg in Aqua. Dest.+ NaOH auf pH 7,2).

Abbildung 7 zeigt den Bohrkanal auf einem CT-Schnittbild und beschreibt zusätzlich noch andere wichtige anatomische Strukturen:

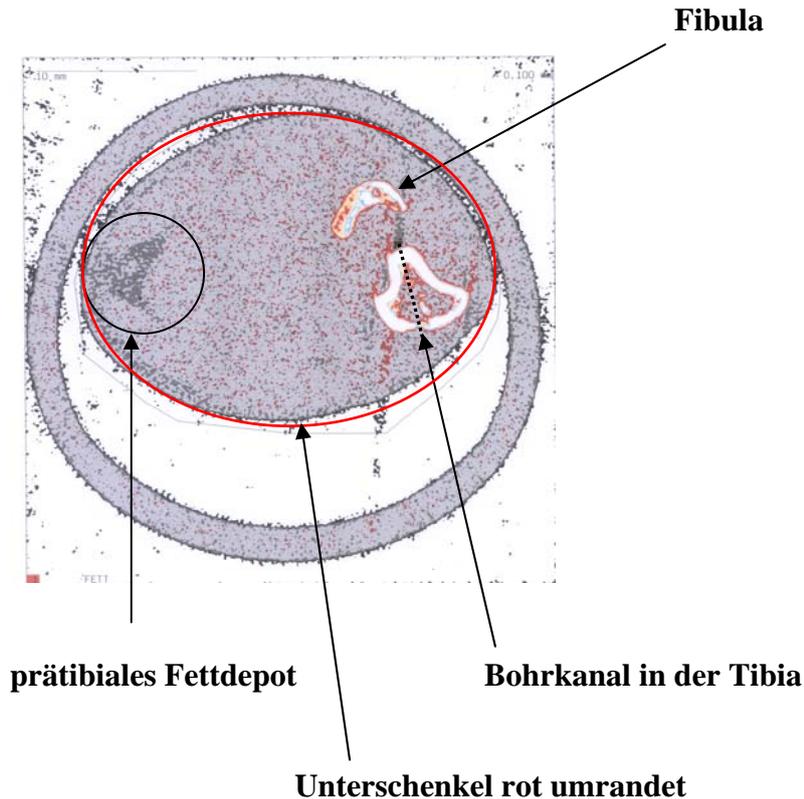


Abb. 7 Darstellung eines Trepanationskanals in der Tibia zwei Wochen nach durchgeführter Trepanation

2.7 Identifikation der Tiere

Die zweifelsfreie Identifikation der verschiedenen Tiere ermöglicht ein Transponder-UNO MIKRO-ID-System (ISO-Transponder 12mm Uno-Roesvastaal BV, Zevenaar, Holland). Dieses wurde unter Inhalationsnarkose subkutan in die Nackenhaut implantiert. Mit Hilfe eines tragbaren Lesegerätes (Gesreader II Ge S008: ISO kompatibler Taschenleser) kann der Zahlencode abgerufen werden.

2.8. Tötung der Ratten und Serumanalyse

Im zeitlichen Abstand von zwei, drei und acht Wochen nach Trepanation wurden die jeweiligen Obduktionsgruppen bestehend aus 60 Tieren in CO₂-Narkose dekapitiert. Um Schwankungen der Messwerte aufgrund der zirkadianen Rhythmik zu minimieren, wurde die Obduktion zwischen 8.00 und 13.00 Uhr durchgeführt.

Bei der Obduktion waren neben ca. 20 ml Blut, welches direkt nach Dekapitation in ein mit Heparin präpariertes Reagenzglas aufgefangen wurde, neben anderen diversen Organen auch noch die linke Tibia, die rechte Tibia- Metaphyse und der Musculus paratibialis posterior gewonnen. Diese wurden entweder in flüssigem Stickstoff oder für histologische Untersuchungen in 10%igem Formaldehyd konserviert. Vor der Konservierung wurde die linke Tibia mit Hilfe eines digitalen Mess- Schiebers (TCM- Hamburg Deutschland) vermessen.

Aus dem gewonnenen Blut wurden die Osteokalzinwerte durch das Elecsys-System (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) und die Serum Cross-(Rat-) Laps mit ELISA (Osteometer, Bio Tech AIS, Dänemark) ermittelt.

2.9. Statistische Auswertung

Mit dem Computerprogramm EXCEL (Microsoft Windows XP-Paket) wurden die Daten katalogisiert und prozentrelativ berechnet. Zur Erstellung von Graphen und zur Berechnung der Signifikanz (Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt) wurden die Daten in das Programm PRISM (GraphPad Software, Inc. San Diego, California, USA) eingefügt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch die Anwendung des t-Tests nach Dunnett. In den Abbildungen und Tabellen werden die Mittelwerte und Standardabweichung des arithmetischen Mittelwerts (SEM) dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Futtermittelverbrauch

Abbildung 8 zeigt für die einzelnen Gruppen den Verlauf der Futteraufnahme über den gesamten Versuchszeitraum.

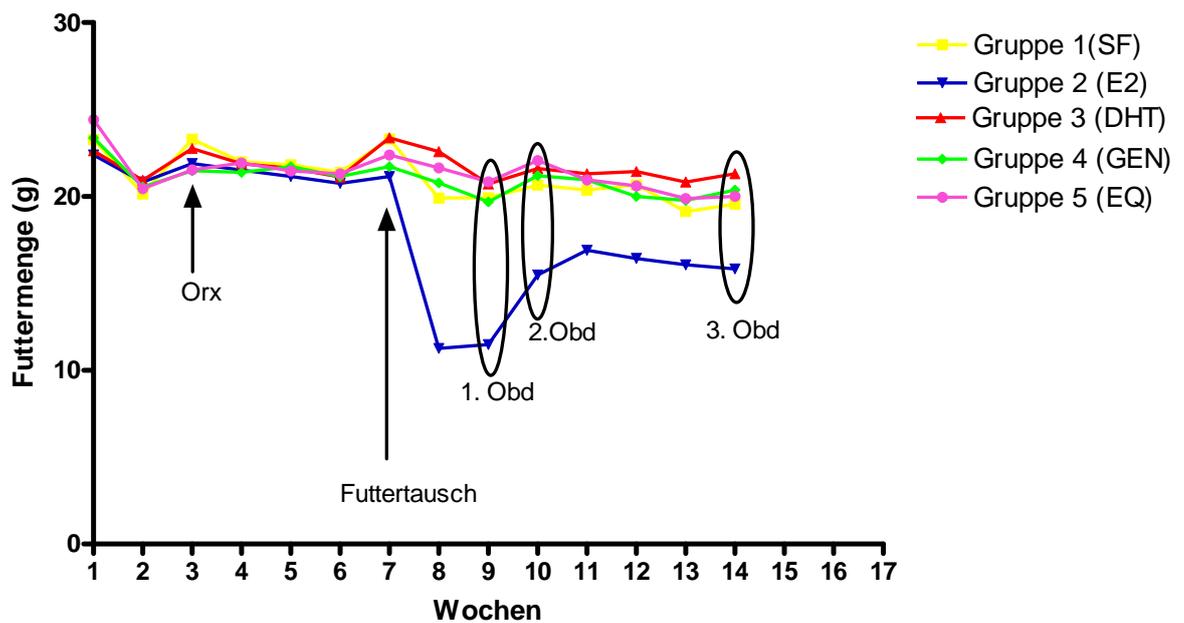


Abb. 8 Futteraufnahme der einzelnen Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum

In der siebten Woche gleich nach Trepanation tauschten wir das Futter gegen wirkstoffhaltige Nahrung. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden die Tiere mit SF Futter ernährt. Mit einer geringfügigen Steigerung der Futteraufnahme nach Orx von 20,57g auf 22,19g lag der durchschnittliche Tagesverbrauch aller Gruppen bis dahin bei 21,82g pro Tier/Tag.

Kurz nach Futtermitteltausch zeigten sich in fast allen Gruppen leichte Schwankungen des Fressverhaltens. In der nachfolgenden Woche stellten sich diese aber schon auf einen Durchschnittsverbrauch von 20,66g pro Tier/Tag ein. Getrennt von diesem Wert muss die unterdurchschnittliche Verlaufskurve der E2-Gruppe betrachtet werden. Dort fiel die Futteraufnahme von 21,15g auf 11,25g ab. Im weiteren Verlauf steigerten die E2-Tiere ihr Fressverhalten und pendelten sich ab der 11. Woche bei durchschnittlich 16,30g ein.

Bei der DHT- und der SF-Gruppe zeigte sich direkt nach Futtertausch ein Anstieg von durchschnittlich 21g auf über 23g pro Tier/Tag, der sich aber schon in der darauf folgenden Woche dem allgemeinen Futterverbrauch anpasste.

In Tabelle 6 werden für jede Gruppe die durchschnittlichen Werte der Futteraufnahme vor und nach Futtertausch verglichen und die täglich aufgenommenen Substanzmengen gezeigt.

Tab. 6 Futteraufnahme vor und nach Futtertausch und durchschnittlich aufgenommene Substanzmenge

Gruppe	Durchschnittliche Futteraufnahme vor Futtertausch pro Tier/Tag in g	Dosierung der gefütterten Substanzen in g/kg Futter	Durchschnittliche Futteraufnahme nach Futtertausch pro Tier/Tag in g	Durchschnittlich aufgenommene Substanzmenge nach Futtertausch pro Tier/Tag in mg
SF	22,17 (SF)		19,96	
DHT	22,04 (SF)	1,0	21,31	18,13
E2	21,38 (SF)	0,01	14,97	0,12
GEN	21,62 (SF)	1	20,02	18,55
EQ	21,92 (SF)	0,4	20,52	7,87

3.2 Körpergewicht

Während des Versuchszeitraums wurden die Körpergewichte zu bestimmten Zeitpunkten erhoben. In Abb. 9 ist die Gewichtsentwicklung aller Tiergruppen über den gesamten Versuchszeitraum dargestellt.

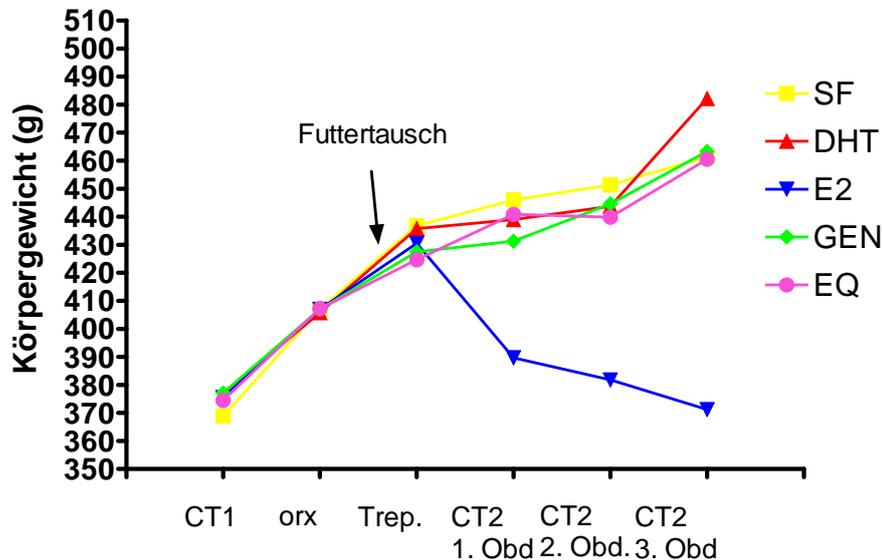


Abb. 9 Gewichtsentwicklung der Tiergruppen über den Versuchszeitraum

Zu Versuchsbeginn lag das durchschnittliche Körpergewicht bei 374,61g. Bis zum Futtertausch wurden die Tiere mit soja- und substanzfreiem Pelletfutter ernährt. Darunter verlief die Gewichtsentwicklung unauffällig. Zum Zeitpunkt der Trepanation lag das Körpergewicht aller Obduktionsgruppen ohne signifikante Schwankungen bei durchschnittlich 431,02g.

Vor Obduktion wurde das Körpergewicht ermittelt. Somit konnte die Gewichtsentwicklung im Verlauf von zwei, drei und acht Wochen nach Futtertausch dargestellt werden. Folgende gruppenspezifische Gewichtsänderungen ergaben sich nach Futtertausch:

Bei den E2-Tieren kam es zur stärksten Gewichtsabnahme. Das zum Zeitpunkt der Trepanation gemessene Körpergewicht von durchschnittlich 430,53g war dort bei der ersten Obduktionsgruppe auf 389,65g, bei der zweiten auf 381,83 und bei der dritten auf 371,21g abgesunken, was einem durchschnittlichen Abfall von 49,63g entspricht. Es zeigte sich also eine kontinuierliche Gewichtsabnahme ab Futtertausch, die jedoch das Ausgangsgewicht von 375,49g nur unwesentlich unterschritten hatte und somit keine Gefährdung für die Gesundheit der Tiere darstellte.

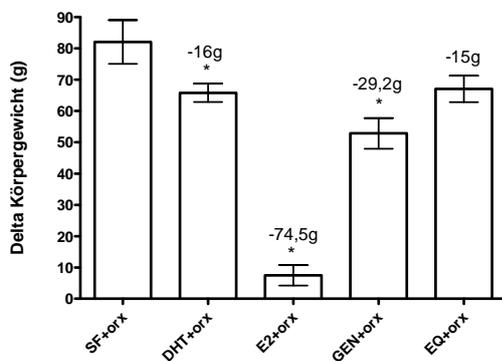
Die größte Gewichtszunahme war bei der DHT-Gruppe zu sehen. Das Durchschnittsgewicht von 435,73g bei Trepanation steigerte sich innerhalb von acht Wochen auf einen Höchstwert von 482,21g.

Das Körpergewicht der SF-, EQ- und GEN-Tiere nahm ab Trepanation um durchschnittlich 30g zu.

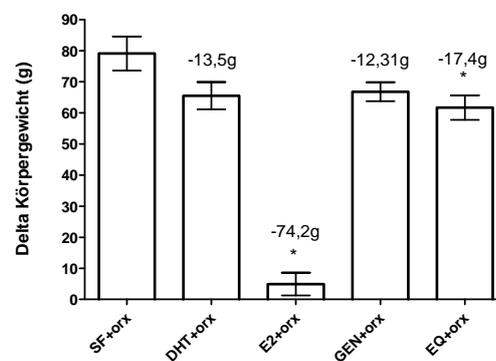
3.3 Die Körpergewichtsdifferenzen der einzelnen Gruppen

Im Folgenden sind die Körpergewichtsdifferenzen der einzelnen Gruppen graphisch als Delta Körpergewicht dargestellt.

a)



b)



c)

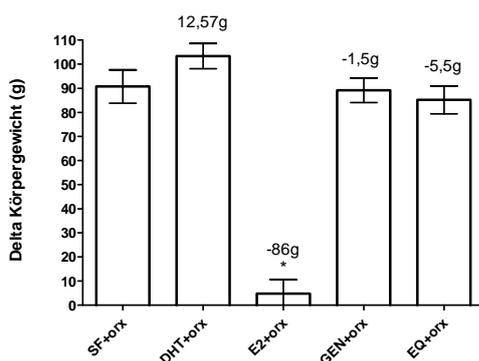


Abb. 10 Delta Körpergewicht 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch;

die Zahlenangaben über den Säulen geben die Zu- oder Abnahme der Werte gegen SF+ orx an; (*p<0,05 versus SF+ orx)

Deutlich zeigte hierbei die meiste Gewichtszunahme bei der DHT-Gruppe. Die E2-Gruppe zeigte im Verlauf signifikant die geringste Gewichtszunahme und lag acht Wochen nach Trepanation 86 g unter der orx+ SF Gruppe.

3.4 Muskelfläche des Unterschenkels

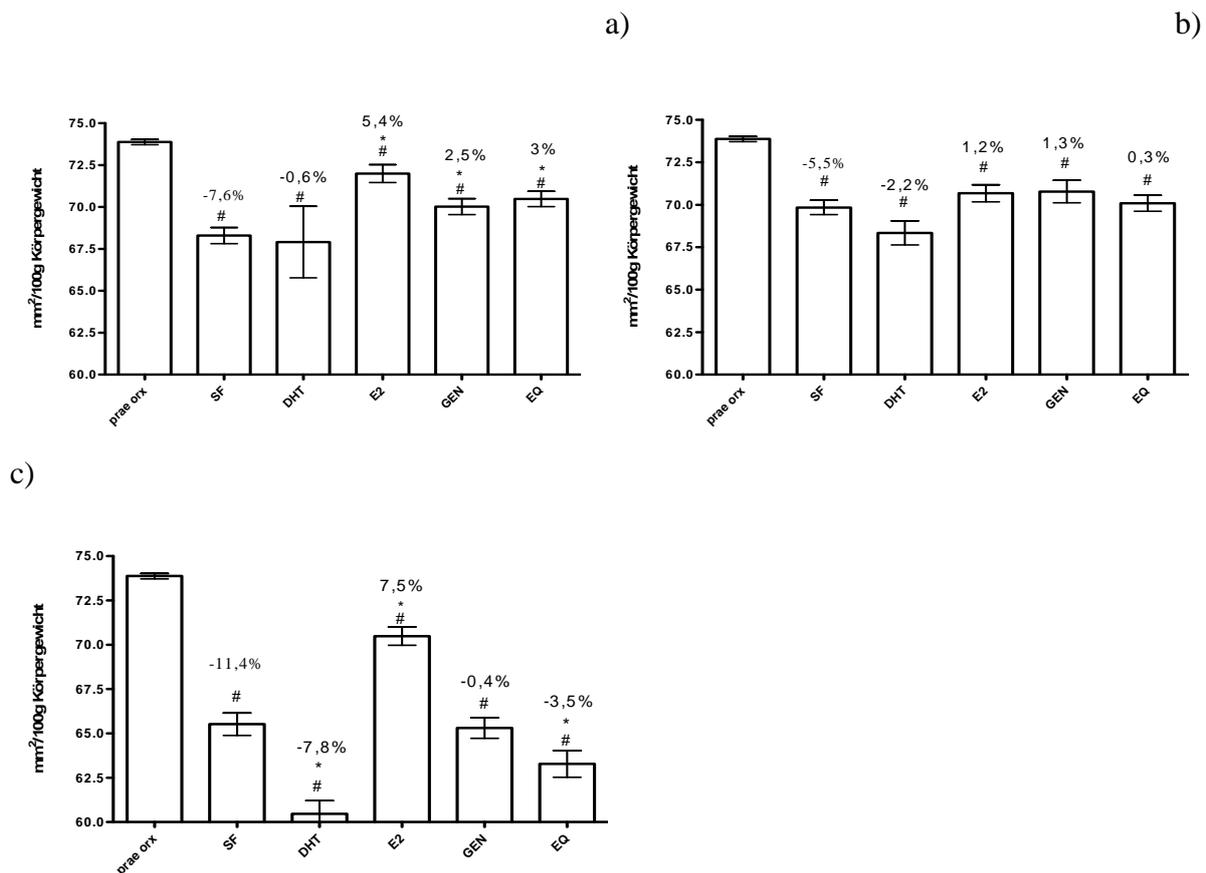


Abb. 11 Veränderung der Muskelfläche des Unterschenkels 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch; die Zahlenangaben über den Säulen geben die Zu- oder Abnahme der Werte gegen prae orx an; (* $p < 0,05$ versus SF; # $p < 0,05$ versus prae orx)

Nach Quantifizierung der tibialen Muskelfläche mittels pQCT kann der Körpergewicht-bezogene Muskelindex in $\text{mm}^2/100\text{g}$ Körpergewicht berechnet werden.

Durch die Orx kam es in allen Gruppen zu einem Abfall der Muskelfläche. Verglichen zu den anderen Gruppen fiel die Muskelmasse bei der DHT-Gruppe am stärksten ab. Der größte Muskelaufbau zeigte sich bei den E2-Tieren. Die Werte der beiden Phytoöstrogen- Gruppen sanken bei Versuchende unter die der Kontrollgruppe.

3.5 Fettanteil am Unterschenkel

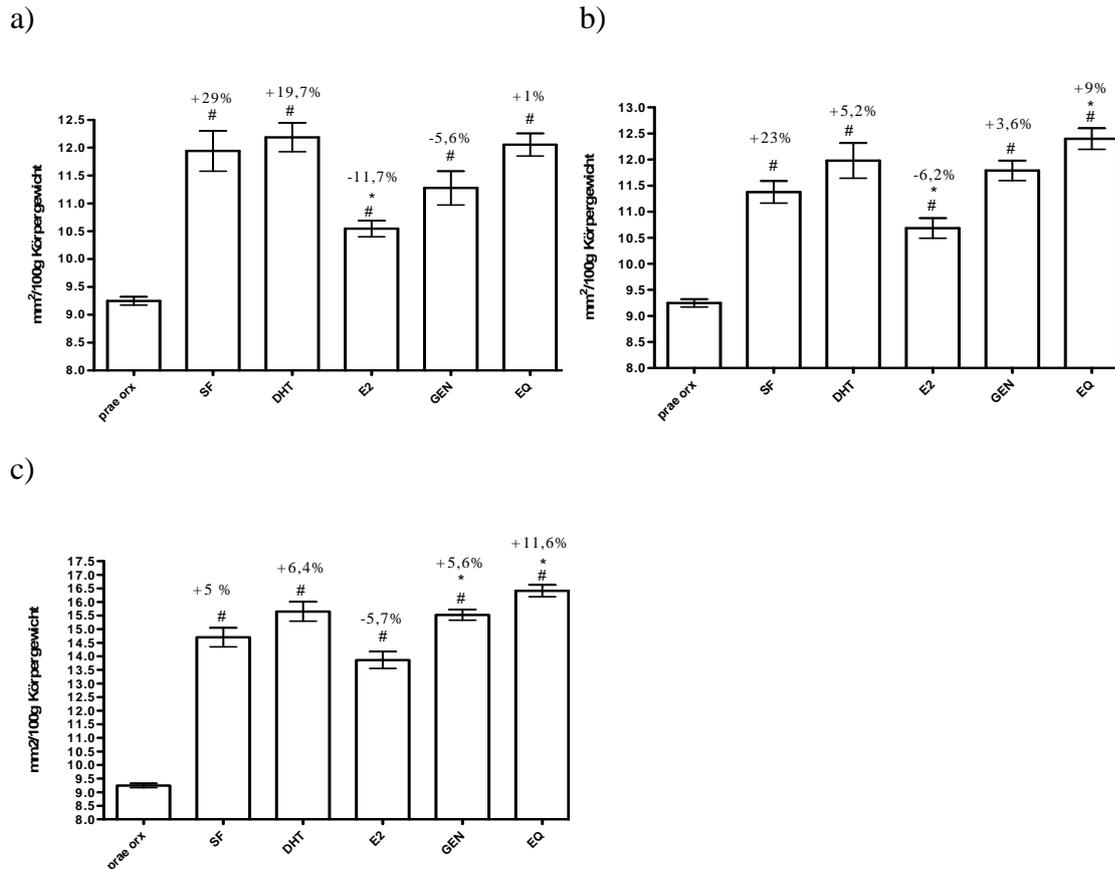


Abb. 12 Veränderung des paratibialen Fettanteils 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch; die Zahlenangaben über den Säulen geben die Zu- oder Abnahme der Werte gegen prae orx an; (* $p < 0,05$ versus SF; # $p < 0,05$ versus prae orx)

Nach Quantifizierung des paratibialen Fettdepots mittels pQCT kann der Körpergewicht-bezogene Fettindex in $\text{mm}^2/100\text{g}$ Körpergewicht berechnet werden.

Durch die Hodenentfernung kam es in allen Obduktionsgruppen zu einer signifikanten Zunahme des Fettdepots am Unterschenkel. Nach zwei Wochen zeigte sich bei der DHT-Gruppe mit fast 20% über der Kontrollgruppe die stärkste Fettzunahme. Diese glich sich aber im weiteren Verlauf den mit Phytoöstrogenen behandelten Gruppen an, bei denen EQ über den Versuchsverlauf die stärkste Fettzunahme hatte.

Den geringsten Fettzuwachs zeigte die E2-Gruppe. Dieser lag zwei Wochen nach Trepanation mit fast 12% am weitesten unter dem der Kontrollgruppe.

3.6 Knochenparameter

In diesem Kapitel werden die Veränderungen der wichtigsten Knochen-Parameter vorgestellt. Repräsentative pQCT-Bilder zu den einzelnen Gruppen sind im Bildanhang (Abb. 28- 32).

3.6.1 Ergebnisse der CT- Messung

Die Graphen beschreiben die Veränderungen zwischen den ersten und zweiten CT-Messungen. Die Veränderungen der Knochenparameter wurden zwei, drei und acht Wochen nach Trepanation und Futtertausch im 2. CT vor Obduktion erhoben.

Der jeweilig linke Balken zeigt die Ausgangswerte der ersten CT Messung. Die Balken zwei bis sechs stellen die für jede Stoffgruppe spezifischen CT2 Werte dar. Für einen streuungsärmeren Vergleich zwischen den CT1- und CT2-Werten ist im linken Balken jeweils der Mittelwert der CT1-Messungen aller drei Obduktionsgruppen enthalten.

Folgende Parameter werden der Reihe nach vorgestellt:

1. -Spongiosadichte
2. -endostale Fläche
3. -Kortikalisdichte der Metaphyse
4. -Kortikalisfläche der Metaphyse
5. -Widerstandsmoment der Metaphyse
6. -Periostaler Umfang
7. -Endostaler Umfang.

3.6.1.1 Spongiosadichte:

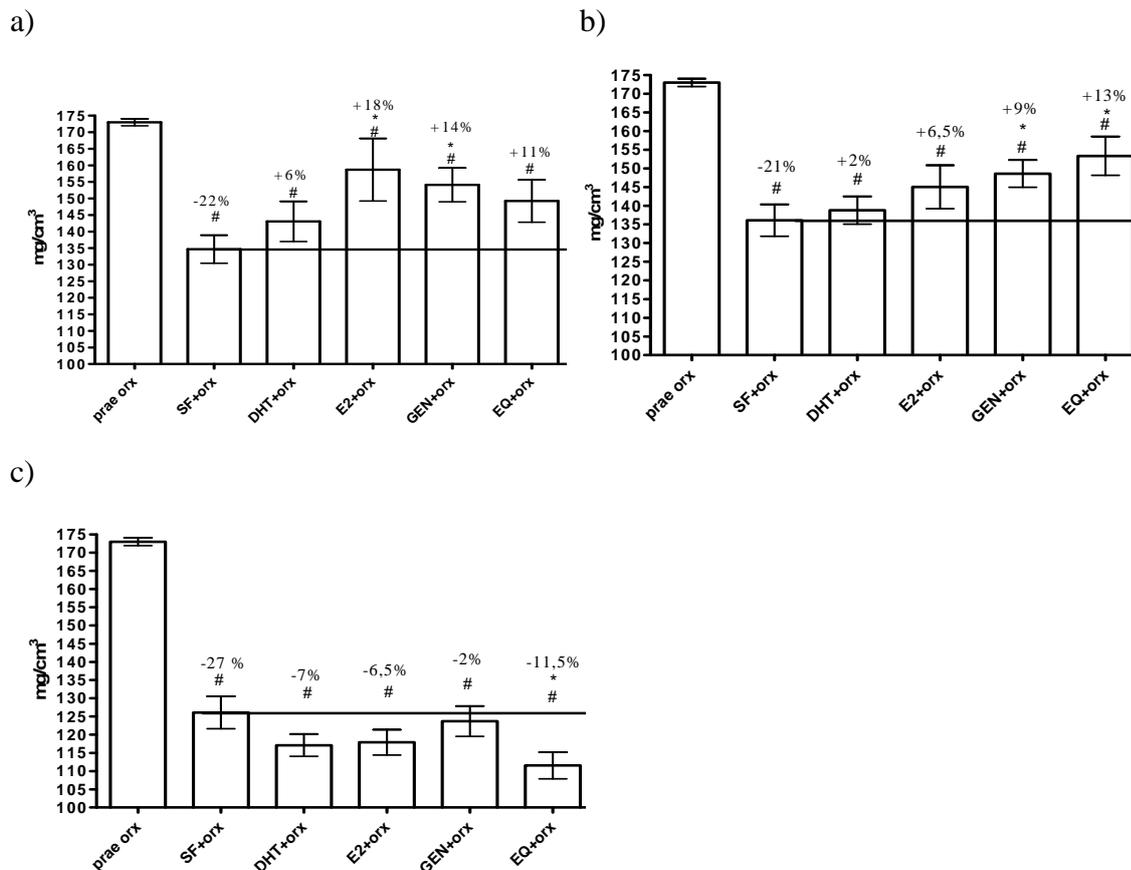


Abb. 13 Veränderungen der Spongiosadichte 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch; die Zahlenangaben über der Säule SF+ orx geben die Zu- oder Abnahme der Werte gegen prae orx an; die Zahlenangaben über den Säulen DHT+ orx bis EQ+ orx geben die Zu- oder Abnahme gegen SF+ orx an; (* $p < 0,05$ versus SF+ orx; # $p < 0,05$ versus prae orx)

Bei allen drei Obduktionsgruppen fielen die CT2-Werte im Vergleich zu den aus CT1 gewonnenen prae orx Werten signifikant ab.

Betrachtet man die SF+ orx Gruppe im Vergleich mit den prae orx Werten isoliert, so zeigte sich im Verlauf von acht Wochen ein signifikanter Verlust an Spongiosa, der 27% betrug.

Die Werte der DHT+ orx Gruppe fielen über den Versuchsverlauf ab und lagen nach acht Wochen 7% unter denen der Kontrollgruppe.

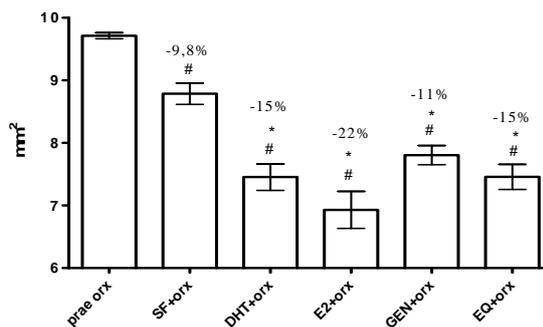
Bis Versuchende sanken auch die Werte der E2-Gruppe um 6,5% unter die der SF+ orx Gruppe ab.

Die Gen-Gruppe zeigte nach acht Wochen Werte, die um 2% mehr als die der SF+ orx Gruppe gesunken waren.

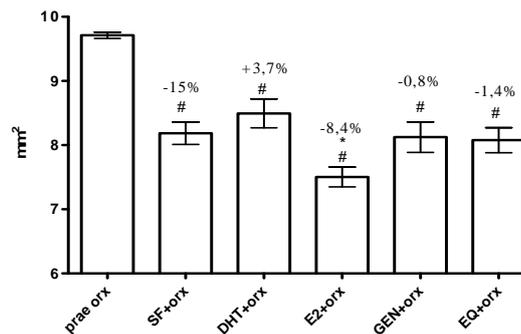
Bis 11,5% unter die SF+orx Gruppe fielen auch die Werte der EQ-Gruppe über den Versuchszeitraum ab.

3.6.1.2 Endostale Fläche

a)



b)



c)

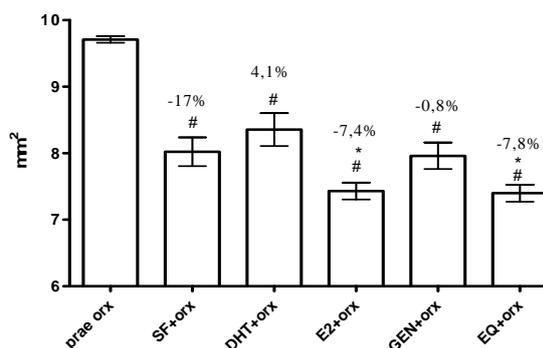


Abb. 14 Veränderung der endostalen Fläche 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch; die Zahlenangaben über der Säule SF+ orx geben die Zu- oder Abnahme der Werte gegen prae orx an; die Zahlenangaben über den Säulen DHT+ orx bis EQ+ orx geben die Zu- oder Abnahme gegen SF+ orx an; (* $p < 0,05$ versus SF+ orx; # $p < 0,05$ versus prae orx)

Im Vergleich zu den prae orx Werten zeigten die anderen Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum einen Abfall.

Vergleicht man die SF+ orx- Gruppe mit den prae orx Werten zeigte sich ein statistisch signifikanter Verlust über acht Wochen um 17%.

Die DHT-Gruppe konnte mit $8,35 \text{ mm}^2$ am meisten endostale Fläche aufbauen. Diese lagen acht Wochen nach Trepanation 12,9% unter denen der prae orx Tiere.

Die Werte der E2 Gruppe waren über alle drei Messungen signifikant niedriger als die Negativkontrolle und lagen nach acht Wochen mit 7,4% unter ihr.

Die GEN-Gruppe zeigt nahezu keinen Aufbau der endostalen Fläche. Über den Versuchszeitraum von acht Wochen besaß sie einen gleich bleibenden Wert von 7,96 mm².

Mit einer endostalen Fläche von 7,40 mm² nach acht Wochen hatte die EQ-Gruppe die geringste Zunahme.

3.6.1.3 Kortikalisdichte der Metaphyse

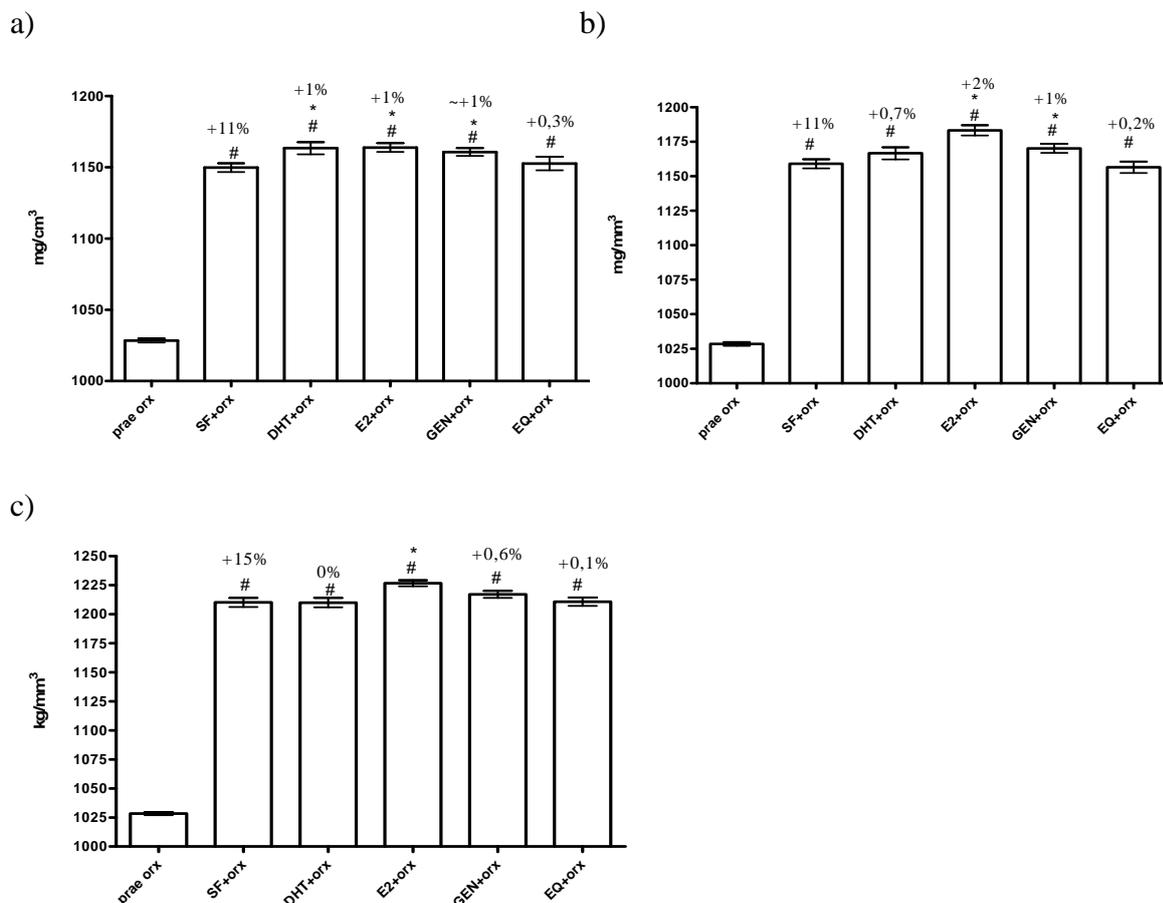


Abb. 15 Veränderung der metaphysären Kortikalisdichte 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch; die Zahlenangaben über der Säule SF+ orx geben die Zu- oder Abnahme der Werte gegen prae orx an; die Zahlenangaben über den Säulen DHT+ orx bis EQ+ orx geben die Zu- oder Abnahme gegen SF+ orx an; (* p<0,05 versus SF+ orx; # p<0,05 versus prae orx)

Verglichen zu den prae orx Werten zeigte sich in allen drei Abbildungen eine konstante Zunahme der metaphysären Kortikalisdichte. 15% nahm der Wert der Kontrollgruppe nach

acht Wochen zu. Auffallend über den Versuchszeitraum zeigte sich die Entwicklung der E2-Werte. Diese nahmen signifikant zu und lagen nach acht Wochen 1,4% über der Kontrollgruppe. Auch die Gen- Werte steigerten sich über den Versuchszeitraum. Erwähnt werden muss auch die bis zur dritten Woche anhaltende Steigerung der Gen-Werte. Diese lagen bis zwei Wochen nach Trepanation 1% über den Werten der Kontrollgruppe, was signifikant war.

3.6.1.4 Kortikalisfläche der Metaphyse

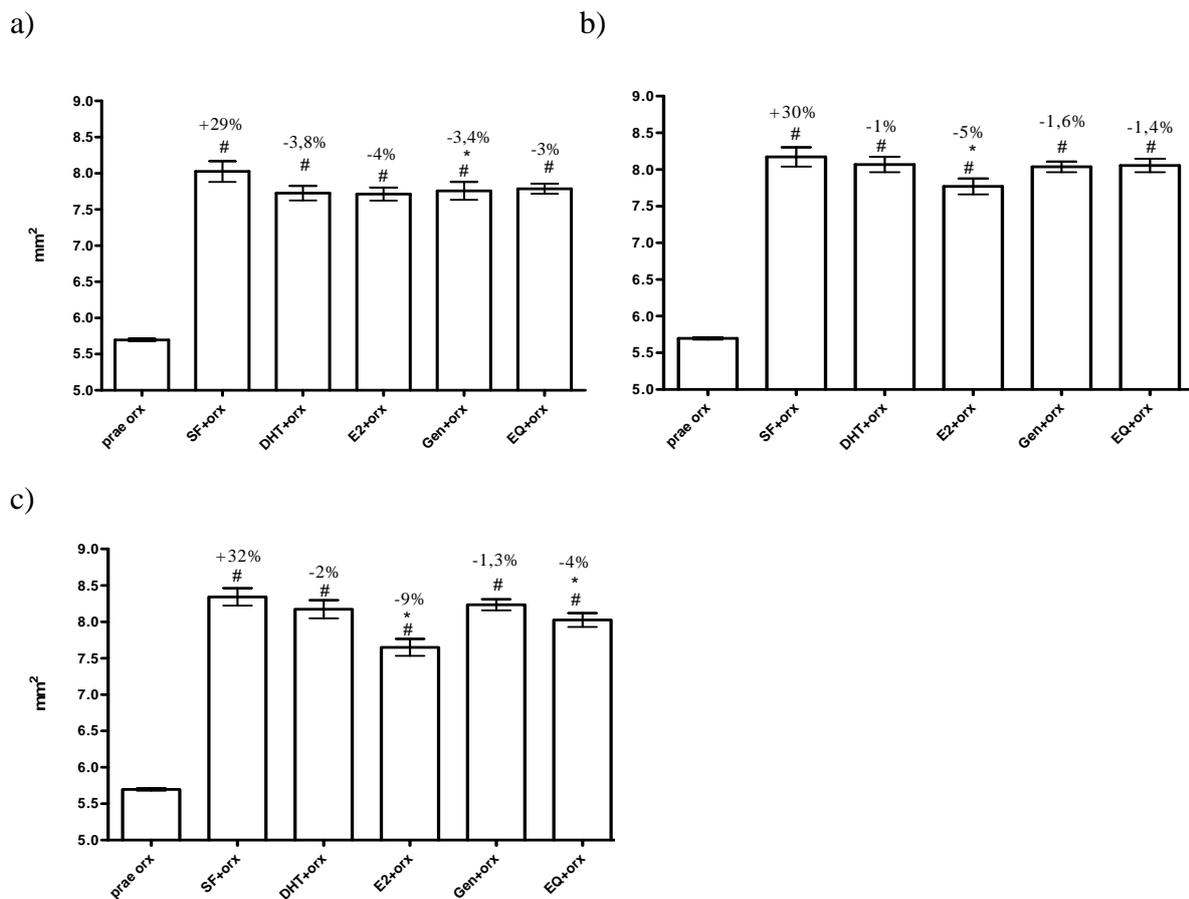


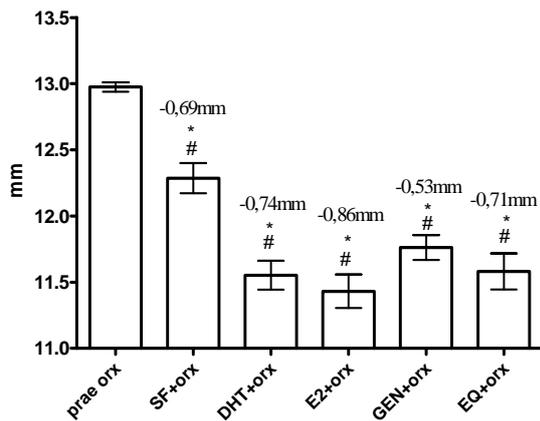
Abb. 16 Veränderung der Kortikalisfläche 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch; die Zahlenangaben über der Säule SF+ orx geben die Zu- oder Abnahme der Werte gegen prae orx an; die Zahlenangaben über den Säulen DHT+ orx bis EQ+ orx geben die Zu- oder Abnahme gegen SF+ orx an; (* $p < 0,05$ versus SF+ orx; # $p < 0,05$ versus prae orx)

Verglichen mit den prae orx Werten aus CT1 zeigte sich bei allen Substanzgruppen zu jedem Zeitpunkt eine signifikante Zunahme der Kortikalisfläche. Auffällig war die Entwicklung der

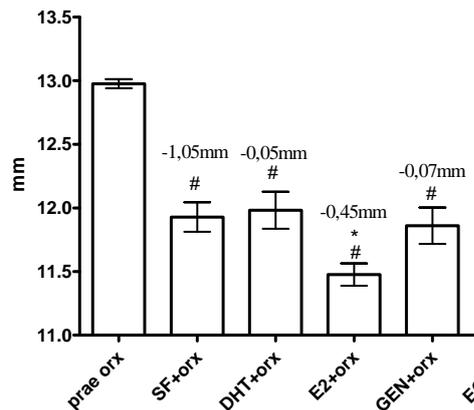
E2-Gruppe. Hier konnte man einen Abfall auf 9% unter die Kontrollgruppe nach acht Versuchswochen beobachten.

3.6.1.5 Endostaler Umfang

a)



b)



c)

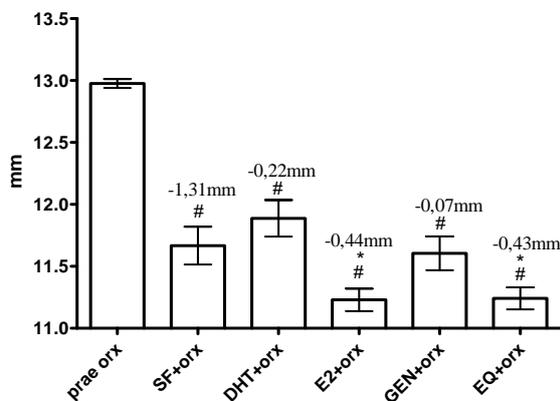


Abb. 17 Veränderung des endostalen Umfangs 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch; die Zahlenangaben über der Säule SF+ orx geben die Zu- oder Abnahme der Werte gegen prae orx an; die Zahlenangaben über den Säulen DHT+ orx bis EQ+ orx geben die Zu- oder Abnahme gegen SF+ orx an; (* $p < 0,05$ versus SF+ orx; # $p < 0,05$ versus prae orx)

Verglichen mit den prae orx Werten zeigte sich in allen Gruppen eine kontinuierliche Abnahme des endostalen Umfangs. Die größte Abnahme findet sich bei den E2-Tieren, die nach acht Versuchswochen um 0,44mm unter der Kontrollgruppe liegen. Weiterhin fallen am Ende der Versuchszeit auch noch die EQ-Werte mit -0,43mm unter der Kontrolle auf. Der tendenziell größte endostale Umfang findet sich bei den DHT-Tieren.

3.6.1.6 Periostaler Umfang

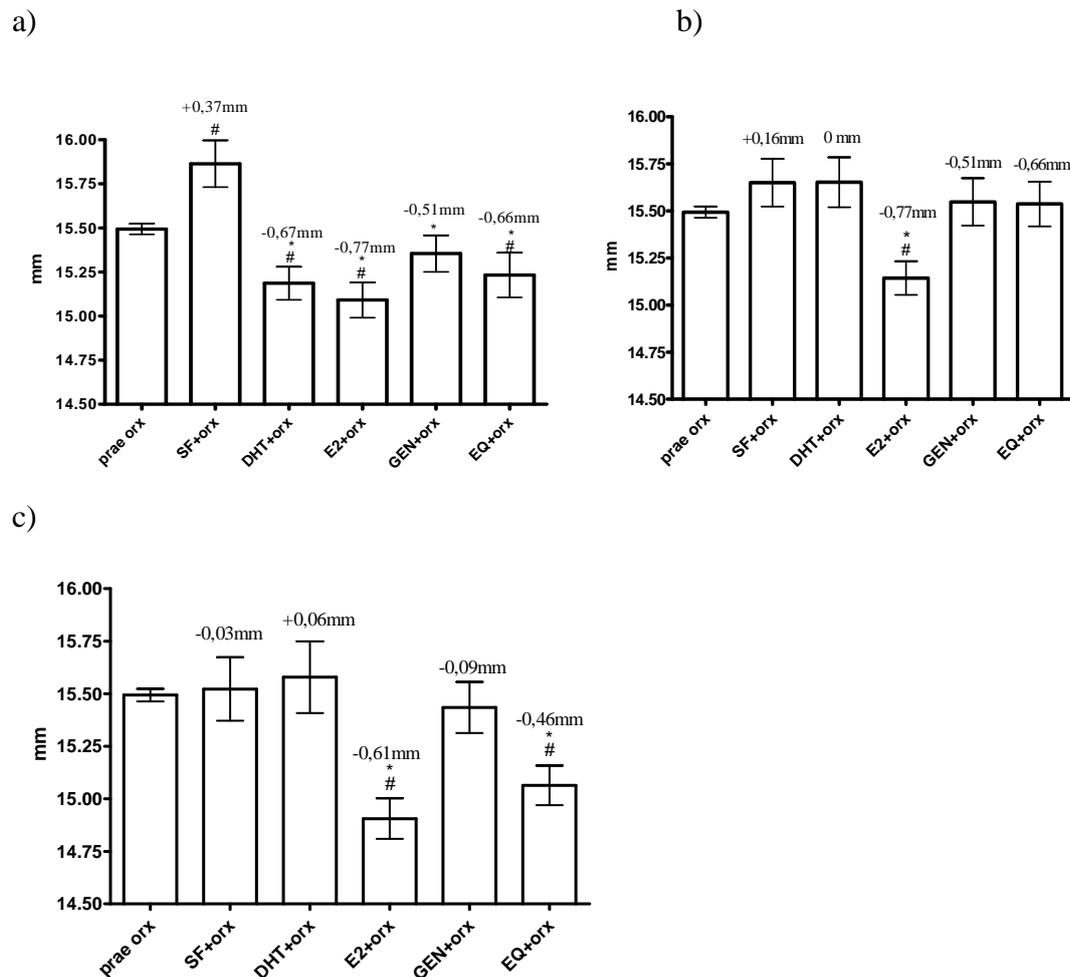


Abb. 18 Veränderung des periostalen Umfangs 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch; die Zahlenangaben über der Säule SF+ orx geben die Zu- oder Abnahme der Werte gegen prae orx an; die Zahlenangaben über den Säulen DHT+ orx bis EQ+ orx geben die Zu- oder Abnahme gegen SF+ orx an; (* $p < 0,05$ versus SF+ orx; # $p < 0,05$ versus prae orx)

Die stärksten Veränderungen des periostalen Umfangs finden sich bei den Werten der E2- und EQ- Gruppe. E2 liegt zu Versuchende signifikant 0,61mm unterhalb der Kontrolle und zeigte damit die kontinuierlich stärkste Abnahme. Weiterhin fallen nach acht Wochen ebenfalls die Werte der EQ-Tiere ins Auge, die 0,46mm unterhalb der Kontrolle liegen.

3.6.1.7 Widerstandsmoment der Metaphyse

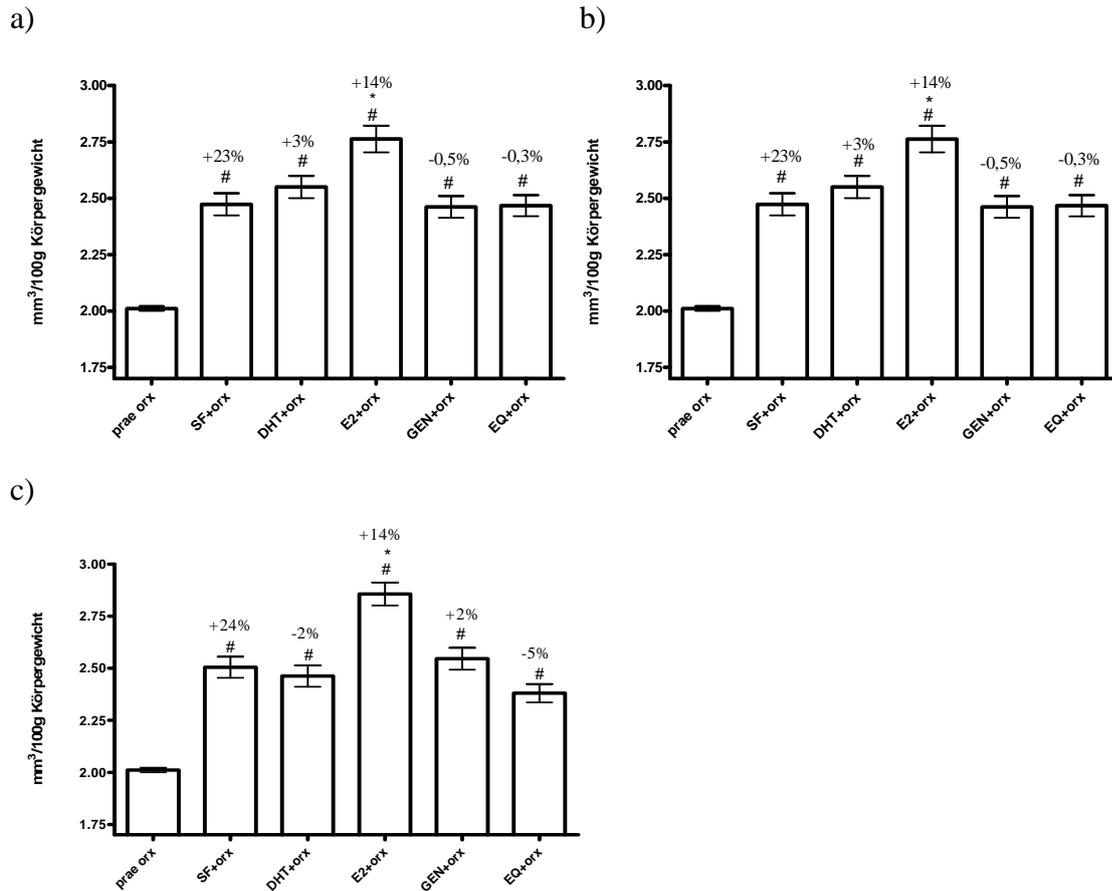


Abb. 19 Veränderung des metaphysären Widerstandsmoments 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch; die Zahlenangaben über der Säule SF+ orx geben die Zu- oder Abnahme der Werte gegen prae orx an; die Zahlenangaben über den Säulen DHT+ orx bis EQ+ orx geben die Zu- oder Abnahme gegen SF+ orx an; (* $p < 0,05$ versus SF+ orx; # $p < 0,05$ versus prae orx)

Verglichen zu den prae orx Werten nahm das Widerstandsmoment in allen Stoffgruppen über den Versuchszeitraum signifikant zu. Auffallend ist die Entwicklung der E2-Gruppe, die in allen Graphen mit Abstand die meiste Stabilität besitzen. Die Werte der E2-Tiere lagen acht Wochen nach Trepanation um 14% signifikant über der Kontrolle

3.7 Serumparameter des Knochenstoffwechsels

Auf- oder Abbauprodukte der verschiedenen Knochenzellen geben Rückschlüsse auf Veränderungen des Knochenmetabolismus. Bei den Cross-Laps handelt es sich um das

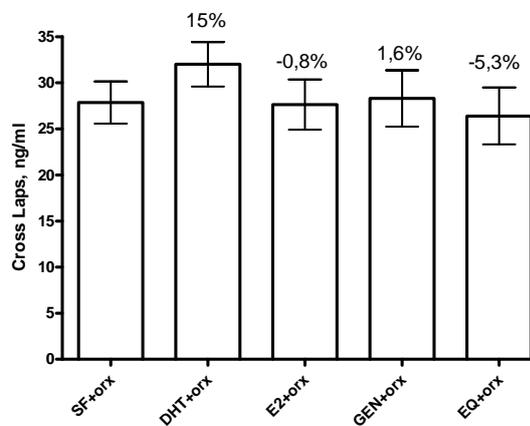
Abbauprodukt von Kollagen-1 α 1, das bei Osteoklastenaktivität freigesetzt wird und bei erhöhtem Knochenabbau in erhöhter Konzentration im Serum bestimmt werden kann.

Ein weiterer Marker ist das Osteokalzin. Er wird von Osteoblasten freigesetzt; ein hoher Osteokalzinwert im Serum spricht somit für Knochenaufbau.

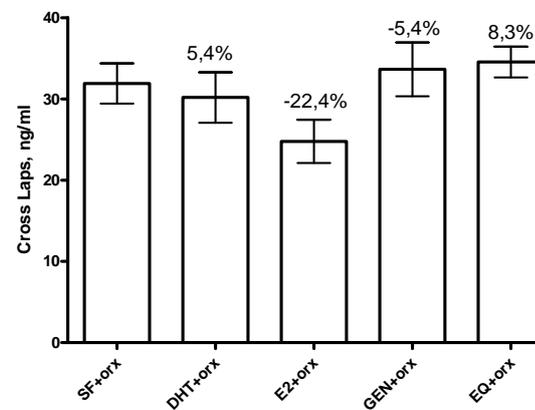
Die Messwerte der oben genannten Serumparameter werden im Folgenden graphisch dargestellt:

3.7.1 Veränderung der Serum- Cross-Laps

a)



b)



c)

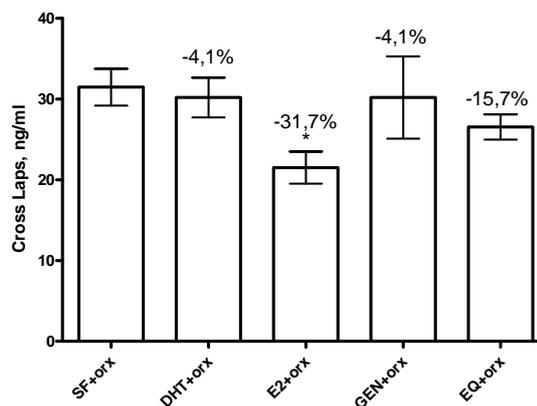


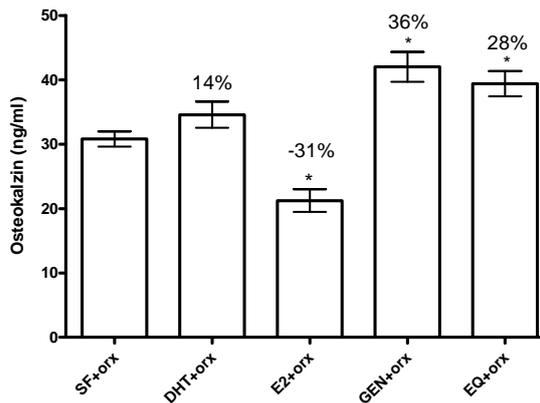
Abb.20 Veränderung der Serum Cross-Laps 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch; die Zahlenangaben über den Säulen geben die Zu- oder Abnahme der Werte gegen SF+ orx an; (*p< 0,05 versus SF+ orx)

Alle Gruppen zeigten über den Versuchszeitraum mit Ausnahme der E2-Gruppe, die deutlich unter der Kontrollgruppe lag, nur tendenzielle Veränderungen ohne statistische Signifikanz.

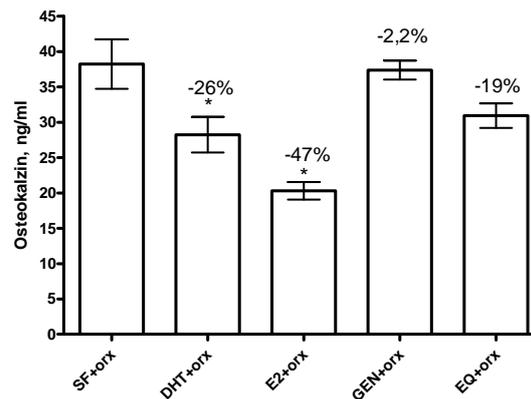
Generell zeigte sich aber über den Versuchszeitraum in der E2- und der EQ-Gruppe die geringste Osteoklastenaktivität.

3.7.2 Veränderung des Serum- Osteokalzins

a)



b)



c)

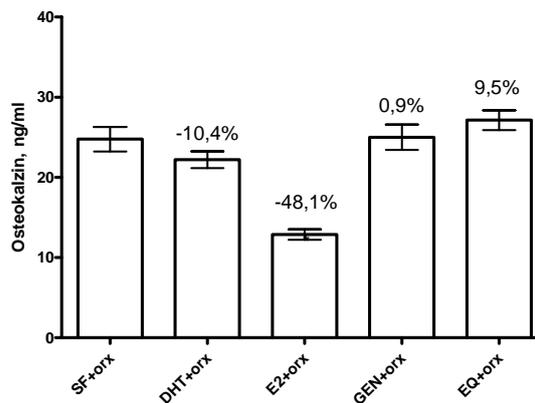


Abb.21 Veränderung des Serum- Osteokalzins 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch; die Zahlenangaben über den Säulen geben die Zu- oder Abnahme der Werte gegen SF+ orx an; (* $p < 0,05$ versus SF+ orx)

Im Verlauf über acht Wochen zeigten alle Gruppen eine stete Abnahme an Osteokalzinwerten. Signifikant am niedrigsten waren die Werte der E2-Gruppe. Den tendenziell höchsten Osteokalzinwert mit 27,13ng/ml besaß die EQ-Gruppe.

3.8 Veränderungen des Prostatagewichts

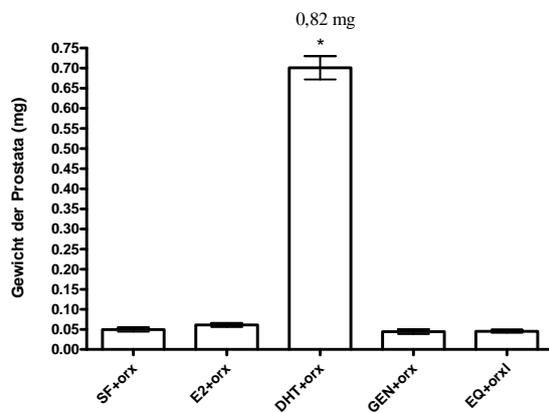


Abb.22 Veränderung des Prostatagewichts 8 Wochen nach Futtertausch; die Zahlenangaben über den Säulen geben die Zu- oder Abnahme der Werte gegen SF+ orx an; (* $p < 0,05$ versus SF+ orx)

Deutlich zeigte die DHT-Gruppe über den gesamten Versuchsverlauf die höchsten Prostatagewichte.

4. Diskussion

Lange Zeit wurde die Osteoporose als typische Krankheit der postmenopausalen Frau gesehen. Nicht zuletzt durch das stetig zunehmende Alter leiden jedoch auch immer mehr Männer an dieser Erkrankung. Daraus ergibt sich für beide Geschlechter ein deutlich erhöhtes Frakturrisiko. Erschwerte Heilung, gesteigerter Leidensdruck und extrem hohe Behandlungskosten sind oft Folge der osteoporosebedingten Frakturen. So zeigt beispielsweise im klinischen Alltag die Implantatversorgung dieser Frakturen nur in 50% Heilungserfolg (Egermann et al. 2005).

Diese Problematik gibt der Wissenschaft schon seit langer Zeit Anlass, die Osteoporose verstärkt zu beforschen. In der Vergangenheit widmete man sich diesbezüglich sehr intensiv dem weiblichen Geschlecht. Jüngst wächst aber auch mehr und mehr das Interesse an Untersuchungen der männlichen Osteoporose. Hierfür ist die männliche Ratte ein geeignetes Modell (Stürmer et al. 2006).

Verstärkte Aufmerksamkeit beansprucht in der Osteoporoseforschung die Suche nach osteoprotektiven und zugleich nebenwirkungsarmen Stoffen, wobei die Gruppe der Phytoöstrogene hier einen Hoffnungsträger darstellt.

In einigen Versuchen werden die osteoporotischen Knochen zudem mechanischen Stresssituationen ausgesetzt, um durch die Beobachtung solch provozierter Stresssituationen mehr Verständnis für noch unbekannte Vorgänge des osteoporotischen Knochens zu erhalten.

Auch in dieser Studie wurden die Wirkungen unterschiedlicher osteoprotektiver Substanzen an mechanisch irritierten Knochen untersucht, wobei die Trepanation als ein neues Verfahren verwendet wurde.

Mit Hilfe des pQCT- Gerätes wurden die Knochen am lebenden Objekt mit einer großen Präzision und Reproduzierbarkeit untersucht.

4.1 Futter, Futtermittelverbrauch und Körpergewicht

Bis zur Trepanation wurden alle Tiere mit sojafreiem Futter gefüttert. Erst nach Durchführung der Trepanation wurde das Futter getauscht. Dabei wurden Substanzen mit bekannter osteoprotektiver Eigenschaft verfüttert. In der vorliegenden Arbeit wurden 17β - Estradiol, Dihydrotestosteron, die beiden Phytoöstrogene Genistein und Equol und als Kontrollgruppe sojafreies Futter verabreicht.

Der Futterverbrauch sowie die Gewichtsentwicklung wurden bei allen Tieren zu festgelegten Zeitpunkten ermittelt.

Wie es zu erwarten war hob sich die E2-Gruppe durch das niedrige Körpergewicht bei geringster Futteraufnahme von den übrigen Gruppen ab. Interessant ist hierbei, dass die für weibliche Tiere beschriebenen Veränderungen sich auch bei den Männchen gut zeigen lassen. Verantwortlich für die geringe Futteraufnahme scheint ein durch E2 ausgelöster Effekt auf das hypothalamische Fresszentrum zu sein, welcher, wie bei E2-behandelten ovx- Ratten gezeigt werden konnte, den Fressantrieb beeinflusst (Santollo und Eckel 2008).

Dass Östrogene auch bei Menschen das Körpergewicht beeinflussen, ist schon lange bekannt. So kann bei Frauen nach der Menopause oft eine Gewichtszunahme beobachtet werden (Genazzani und Gambacciani 2006); im klinischen Bereich kommt es bei Östrogenresistenz zur Adipositasentwicklung (Mac Gillivray et al. 1998). E2 ist in der Lage das Körpergewicht durch Fettabbau zu regulieren (Vandenput et al. 2002).

Die erfolgreiche Einnahme von DHT kann in der vorliegenden Studie anhand der deutlich erhöhten Prostatagewichte bestätigt werden. Nach Kastration sinken diese, können aber durch Testosterongabe gehalten oder sogar gesteigert werden (Vanderschueren et al. 2000).

Eine erfolgte Aufnahme der Phytoöstrogene kann nur an Hand des Futterverbrauches bei diesen Gruppen gezeigt werden (Ergebnisse Tab. 6, S. 25).

Weiterhin konnte in der vorliegenden Studie gut die Entwicklung der Osteoporose beobachtet werden. Dabei kam es bereits zwei Wochen nach Trepanation zu einem Absinken der Spongiosadichte um 22%. Dies bestätigt einerseits die erfolgreiche Osteoporoseentwicklung und andererseits die männliche Ratte als gutes Versuchsmodell für die Osteoporoseforschung.

4.2 Die Trepanation - Überlegungen zur Auswirkung auf die Knochen

Als wesentliches Kernstück dieser Studie gilt die Trepanation. Da jenes Verfahren in diesem Zusammenhang ein Novum ist, ist es umso wichtiger zu diskutieren, welche Veränderungen sich dadurch am Knochen ergeben können.

Weiter oben wurde das Verfahren der Trepanation ausführlich beschrieben (Material u. Methoden S.20). An dieser Stelle ist nochmals zu erwähnen, dass bei allen Tibiaknochen auf Höhe der Metaphyse mit einem Bohrer (Durchmesser von 1,5mm) in Metaphysenhöhe ein

Loch durch den ganzen Knochen gesetzt wurde. Durch diesen entstandenen Defekt ergeben sich physikalische wie auch metabolische Veränderungen.

Nach der Orchidektomie sind alle Knochenumfänge gleich groß. Erst durch die Gabe der Futtersubstanzen kommt es zu Variationen des Umfangs. So bilden die mit Estradiol gefütterten Tiere die kleinsten Knochenumfänge aus.

Dabei ist der durch die Bohrung entstandene Defekt bei allen Knochen primär gleich groß. Dabei kommt es bei einem schmaleren Knochen prozentual gesehen zu einem größeren Substanzverlust als bei einem vergleichbar größeren Knochen. Dieser Zusammenhang wird in der folgenden schematischen Zeichnung veranschaulicht:

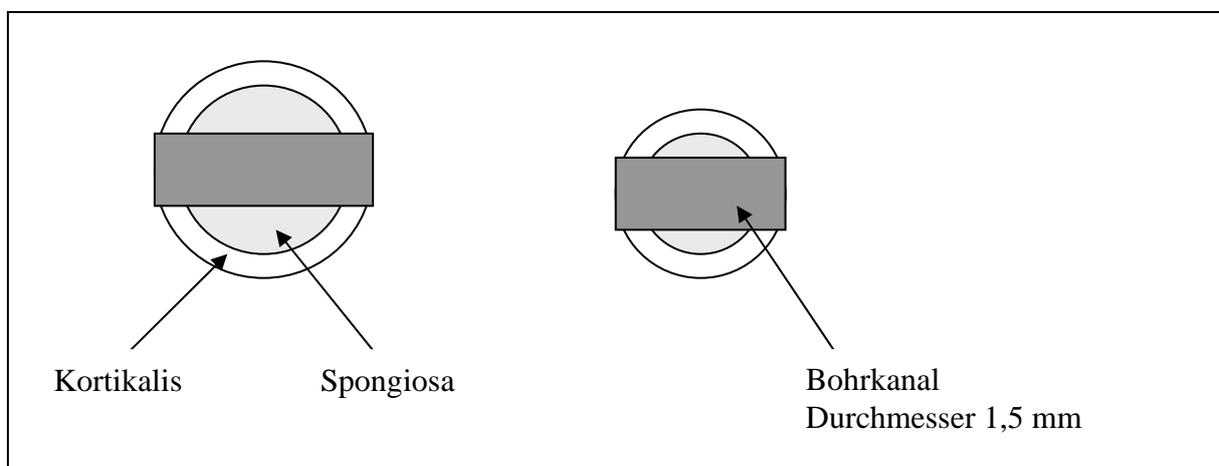


Abb. 23 Schematische Darstellung des Knochens mit Bohrkanal. Hier wird der durch den Bohrkanal entstandene Substanzdefekt bei unterschiedlicher Knochengröße gezeigt

Weiterhin verkleinert sich durch die Bohrung der Knochenumfang durch den Substanzverlust an der jeweiligen Ein- und Austrittsstelle des Bohrers. Dabei kommt es, sehr schematisch betrachtet, zu einem Verlust des kreisförmig größeren Umfangs, der auf Grund der Bohrung durch eine Gerade ersetzt wird. In der nachfolgenden Darstellung ist dies gezeigt:

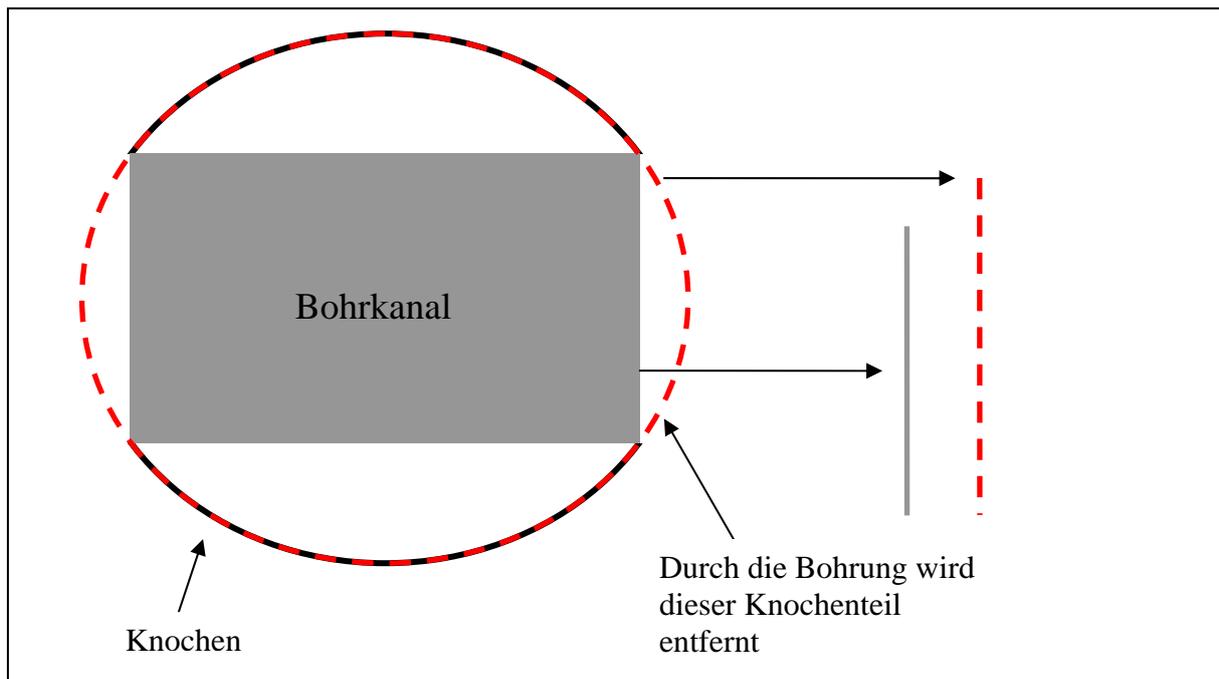


Abb. 24 Veränderung des Knochenumfangs durch den Substanzverlust der Bohrung

4.3 Knochenparameter

Wesentlicher Kern dieser Studie ist es, die Wirkung der Futterstoffe auf den durch Trepanation irritierten osteoporotischen Knochen zu untersuchen. Für das Gelingen der Studiendurchführung ist neben der korrekt durchgeführten Trepanation und Substanzfütterung die Entwicklung der Osteoporose von entscheidender Bedeutung.

Es ist schon lange bekannt, dass ein Mangel an Östrogenen oder Androgenen zu einem Knochensubstanzverlust führt. Dabei wird das Gleichgewicht des Knochenstoffwechsels zu Gunsten des Knochenabbaus verschoben und es entwickelt sich die Osteoporose.

Die endostale Dichte im Bereich der Metaphyse reagiert sehr sensibel auf Hormonschwankungen und stellt daher einen äußerst empfindlichen Untersuchungsparameter für die Ausbildung der Osteoporose dar (Seidlova- Wuttke et al. 2006). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte in diesem Bereich eine Minderung der Mineralisationsdichte gemessen werden. Damit entwickelte sich durch Kastration eine Osteoporose. So kam es bei allen drei Obduktionsgruppen im Vergleich zu den vor Kastration ermittelten Werten zu einer über 20%igen Abnahme der endostalen Dichte. Auf diese Weise bestätigt sich, dass die männliche Ratte ein gut geeignetes Osteoporosemodell ist (Stürmer et al. 2006).

4.3.1 Die Wirkung der Futtersubstanzen auf den durch Trepanation irritierten osteoporotischen Knochen

In die Diskussion der Knochenparameter fließen die oben gemachten Überlegungen zu den trepanationsbedingten Knochenveränderungen ein. Dabei richtet sich das Hauptaugenmerk auf die Werte der endostalen Knochendichte und den Knochenumfang. Die Veränderungen der Kortikalisdichte nehmen eine eher untergeordnete Rolle ein. Es ist bekannt, dass das zum Versuchszeitpunkt noch nicht abgeschlossene Tierwachstum die Dichtezunahme der Kortikalis zusätzlich stark beeinflusst (Seidlova- Wuttke et al. 2008). Einzig in die Berechnung des Widerstandsmomentes werden auch Werte der Kortikalisdichte mit einbezogen. Die Berechnung des Widerstandsmomentes wird von der mitgelieferten Software des pQCT- Messgerätes übernommen.

Sojafreie Kontrollgruppe (SF):

Nur im Vergleich zu einer wirkungsarmen Kontroll- Futtergruppe können die Effekte der wirkungsaktiven Futtersubstanzen fassbar gemacht werden. Deshalb wurde der Kontrollgruppe als hormoninaktiver Stoff sojafreies Futter verfüttert. Dies hat sich schon in vielen vorausgegangenen Studien als sinnvolle Futtersubstanz für die Kontrollgruppe erwiesen (Seidlova- Wuttke et al. 2008).

Das hormonarme Futter zeigt folgende Wirkungen auf den osteoporotischen und zugleich trepanierten Knochen:

Wie oben beschrieben, kommt es durch die Kastration zu einer Abnahme der endostalen Dichte. Reflektorisch nimmt zugleich der Knochenumfang zu. Dies ist ein bekannter und gut beschriebener Effekt des durch Osteoporose erhöhten Knochenstoffwechsels (Banu et al. 2002).

Die durch Blutabnahme gewonnenen Marker der Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität zeigen bei der Kontrollgruppe eine deutlich osteoporotische Stoffwechsellage. Hierbei ist das Gleichgewicht in Richtung Knochenabbau verschoben. So zeigen sich bei der Kontrollgruppe als Ausdruck des veränderten Knochenstoffwechsels wie erwartet sinkende Osteokalzin- und gleichzeitig steigende Cross- Laps- Spiegel im Blut. Damit decken sich unsere Beobachtungen mit vorausgegangenen Studien (Seidlova- Wuttke et al. 2004).

Estradiol (E2):

Durch die Gabe von Östrogenen kann der durch Kastration verursachten Osteoporose effektiv entgegengesteuert werden. In der Literatur ist beschrieben, dass dies bei weiblichen Tieren schon gut etabliert ist: Der Entwicklung der Osteoporose kann durch Östrogen- Gabe gut entgegengewirkt werden. Bei Männchen ist es etwas komplizierter, da neben Östrogenen auch Testosteron eine große Rolle für den Knochenerhalt spielt (Sims et al. 2003).

Estradiol wirkt über die Östrogenrezeptoren $ER\alpha$ und $ER\beta$ auf den Knochen. Dabei kommt es zu einer Verringerung des Knochenstoffwechsels, indem der durch Osteoporose beschleunigten Stoffwechsellaage entgegengewirkt wird (Eastell 2005). Es kann bei osteoporotischer Stoffwechsellaage durch Östrogen- Gabe keine bereits verloren gegangene Knochensubstanz wieder hergestellt werden. Das Fortschreiten des Knochenabbaus wird aber durch eine Verlangsamung des Knochenstoffwechsels aufgehalten.

Am Knochen selbst kann bei Östrogengabe im Vergleich zu den Kontrollgruppen somit ein geringer Verlust der endostalen Knochendichte beobachtet werden (Seidlova- Wuttke et al. 2006). Zugleich nehmen die Knochen nicht reflektorisch an Umfang zu, sondern bleiben eher unverändert zu den Ausgangswerten (Orwoll 2003). Weiterhin beobachtete man unter Östrogengabe eine Reduzierung der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität (Seidlova- Wuttke et al. 2004), was dazu führt, dass sich der Knochenstoffwechsel in einem neuen Gleichgewicht stabilisiert.

Es fällt teilweise sehr schwer, die bereits bekannten und gut beschriebenen Östrogenwirkungen mit den Ergebnissen dieser Studie nachzuvollziehen. Nicht zuletzt ist hierfür die Trepanationsbohrung in den osteoporotischen Knochen verantwortlich.

Bei Betrachtung der endostalen Dichte zeigte sich entgegen der Erwartung eine geringere endostale Dichte als bei der Kontrollgruppe (Seidlova-Wuttke et al. 2004; Orwoll 2003; Vanderschueren et al. 2000 a).

Eine erwartungsgemäße Estradiol-Wirkung lässt sich bei den Knochenumfängen erkennen. Wie vielfach beschrieben (Orwoll 2003), vergrößert sich der Knochenumfang nicht unter Estradioleinwirkung. In der vorliegenden Arbeit kam es darüber hinaus zu einer Abnahme des Umfangs.

Mit Hilfe der oben erwähnten Überlegungen zu trepanationsbedingten physikalischen Veränderungen können die Abweichungen interpretiert werden: Auf Grund der Trepanation

besteht bei allen Knochen der gleiche Substanzverlust in Größe des Bohrlochs. So kann mit Hilfe des pQCTs nur noch die erhalten gebliebene Knochensubstanz erfasst werden. Damit ist klar, dass wie oben beschrieben ein schmalere Knochen bei gleichem Substanzverlust wesentlich weniger messbare endostale Dichte besitzen muss als ein größerer. Somit müssten die Estradiol- Tiere die geringste endostale Dichte besitzen, da sie sich durch die schmalsten Knochen von den anderen Gruppen abheben. Weiterhin beweist sich die E2- Wirkung darin deutlich, dass der Knochenumfang auch nach Kastration nicht zunimmt. Dass der Knochenumfang sich im Verhältnis zu den Ausgangswerten eher verringert hat, kann ebenfalls trepanationsbedingt sein. Wie in Abb. 24 gezeigt, kommt es an den jeweiligen Ein- und Austrittsstellen der Bohrung zu einem Verlust des kreisförmig größeren Umfangs.

Hinzu kommen metabolische Veränderungen, die durch Estradiol bewirkt wurden. Dabei kann in dieser Studie eine herabgesetzte Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten unter E2- Gabe beobachtet werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Seidlova- Wuttke et al. (2004). Es wird vermutet, dass unter E2- Gabe das Gleichgewicht des osteoporotischen Knochenstoffwechsels neu organisiert wird. Dabei verringert sich erstmals die Aktivität beider Zellreihen um später wieder im Gleichgewicht zueinander zu stehen. Obwohl die hochkomplexen Mechanismen der Knochenheilung noch nicht vollständig verstanden sind, weiß man, dass E2 eine große Rolle bei der Heilung spielt. Unter osteoporotischen Bedingungen ist die mechanische Signalverarbeitung bei Osteoblasten eingeschränkt. Es konnte beobachtet werden, dass Östrogene diese verbessern kann (Augat et al. 2004). Für diese Studie kann zudem angenommen werden, dass Estradiol durch eine verlangsamte Stoffwechsellage eine strukturiertere Heilung begünstigt. Im Gegensatz dazu könnten die Heilungsabläufe der Kontrollgruppe ungeordneter und beschleunigter ablaufen. Dies würde zusätzlich eine Erklärung für die geringere endostale Dichte der Estradiol- Gruppe sein.

Dihydrotestosteron (DHT)

Der männliche Hypogonadismus ist ein großer Risikofaktor für die Osteoporoseentwicklung. Dies bedingt z.B. die im Alter reduzierte Testosteronbildung. Es scheint so zu sein, dass der Testosteronabfall mit einem Anstieg an Hüftfrakturen einhergeht (Vanderschueren et al. 1993). Im männlichen Organismus ist der Knochenstoffwechsel komplizierter als im weiblichen, da nicht nur Estradiol, sondern auch Testosteron eine tragende Rolle einnimmt. Es ist immer noch unbekannt, wie groß die alleinige Wirkung von Testosteron auf den Androgen- Rezeptor ist, da Testosteron über die Aromatase zu Estradiol umgewandelt den

ER α und ER β stimulieren kann (Vandenput et al. 2002). In dieser Studie war es die Absicht, die alleinige Wirkung auf den Androgenrezeptor zu untersuchen. So wurde das nicht mehr durch die Aromatase umwandelbare 5 α -Dihydrotestosteron als Futtersubstanz verwendet.

Testosteron bewirkt über den AR eine Umfangzunahme der Knochen. Dabei wird speziell eine Zunahme der Kortikalisdicke beobachtet. Weiterhin wird vermutet, dass die Umfangzunahme der Knochen zusätzlich zum Verhältnis zur vergrößerten Muskelmasse ausgebildet wird (Vanderschueren et al. 2004).

Außerdem steigern Androgene die Proliferation von Osteoblasten und können die RANKL induzierte Osteoklastenformierung hemmen (Vanderschueren et al. 2004). Weiterhin fördern Androgene das Längenwachstum der Knochen und werden für die metaphysäre Ossifikation verantwortlich gemacht (Compston 2001).

Wir erwarten deshalb in der vorliegenden Arbeit eine Umfangzunahme bei gleichzeitiger Kortikalisdickenzunahme. Durch die Hemmung der Osteoklasten würde man zusätzlich einen Erhalt der endostalen Dichte vermuten.

Die aufgrund früherer Untersuchungen erwarteten DHT- Wirkungen konnten anhand der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte nicht bestätigt werden. Dies bestätigt sich darin, da einige wesentliche Knochenparameter nicht erheblich von der Kontrollgruppe zu unterscheiden sind. Es fällt zwar die größte Umfangzunahme der Knochen auf, was primär als androgener Knocheneffekt beschrieben wird (Vanderschueren et al. 2004). Dies kann aber nicht auf eine Zunahme der Kortikalisdicke zurückgeführt werden, da diese sich nicht erheblich von der Kontrollgruppe unterscheiden. Damit müsste die Umfangzunahme der DHT- Gruppe eher als natürliche Reaktion auf die Kastration gewertet werden. Eine Erklärung, warum DHT in dieser Studie ohne Zunahme der Kortikalisdicke die größten Knochenumfänge ausgebildet hat, kann nicht eindeutig geklärt werden. Es kann auch damit nicht erklärt werden, dass wie in der Literatur beschrieben (Vanderschueren et al. 2004) sich die Knochenumfänge der vergrößerten Muskelmasse angepasst haben. Dafür ist es unter DHT- Einfluss zu einer viel zu geringen Muskulaturausbildung gekommen.

Weiterhin konnte durch DHT kein großer Effekt auf die endostale Dichte nachgewiesen werden. Bei gleich großem Substanzverlust durch die standardisierte Größe des Bohrkanals würde man bei der DHT- Gruppe die höchste endostale Dichte erwarten, da der Knochenumfang am größten ist. Irritierend ist jedoch, dass die endostale Dichte der DHT- Gruppe wesentlich geringer ist als bei der E2- Gruppe. Betrachtet man die endostale Fläche

der DHT-Gruppe, so zeigten sich im Verhältnis zum übrigen Knochen sehr hohe Werte. Zusammengefasst beobachtet man bei größter endostaler Fläche die niedrigste endostale Dichte. Somit muss davon ausgegangen werden, dass über den AR ein Erhalt der endostalen Dichte nur schlecht vermittelt werden kann. Ähnliche Beobachtungen konnten 2002 durch Vandenput et al. gemacht werden. Dort zeigte sich ebenfalls ein deutlich besserer Erhalt der endostalen Dichte bei E2- als bei DHT- Gabe.

Die Phytoöstrogene Genistein und Equol

Schon sehr lange wird den Phytoöstrogenen große Aufmerksamkeit geschenkt. Zahlreiche Studien belegten positive Effekte dieser Substanzen auf Gewebe, wie Uterus, kardiovaskuläres System und Knochengerüst (Crisafulli et al. 2005; Wangen et al. 2001). Lebhaft sind die Diskussionen darüber, ob Phytoöstrogene eine Alternative zur Hormonersatztherapie sind.

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung von den Phytoöstrogenen Genistein und Equol, einem Abkömmling von Daidzein, untersucht.

Genistein (Gen)

Zahlreiche Studien mit Phytoöstrogenen zeigten in vitro und in vivo sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte eine Knochenerhaltende Wirkung. Oft sind die genauen Mechanismen für diesen Effekt nicht geklärt (Setchell und Lydeking 2003). Bei Ratten zeigte Genistein eine große Bindungsaffinität zum ER β . Über diesen Rezeptor und verschiedene andere Mechanismen vermittelt es seine Wirkung auf den Knochen (Kuiper et al. 1997). Es wurde festgestellt, dass Genistein zu einer stärkeren Proliferation und Differenzierung der Osteoblastenzellkulturen von Knochen junger Mäuse führte. Bei den Osteoklasten dominierten hemmende Wirkungen (Pan et al. 2005). Untermauert werden konnte die aktivierende Wirkung auf Osteoblasten bei Zellkulturen von Mäusen. Dabei zeigte sich eine Erhöhung der ALP und einer Zunahme des zellulären DNA- und Proteingehaltes (Kanno et al. 2004). Bei Genistein- Gabe kommt es somit zu einer Förderung des Knochenaufbaus und zu einer Hemmung des Knochenabbaus. Besonders die endostale Dichte ist ein Parameter, der auf Grund seiner hohen östrogenen Sensitivität durch Genistein stark beeinflusst wird. In diesem Bereich wurde eine dosisabhängige Steigerung der Mineralisationsdichte in den Tibiae von Ratten festgestellt (Christoffel 2004).

Um in der vorliegenden Arbeit die durch Genistein bewirkten Effekte auf den Knochen besser sichtbar machen zu können, ist es sehr hilfreich, diese Gruppe mit Gruppen von gleichem Knochenumfang zu vergleichen. Somit wird die Wirkung auf die endostale Dichte präziser vergleichbar, da bei Knochenumfang gleichen Gruppen die nach Trepanation erhaltene Knochensubstanz annähernd gleich sein muss. Ähnliche Knochenumfänge wie bei der Genistein- Gruppe zeigten sich neben der SF- noch bei der DHT- Gruppe.

Weil für die E2- Gruppe eine knochenerhaltende Wirkung in dieser Studie bestätigt werden konnte, ist es hilfreich die Ergebnisse als positiv- Kontrolle mit in die Interpretation einfließen zu lassen.

Es ist zu beobachten, dass Genistein die durch Orchidektomie induzierte Zunahme des Knochenumfangs nicht beeinflussen kann. Im Vergleich zu der SF- und der DHT- Gruppe kann nach Genistein- Gabe jedoch die größte endostale Dichte gemessen werden. Nur die Kontrollgruppe zeigt bei etwas größerem Knochenumfang tendenziell etwas mehr endostale Dichte. Wie oben erläutert kann dies (endostale Dichte der Kontrollgruppe) auf das beschleunigte und ungeordnete Wachstum durch die fehlende Substanzbeeinflussung zurückgeführt werden. Verglichen zu der DHT- Gruppe kann durch Genistein eine wesentlich höhere endostale Dichte erhalten werden. Damit scheint Genistein in der Lage zu sein, die Knochendichte nicht nur bei weiblichen (Sliwinski et al. 2005), sondern auch bei männlichen Ratten zu bewahren. Auf welche Weise Genistein den -wenn auch milden- Erhalt der endostalen Dichte bewirkt, kann nicht geklärt werden.

Anders als beschrieben (Yamaguchi und Weitzmann 2009; Pan et al. 2005) kann in der vorliegenden Studie keine Steigerung der Osteoblastenaktivität gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden. Gleichzeitig ist die Osteoklasten- Aktivität durch Genistein- Gabe nicht herabgesetzt. Daher kann vermutet werden, dass Genistein das Verhältnis von Knochenauf- und Knochenabbau auf einem höheren Level als E2 ins Gleichgewicht bringt.

Zusammengefasst lässt sich bei Genistein- Gabe eine milde osteoprotektive Wirkung erkennen. Die Erwartungen, die man in dieses Phytoöstrogen bezüglich des Knochenerhaltes hat sind damit sicherlich nicht hinreichend erfüllt. Bei vorbeschriebener Steigerung der Osteoblasten- Aktivität durch Genistein (Pan et al. 2005) hätte man im Zustand der Knochenheilung mehr Aktivität vermutet. Ob die in dieser Studie verwendete Genistein- Dosis ausreichend war, ist zu hinterfragen. Vielleicht hätte durch eine erhöhte Genisteindosis der aufgrund der Trepanation höhere Energieaufwand zur Knochenheilung besser beeinflusst

werden können. Dies sind Überlegungen, die eventuell anregend für ähnlich durchgeführte Versuche sein könnten.

Equol (EQ)

Im engeren Sinne handelt es sich bei Equol nicht um ein klassisches Phytoöstrogen, da es durch Darmbakterien aus Daidzein metabolisiert wird. In den letzten Jahren hat Equol große Aufmerksamkeit bekommen. Es ist von seiner chemischen Struktur her dem Estradiol sehr ähnlich und besitzt hohe Bindungsaffinität zu ER β . Dieser Rezeptor kommt verstärkt auf den Knochen vor (Weaver und Legette 2010; Ishimi 2010).

Auch wenn noch sehr wenige Daten über die Wirksamkeit von Equol auf den Knochen veröffentlicht sind, wurden osteoprotektive Eigenschaften nachgewiesen.

Durch Equol-Gabe konnte im Versuch an ovx-Mäusen eine Reduktion des Knochenverlustes ohne östrogene Nebenwirkung auf den Reproduktionstrakt gezeigt werden (Fujioka et al. 2004). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass Equol in der Lage ist, die Osteoklasten-Bildung und -Formation zu unterdrücken (Weaver und Legette 2010). Bei weiblichen Ratten konnte durch Equol die Heilung osteoporotischer Frakturen verbessert werden (Kolios et al. 2009).

Eine durch Equol ausgelöste knochenerhaltende Wirkung auf den osteoporotischen Knochen kann durch diese Studie in Teilen ebenfalls gezeigt werden. Für eine bessere Interpretation bezüglich der endostalen Dichte bietet es sich auch hier an, die Equol-Gruppe mit Gruppen gleichen Knochenumfangs zu vergleichen. Dabei wird bei gleichem trepanationsbedingtem Substanzverlust eine Wirkung auf die endostale Dichte besser sichtbar gemacht.

Der Knochenumfang ist nur etwas größer als der der E2-Gruppe. Diese Beobachtung lässt annehmen, dass Equol in ähnlicher Weise wie E2 einer durch Osteoporose bedingten reaktiven Umfangzunahme entgegenwirken kann.

Dabei fällt die Beurteilung sehr schwer, wie viel endostale Knochendichte tatsächlich durch Equol bewahrt werden kann. In Relation zum Knochenumfang zeigt sich tendenziell weniger endostale Dichte als unter E2-Einfluss. Vergleicht man den Erhalt der endostalen Dichte jedoch mit einer Gruppe, die einen größeren Knochenumfang ausgebildet hat (z. B. die DHT-Gruppe), so zeigt Equol osteoprotektivere Wirkung. Vereinfacht ausgedrückt wird durch Equol-Gabe in Relation zum Knochenumfang -wenn auch nicht so viel wie bei E2- endostale Dichte erhalten.

Weiterhin lässt sich bestätigen, dass Equol die Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten, wie in vorausgegangenen Arbeiten beobachtet, regulieren kann (Weaver and Legette 2010). Es lassen sich tendenziell erniedrigte Cross- Lap- Werte und erhöhte Osteokalzin- Werte beobachten. Ob die erhöhten Osteokalzin- Werte in Zusammenhang mit der bereits erwähnten Equol- bedingten Förderung der Frakturheilung (Kolios et al. 2009) stehen, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden.

Mit mehr Sicherheit können die ausgelösten Wirkmechanismen dieser Substanz auf den osteoporotischen und trepanierten Knochen beschrieben werden, wenn die histomorphologische Untersuchung abgeschlossen ist. Diese Untersuchung wird unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Wiese aus der Abteilung MKG- Chirurgie der Universitätsklinik Göttingen geleitet.

4.4 Veränderungen der Muskelfläche und des Fettanteils durch Hormonmangel

Es ist schon länger bekannt, dass es bei postmenopausalen Frauen zu einer Gewichtszunahme kommen kann (Genazzani und Gambacciani 2006). Neben einer verminderten Östrogen-Produktion liegt die Ursache auch in einem Mangel an männlichen Geschlechtshormonen. Dies bewirkt besonders eine Vergrößerung des abdominellen Fettanteils (Blouin et al. 2003; Lovejoy 2003).

Auch bei Männern kommt es bei Androgenabfall häufig zu einer verstärkten Gewichtszunahme. Dies konnte ebenfalls im Tierversuch an männlichen Ratten bestätigt werden (Hansson et al. 1991).

In weiteren Studien konnten durch E2-Gabe die Serum-Leptin-Werte verringert werden. Dies bewirkte neben einer geringeren Futteraufnahme eine deutliche Fettreduktion (Seidlova-Wuttke et al. 2003 a).

Wie groß die alleinige Auswirkung von Androgenen auf das Fettdepot ist, ist noch nicht ganz klar. So zeigte die DHT- Gabe in einigen Studien einen wesentlich geringeren Einfluss auf das Körpergewicht (Vandenput et al. 2002) als E2. Andere Beobachtungen stellten hingegen fest, dass unter Androgen- Einfluss Typ I und Typ II Muskelfasern hypertrophieren und somit die Ausbildung von Fettgewebe vermindert wird (Bhasin et al. 2006).

Unter osteoporotischen Stoffwechselbedingungen ist auch eine Abnahme der Muskelmasse zu beobachten (Araujo et al. 2008). In Tierversuchen konnte an osteoporotischen männlichen

Ratten beobachtet werden, dass durch Testosteron- und E2-Gabe dem Muskelaturlverlust entgegengewirkt werden kann (Vandenput et al. 2002; Vanderschueren et al. 2000a, b).

4.4.1 Die Wirkung der Futtersubstanzen auf das paratibiale Fettdepot und die Muskelfläche

Mit der pQCT- Messung ist es möglich das paratibiale Fettdepot zu untersuchen. Dieses Fettdepot liegt in der Loge zwischen den beiden Köpfen des Muskulus gastrocnemius und reagiert sehr sensibel auf den Einfluss von Östrogenen (Seidlova-Wuttke et al. 2003 a). Zugleich ist es möglich durch Subtraktion des Fettdepots und der Knochenanteile die Muskelfläche des Unterschenkels zu errechnen.

Sojafreie Kontrollgruppe (SF):

Die sojafreie Ernährung der Kontrollgruppe kann aufgrund ihrer Wirkstoffarmut keinen Effekt auf das Fettdepot und die Muskulatur ausüben. Es können somit die rein durch Orchidektomie verursachten Veränderungen beobachtet werden.

Wie zu erwarten war, entwickelt die sojafrei ernährte Ratte eine signifikante Fettzunahme bei gleichzeitigem Muskelaturlverlust. Somit stimmen die in dieser Studie gemachten Beobachtungen mit den oben gemachten Aussagen überein.

Estradiol (E2):

Wie es zu erwarten war zeigt Estradiol signifikant die größte Wirkung sowohl auf das paratibiale Fettdepot als auch auf die Muskelfläche. Dabei verringerte sich der Fettanteil bei gleichzeitig gutem Muskelaturlerhalt.

Auch im Vergleich der pQCT- Bilder einer sojafrei ernährten Ratte (Abb. 28 c) mit einem E2- gefütterten Tier (Abb. 30 c) kann ein leichter Unterschied festgestellt werden. Dabei lässt sich bei Estradiol- Gabe ein etwas kleineres paratibiales Fettdepot beobachten.

Zusammengefasst profitiert der männliche Organismus von der E2- Gabe. Es kann unter osteoporotischer Stoffwechsellage einer Übergewichtigkeit bei gleichzeitigem Muskelaturlerhalt entgegengewirkt werden.

Dihydrotestosteron (DHT):

Weniger eindeutig sind die durch DHT bewirkten Effekte. Anders als zu erwarten war, kann weder ein Einfluss auf das paratibiale Fettdepot noch auf die Muskulatur beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe bildet die DHT- Ratte ein deutlich größeres Fettdepot aus. Dies zeigt sich auch sehr gut im Vergleich der pQCT- Abbildungen (Abb. 28c und Abb. 29c). Zugleich kann der unter DHT- Einfluss stehende Organismus keine Muskelfläche erhalten. Die DHT- Ratte besitzt unter allen weiteren Gruppen signifikant die niedrigste Muskelfläche. Dieses Ergebnis ist zunächst irritierend, da in vorausgegangenen Arbeiten für Androgene ein Muskelaufbau bei gleichzeitiger Fettreduktion beschrieben wurde (Bhasin et al. 2006). Da in der vorliegenden Arbeit das nicht mehr zu E2 umwandelbare DHT verwendet wurde, stellt sich dementsprechend die Frage:

- Kann nur durch die Umwandlung von Androgenen in E2 eine Wirkung sowohl auf das Fettdepot als auch auf die Muskulatur ausgelöst werden?

In vorausgegangenen Arbeiten hat DHT wenig bis gar keinen Einfluss sowohl auf den Muskulaturerhalt als auch auf das Fettdepot gezeigt. Vandenoort et al. veröffentlichte 2002, dass DHT wesentlich weniger Einfluss auf die Muskelfläche und das Fettdepot der männlichen Ratte hat als E2. Damit passen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich des Fettdepots zu der Aussage, dass die Fettmasse des Mannes im Wesentlichen über die Östrogenrezeptoren reguliert wird (Heine et al. 2000; Jones et al. 2000).

Auch eine trepanationsbedingte Beeinflussung ist eher unwahrscheinlich, da sich sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei der E2- Ratte die für diese Futtersubstanzen erwarteten Veränderungen sehr deutlich ausgebildet haben.

Eine mögliche Erklärung für den geringen Erhalt der Muskulatur ist durch die von Vandenoort et al. 2002 durchgeführte Studie gegeben. Deckungsgleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie konnte DHT auch nicht die gewünschte Muskelsubstanz erhalten. Testosteron hingegen führte in dieser Studie zu einem Muskulaturerhalt.

Erklärt wurde diese Beobachtung damit, dass im Gegensatz zu Testosteron durch DHT ein Abfall des Wachstumsfaktors IGF- I bewirkt wird. Damit kann weniger Muskulatur erhalten werden, da die Anwesenheit von IGF-I unter anderem Muskulaturwachstum stimuliert.

Genistein (GEN):

Bei den Genistein – Ratten (Abb. 31c) zeigt das paratibiale Fettdepot deutlich mehr Fläche als das der Kontrolltiere (Abb. 28). Auch die vom Computer berechneten Daten bestätigen, dass der Fettanteil bei den Kontrolltieren deutlich höher als der der Genistein- Ratte war. Entgegen der Erwartungen konnte Genistein trotz seiner östrogenen Eigenschaften keinen Einfluss auf das Fettgewebe und den Erhalt der Muskulatur nehmen.

Es kann nicht beantwortet werden, warum Genistein in dieser Studie keine Fettreduktion bewirkt. Auch die unzureichende Wirkung auf die Muskulatur wirft Fragen auf.

In der vorausgegangenen Dissertationsarbeit von M. Stolze (2007) konnte bei der männlichen Ratte durch Genistein- Gabe eine Reduktion des paratibialen Fettanteils beobachtet werden. Dieser war im Gegensatz zu der E2- Gruppe nicht signifikant verringert gewesen. Damit verdichtet sich die Vermutung, dass Genistein eine eher milde östrogene Eigenschaft besitzt. In Bezug auf die Dissertationsarbeit von M. Stolze (2007), in der keine Irritation durch Trepanation auf den osteoporotischen Knochen stattgefunden hat, kann zugleich die Trepanation merkbare Auswirkungen auf die Entwicklung des Fettdepots und die Muskulatur verursacht haben. Die Frage nach den auslösenden Faktoren muss jedoch offen bleiben.

Equol (EQ):

Im Vergleich der pQCT- Bilder (Abb.28c und Abb. 32c) fällt bei der Equol- Gruppe ein etwas größeres paratibiales Fettdepot auf. In den Daten bestätigt sich dies. Zugleich wird durch EQ- Gabe kein Aufbau der Muskulatur verursacht. Auf Grund der Ähnlichkeit von EQ zu E2 hätte man hier ein wesentlich deutlicheres Ergebnis erwartet.

Eine erklärende Antwort für die geringe Fettreduktion bei keinem feststellbaren Erhalt der Muskulatur kann an dieser Stelle nicht gegeben werden.

Es bleibt nur die Vermutung, dass Equol nicht die erhoffte östrogene Wirkung besitzt, die bei großer Estradiol- Ähnlichkeit angenommen wurde.

Ebenfalls kann ähnlich wie bei der Genistein- Gruppe das tendenziell schlechtere Ergebnis auf die Trepanation zurückgeführt werden. Doch auch hier lässt sich mit den Daten dieser Studie keine Erklärung für stattgefundene Prozesse finden.

4.5 Beurteilung der Heilungsvorgänge durch die CT- Bilder

Für die vorliegende Arbeit stellt sich die Frage, in wieweit sich die Heilungsvorgänge anhand der CT-Bilder nachvollziehen lassen. Bei frakturierten Knochen der männlichen Ratte wurden in histomorphologischen Untersuchungen Heilungsstadien beschrieben (Kussar et al. 2001). Durch die Betrachtung der CT-Bilder wird es sicherlich nicht möglich sein die Heilung der Trepanationsbohrung Stadien zuzuordnen. Dafür müsste ebenfalls durch histologische Aufarbeitungen eine zeitliche Zuteilung der jeweilig anwesenden Zellen zu den entsprechenden Heilungsstadien erfolgen. Dennoch können durch das pQCT Knochendichte-Veränderungen interpretiert werden. Dies ist durch die farbliche Abstufung der jeweiligen Strukturdichte gegeben (siehe Material und Methoden S.19). Dabei steht die Farbe Schwarz für sehr geringe Dichte, wie Luft. Weiß hingegen steht für die größte Dichte, wie z.B. Knochen. Rote und gelbe Bereiche kennzeichnen dabei ansteigende Gewebedichte.

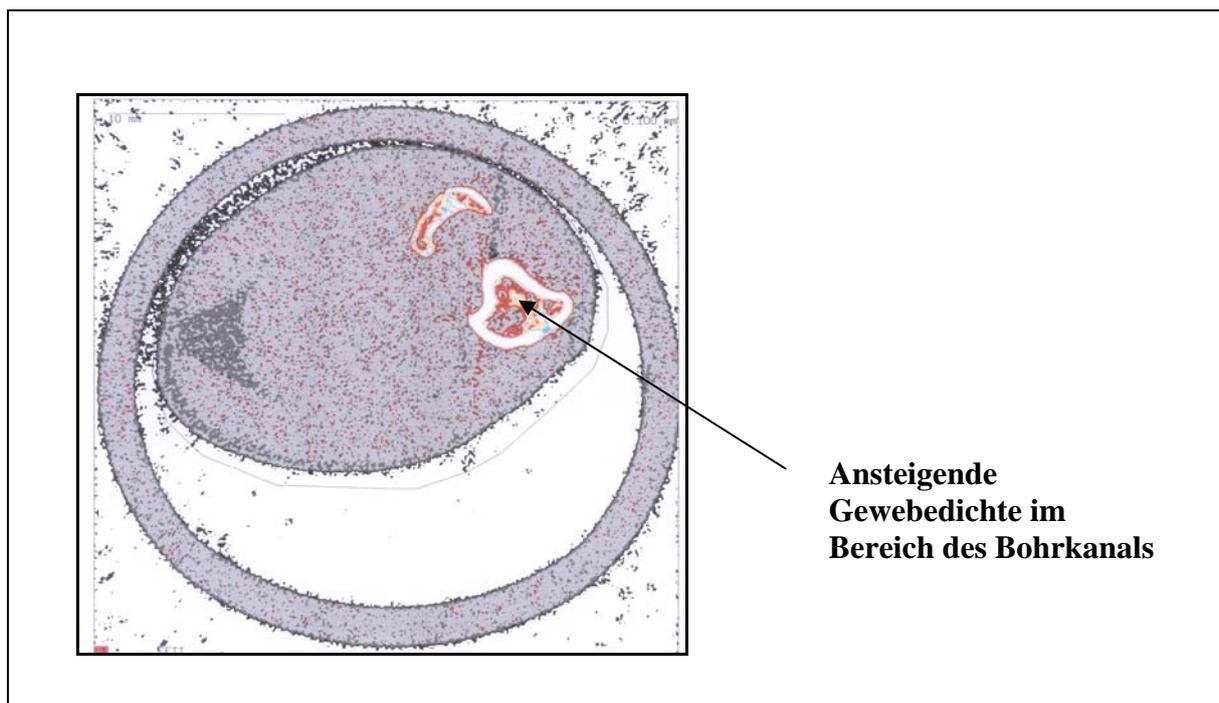


Abb. 25 CT-Bilder der SF-Gruppe zwei Wochen nach Trepanation. Deutlich lässt sich eine ansteigende Gewebedichte im Bereich des Bohrkanals erkennen.

Wie in der Abb. 25 gezeigt, erkennt man im Bereich der Bohrung eine ansteigende Gewebedichte, was für erhöhte Aktivität in diesem Bereich spricht. Es lassen sich jedoch keine Zusammenhänge zwischen den pQCT- Bildern und der gemessenen endostalen Dichte herstellen. Dies zeigt beispielsweise die Betrachtung der DHT- Gruppe. Hier erkennt man auf

der Abb.29c zum Zeitpunkt achte Woche nach Trepanation sehr viel ansteigende Knochenaktivität erkennen. In den Daten der endostalen Dichte spiegelt sich dies nicht wieder. Diese zeigt, wie oben beschrieben eher geringen Erhalt.

Die Betrachtung der pQCT- Bilder liefert einen interessanten Aspekt. Es zeigt sich bei allen Bildern, dass die ansteigende Gewebedichte als Ausdruck vermehrten Knochenumsatzes, von der Kortikalis ihren Ursprung zu nehmen scheint.

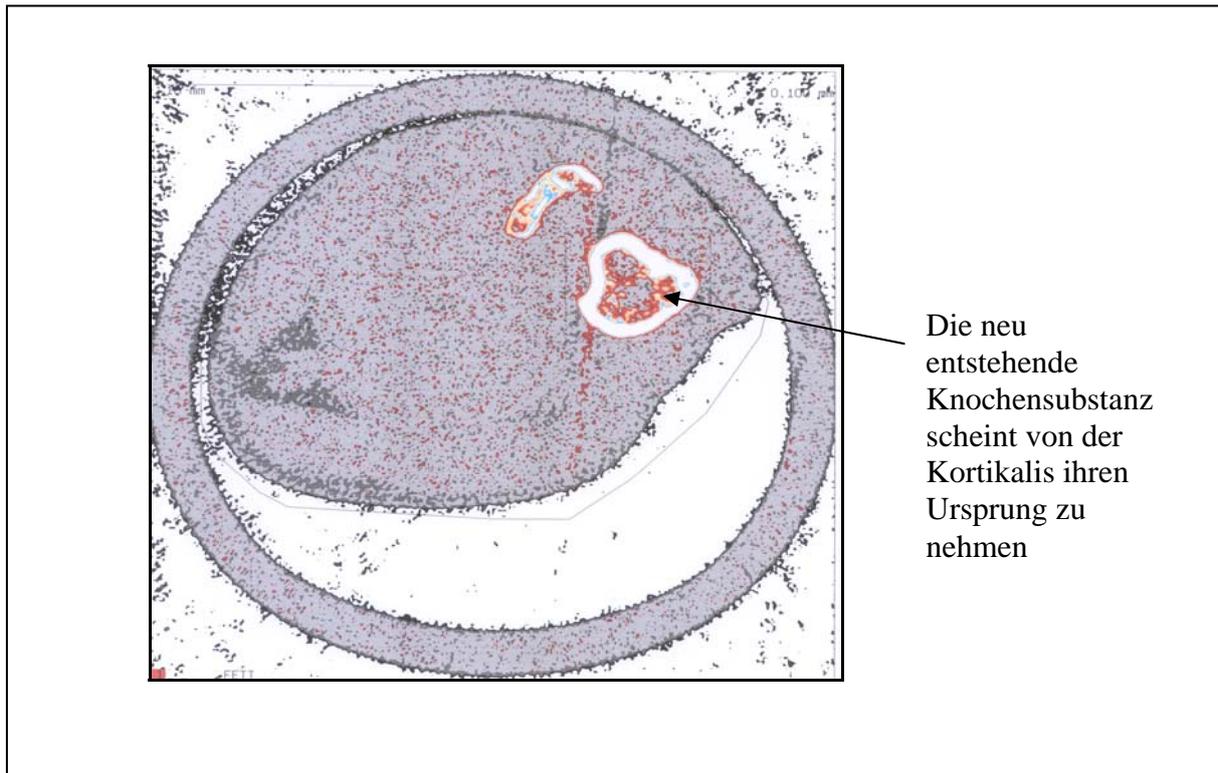


Abb.26 Die neu entstehende Knochensubstanz scheint ihren Ursprung von der Kortikalis zu nehmen (SF- Gruppe zwei Wochen nach Trepanation)

Dies lässt sich in Abb. 26 gut nachvollziehen. Hier imponieren rote und gelbe Areale, die von der Kortikalis auszugehen scheinen. Verstärkt ansteigende Knochenaktivität findet sich dabei im Bereich des Bohrkanals. Warum dies so ist, bleibt Gegenstand weiteren Forschens.

5. Zusammenfassung

Die Kernfragen dieser Arbeit werden in dem Kapitel Zusammenfassung nochmals aufgegriffen und mit den wesentlichen Aussagen beantwortet.

- Entsteht bei den männlichen Ratten sechs Wochen nach Orx eine Osteopenie oder Osteoporose?

In den Graphen der endostalen Dichte zeigt sich deutlich über den gesamten Versuchsverlauf eine stete Abnahme. Auch wenn dies zu Anfang eher einer Osteopenie entspricht, so können wir acht Wochen nach Trepanation eine deutliche Osteoporose- Entwicklung erkennen

- Welche Wirkung können E2, DHT und die Phytoöstrogene Gen und EQ auf den durch Trepanation irritierten osteoporotischen Knochen ausüben?
- Welches der gegebenen Steroide hat die größte Wirkung auf den Knochen?

Wie es zu erwarten war, kann durch die Fütterung von E2 am meisten Knochendichte bei den durch Trepanation irritierten Knochen erhalten werden. Die Interpretation der Graphen ist ohne die Berücksichtigung physikalischer Veränderungen, die sich durch die Bohrung ergeben haben, nicht gut möglich. Beachtet werden muss hierbei, dass der Erhalt der endostalen Dichte immer in Relation zum Knochenumfang gesehen werden muss. Dies ist deshalb entscheidend, da bei stets gleichem Substanzverlust durch die Bohrung ein schmalerer Knochen weniger verbleibende Knochensubstanz hat als ein breiterer.

DHT bewirkt die größte Umfangzunahme der Knochen. Dabei kann durch die DHT- Gabe in Relation zur Knochengröße die geringste endostale Dichte erhalten werden.

Bei den verfütterten Phytoöstrogenen konnte in Relation zum Knochenumfang durch Equol mehr endostale Dichte erhalten werden als durch Genistein.

- Welche Auswirkungen hat die Gabe von E2, DHT und den Phytoöstrogenen Gen und EQ auf das paratibiale Fettdepot und die Muskulatur?

Wie es zu erwarten war, bewirkte E2 den größten Muskulaturaufbau bei gleichzeitiger Fettreduktion. Weniger eindeutig waren die Ergebnisse der mit DHT gefütterten Tiere. Dabei

konnte weder eine Reduktion des paratibialen Fettgewebes noch ein Muskulaturaufbau beobachtet werden.

Durch die beiden verfütterten Phytoöstrogene war es ebenfalls nicht möglich, das prätibiale Fettdepot zu reduzieren und den Muskulaturaufbau zu fördern. Tendenziell die besseren Ergebnisse waren unter beiden bei Genistein- Gabe zu beobachten.

- Inwieweit lassen sich Heilungsprozesse auf den pQCT- Bildern nachvollziehen?

Es ist nicht möglich, die Heilungsstadien, wie sie bei der Knochenfraktur beschrieben werden, an Hand der CT- Bilder nachzuvollziehen. Durch das farbcodierte Rasterbild lassen sich aber Aussagen über eine gesteigerte Knochenaktivität machen. Dabei kann beobachtet werden, dass die meiste Knochenaktivität im Bereich des Bohrkanals stattfindet. Weiterhin ist zu beobachten, dass die neu entstandene Knochensubstanz ihren Ursprung von der Kortikalis zu nehmen scheint.

6. Bilderanhang

6.1 Bilder von der Trepanation



a)



b)



c)



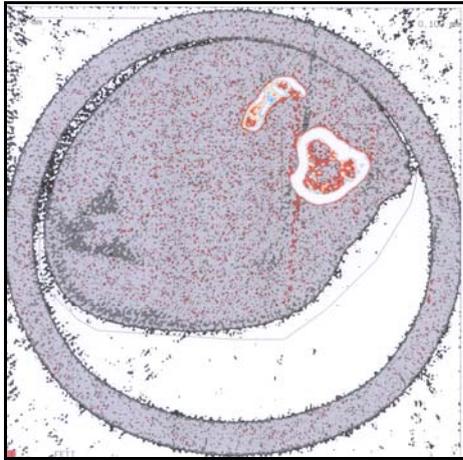
d)



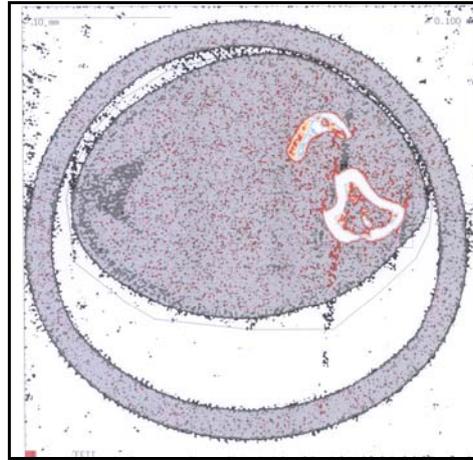
e)

Abb. 27 Verlauf der Trepanation in den Bildern a-e dargestellt

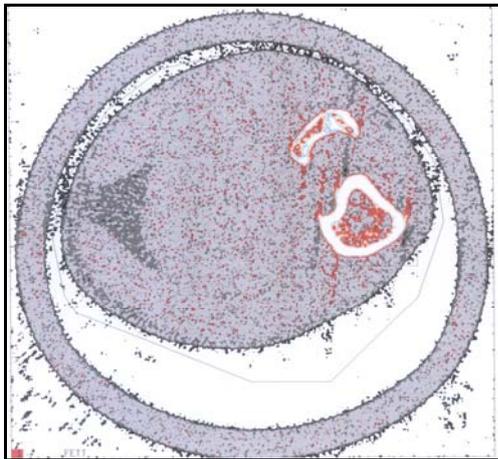
6.2 CT-Schnittbilder der einzelnen Gruppen



a)

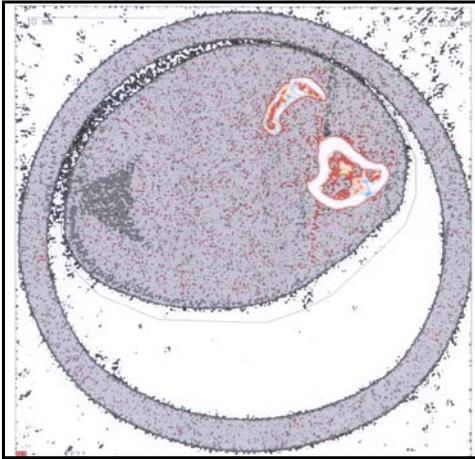


b)

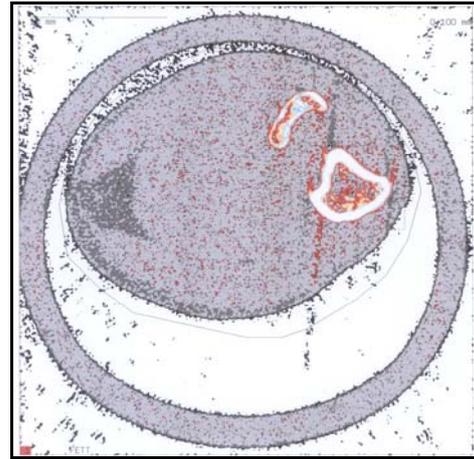


c)

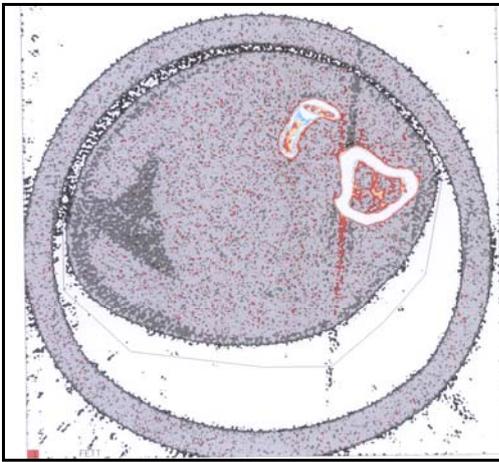
Abb. 28 pQCT Bilder der SF-Gruppe 2 (a),3 (b) und 8 (c) Wochen nach Trepanation



a)

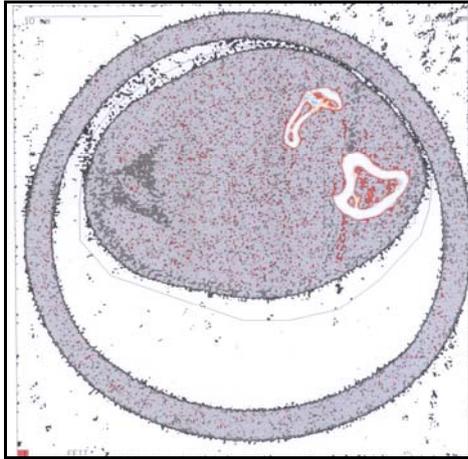


b)

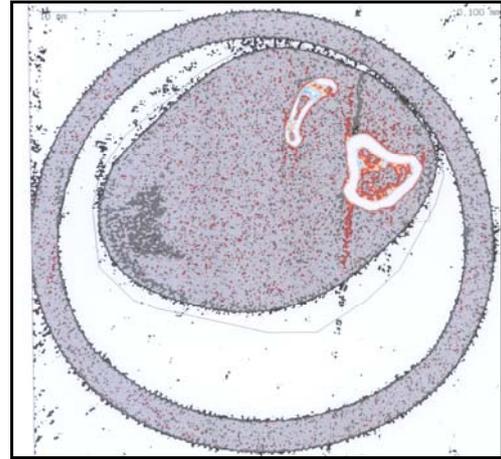


c)

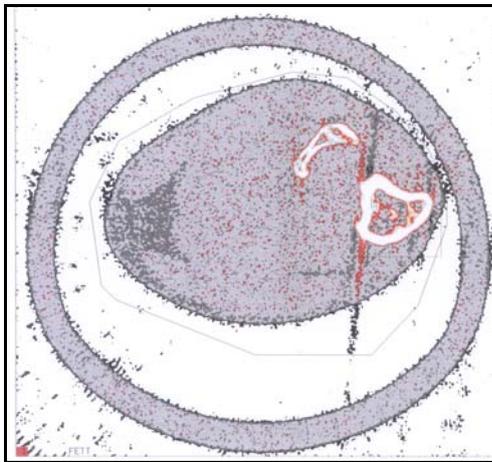
Abb. 29 pQCT Bilder der DHT-Gruppe 2 (a),3 (b) und 8 (c) Wochen nach Trepanation



a)

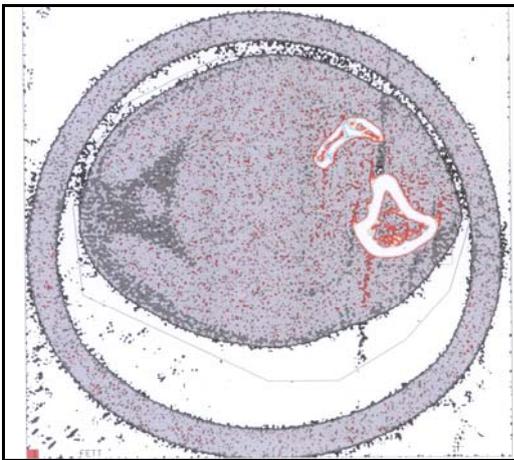
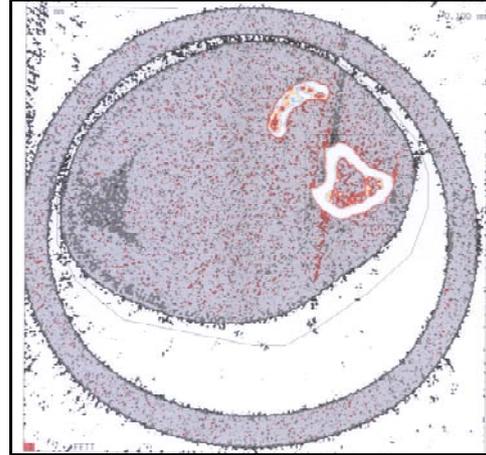
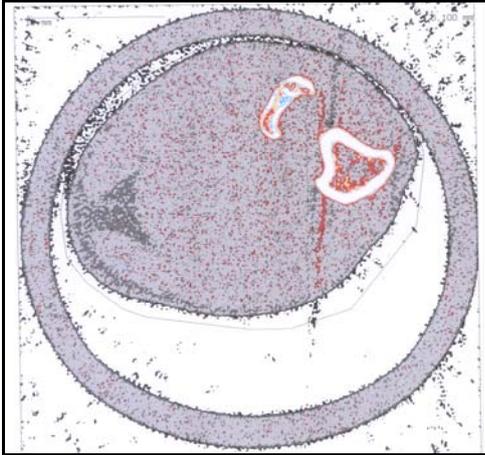


b)



c)

Abb. 30 pQCT Bilder der E2-Gruppe 2 (a),3 (b) und 8 (c) Wochen nach Trepanation

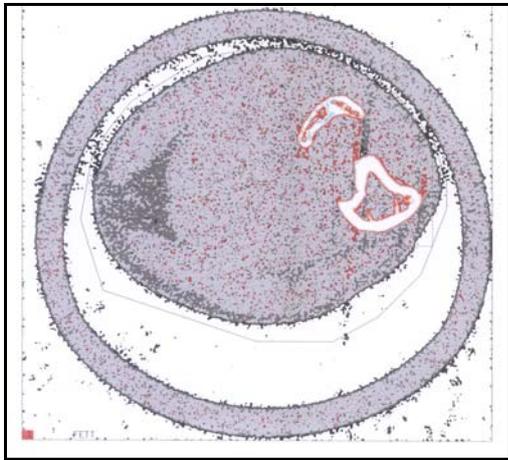
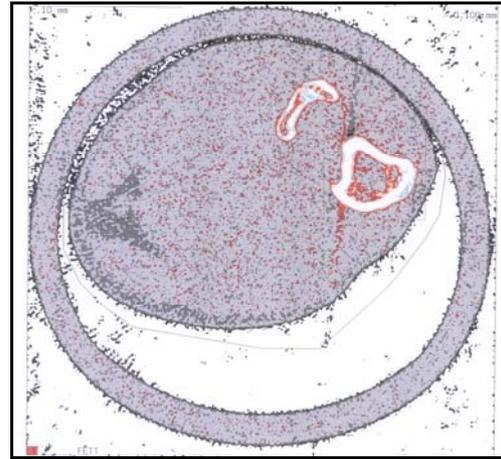
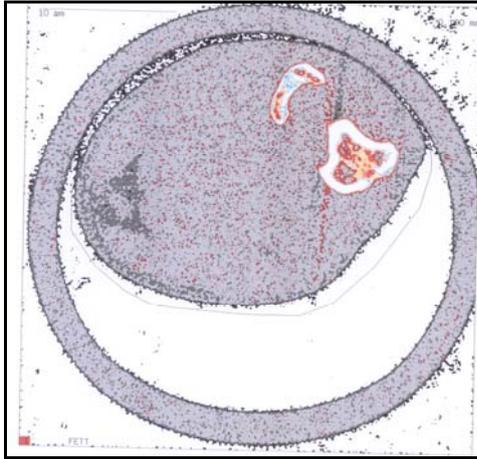


a)

b)

c)

Abb. 31 pQCT Bilder der Gen-Gruppe 2 (a),3 (b) und 8 (c) Wochen nach Trepanation



c)

Abb. 32 pQCT Bilder der EQ-Gruppe 2 (a),3 (b) und 8 (c) Wochen nach Trepanation

7. Tabellenverzeichnis		Seite
Tab. 1	Parameter für die Serumdiagnostik der Osteoporose	5
Tab. 2	Vergleich der Heilungsstadien der sekundären Knochenheilung beim Menschen nach Bohndorf et al. (2006) mit denen der männlichen Wistar- Ratte nach Kussar et al. (2001)	8
Tab. 3	Applikation der Testsubstanzen	16
Tab. 4	Durchschnittliche Substanzaufnahme über den gesamten Versuchszeitraum	16
Tab. 5	Durchschnittliche Substanzaufnahme pro Tag	16
Tab. 6	Futteraufnahme vor und nach Futtertausch und durchschnittlich aufgenommene Substanzmenge	25

8. Abbildungsverzeichnis		Seite
Abb. 1	Altersentwicklung der Bundesrepublik Deutschland ab 1950 hochgerechnet bis 2050	2
Abb. 2	Zeitlicher Versuchsablauf	15
Abb. 3	Verteilung von Muskel- und Fettgewebe an den verschiedenen tibialen Messebenen	17
Abb. 4	Positionierung der narkotisierten Ratte für die CT- Messung	18
Abb. 5	1. Übersichtsscan. 2. Dichteskala der erfassten Strukturen	19
Abb. 6	Trepanation der Metaphyse	20
Abb. 7	Darstellung eines Trepanationskanals in der Tibia zwei Wochen nach durchgeführter Trepanation	22
Abb. 8	Futteraufnahme der einzelnen Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum	24
Abb. 9	Gewichtsentwicklung der Tiergruppen über den Versuchszeitraum	26
Abb. 10	Delta Körpergewicht 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch	27
Abb. 11	Veränderung der Muskelfläche des Unterschenkels 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch	28
Abb. 12	Veränderung des paratibialen Fettanteils 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch	29
Abb. 13	Veränderungen der Spongiosadichte 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch	31
Abb. 14	Veränderung der endostalen Fläche 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch	32
Abb. 15	Veränderung der metaphysären Kortikalisdichte 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch	33
Abb. 16	Veränderung der Kortikalisfläche 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch	34
Abb. 17	Veränderung des endostalen Umfangs 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch	35
Abb. 18	Veränderung des periostalen Umfangs 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch	36
Abb. 19	Veränderungen des metaphysären Widerstandmoments 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch	37

Abb. 20	Veränderung der Serum- Cross-Laps 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch	38
Abb. 21	Veränderung des Serum- Osteokalzins 2(a), 3(b) und 8(c) Wochen nach Futtertausch	39
Abb. 22	Veränderung des Prostatagewichts 8 Wochen nach Futtertausch	40
Abb. 23	Schematische Darstellung des Knochens mit Bohrkanal.	43
Abb. 24	Veränderung des Knochenumfangs durch den Substanzverlust der Bohrung	44
Abb. 25	CT- Bilder der SF- Gruppe zwei Wochen nach Trepanation	56
Abb. 26	Die neu entstandene Knochensubstanz scheint ihren Ursprung von der Kortikalis zu nehmen (SF- Gruppe zwei Wochen nach Trepanation	57
Abb. 27	Verlauf der Trepanation in den Bildern a-e dargestellt	60
Abb. 28	pQCT Bilder der SF-Gruppe 2(a),3(b) und 8 (c) Wochen nach Trepanation	61
Abb. 29	pQCT Bilder der DHT-Gruppe 2(a),3(b) und 8 (c) Wochen nach Trepanation	62
Abb. 30	pQCT Bilder der E2-Gruppe 2(a),3(b) und 8 (c) Wochen nach Trepanation	63
Abb. 31	pQCT Bilder der Gen-Gruppe 2(a),3(b) und 8 (c) Wochen nach Trepanation	64
Abb. 32	pQCT Bilder der EQ-Gruppe 2(a),3(b) und 8 (c) Wochen nach Trepanation	65

9. Literaturverzeichnis

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

Araujo AB, Travison T, Bhasin S, Esche GR, Williams RE, Clark RV, McKinlay JB (2008): Association of testosterone and estradiol with age- related declines in physical function in a diverse sample of men. *J Am Geriatr Soc*; 56, 2000-2008.

Augat P, Simon U, Liedert A, Claes L (2004): Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporos Int* 16, 36-43

Banu J, Wang L, Kalu ND (2002): Age- relate Changes in Bone Mineral Content and Density in Intact Male F344 Rats. *Bone* 30,125-130

Barrois C, Brostrom LA, Stark A, Wallheim G (1993): Healing complications after internal fixation of trochanteric hip fractures: the prognostic value of osteoporosis. *J Orthop Trauma* 7, 438-442

Bhasin S, Calof OM, Storer TW Lee ML, Mazer NA, Jasuja R, Montori VM, Gao W, Dalton JT (2006): Drug insight: testosterone and selective androgen receptor modulators as anabolic therapies for chronic illness and aging. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2, 146-159

Blouin K, Richard C, Belanger C, Dupont P, Daris M, Laberge P, Luu-The V, Tchernof A (2003): Local androgen inactivation in abdominal visceral adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 88,5944-50

Bohndorf K, Imhof H, Fischer W: *Radiologische Diagnostik der Knochen und Gelenke*; Thieme Verlag, Stuttgart 2006, 23

Bühling KJ, Friedmann W, Büscher U, Schwarz JD, Heinrich W, Kemper I, Klapp C, Kleine-Tebbe A, Lübke M, Medenbach S, Pilz B, Schmieder A, Sehouli J, Sidor J, Siemann A, Sonntag J, Tennhardt C: *Intensivkurs: Gynäkologie und Geburtshilfe* 1. Auflage; Urban und Fischer Verlag, München, Jena 2004 22-28

Cheng Z, Rios GR, King CD, Coffman BL, Green MD, Mojarrabi B, Mackenzie PI, Tephly TR (1998): Glucuronidation of catechol estrogens by expressed human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 1A1, 1A3, and 2B7. *Toxicol Sci* 45, 52-57.

Christoffel J: Das endokrine Potential von Genistein, Resveratrol und 8- Prenylnaringenin in der Gonaden- und Schilddrüsenachse und assoziierten Organen. Med. Diss. Göttingen 2004

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

Cos P, De Bruyne T, Apers S, Vanden Berghe D, Pieters L, Vlietinck AJ, (2003): Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med* 69, 589-99

Crisafulli A, Altavilla D, Marini H, Bitto A, Cucinotta D, Frisina N, Corrado F D`Anna R, Squadrio G, Adamo EB, Marini H, Bitto A, Cancellieri F, Buemi M, Squadrito F (2005): Effects of the Phytoestrogen genistein an cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *Menopause* 12,186-92

Deutzmann R, Bruckner-Tuderman L, Bruckner P: Binde- und Stützgewebe in: Löffler G, Petrides PE: *Biochemie und Pathobiochemie* 7. Auflage; Springer- Verlag Berlin Heidelberg New York 2003, 776

Decroos K, Vanhemmens S, Cattoir S, Boon N, Verstraete W (2005): Isolation and characterisation of an equol- producing mixed microbial culture from the human faecal sample and ist activity under gastrointestinal conditions.

Arch Microbiol 183(1), 45-55

Du Z, Chen J, Yan F, Xiao Y (2009): Effect of Simvastatin on bone healing around titanium implants in osteoporotic rats. *Clin Oral Impl Res* 20,145-150

Egermann M, Goldhahn J, Schneider E (2005): Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int* 16, 129-138

Erben RG (2001): Skeletal effects of androgen withdrawl. *J Musculoskel Neuron Interact* 1, 225-233

Eastell R (2005): Role of oestrogen in the regulation of bone turnover at the menarche. *J Endocrinol* 185, 223-34

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

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

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

Garnero P, Delmas PD (1999): Biochemical markers of bone turnover: clinical usefulness in osteoporosis. *Ann Biol Clin (Paris)* 57,137-48

Guglielmi G, Lang TF (2002): Quantitative Computed Tomography. *Semin Musculoskelet Radiol* 6, 219-27

Hansson P, Saggerson D, Nilsson- Ehle P (1991): Sex difference in triglyceride/fatty acid substrate cycling of rat adipose tissue: indirect regulation by androgens. *Horm Metab Res* 23, 465-8

Heine Pa, Taylor Ja, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS (2000): Increased adipose tissue in male rat and female estrogen receptor- α knockout mice. *Proc Natl Acad Sci* 97, 12729-12734

Helterbrand JD, Higgs RE Jr, Iversen PW, Tysarczyk- Niemeyer G, Sato M (1997): Application of automatic image segmentation to tibiae and vertebrae from ovariectomized rats. *Bone* 21,401-9

Henne-Bruns D,Dürig M, Kremer B, Chirurgie. Thieme Verlag, Stuttgart 2003, 1077-1078

Herold G, Alani S, Beckers H, Braun PR, Deuss U, Drexler H, Faber L, Gwaz M, Germing U, Hagenström H, Harten P, Heintges T, Höning W, Janssen A, Kaemmerer H, Kindler J, Krebs P, Mellwig KP, Mellinghoff A, Mödder G, Moll S, Oette M, Sauer W, Schmidt KH, Weber AA (2005): Innere Medizin- Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Gerd Herold und Mitarbeiter, Köln 2005 655-658

Ishimi Y (2010): Dietary Equol and Bone Metabolism in Postmenopausal Japanese Women and Osteoporotic Mice *J Nutr* 140, 1373- 1376

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

Jankowska EA, Rogucka E, Medras M, Welon Z. (2000): Relationship between age-related changes of sex steroids, obesity and body fat distribution among healthy Polish males. *Med Sci Monit* 6, 1159-64

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

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

Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yao S, Simpson ER (2000): Aromatase deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci* 97, 12735-12740

Jundt G: Knochen, in Böcker W, Denk H, Heitz Ph U: Pathologie 4. Auflage; Urban und Fischer, München 2008 1057-1086

Kanis JA (2002): Diagnosis of osteoporosis and assesment of frakture risk. *Lancet* 359, 1929-36

Kanno S, Hirano S, Kayama F (2004): Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3- E1 cells. *Toxicology* 196,137-45

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

Kolios L, Sehmisch S, Daub F, Rack T, Tetzval M, Stürmer KM, Stürmer EK (2009): Equol but not Genistein Improves Early Metaphysial Fracture Healing in Osteoporotic Rats. *Planta Med* 75, 459-469

Konsensuskonferenz (1996): 1996 World Congress on Osteoporosis. Amsterdam, The Netherlands, 18- 23 May 1996. *Osteoporos Int* 6, 84- 351

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 receptor alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863-70

Kussar PIu, Piirsoo AO, Miartson AA, Toom AA, Khaviko TI, Khussar IuP (2001): Posttraumatic repair of the tibia in rats. *Morphologia* 120,84-91

Legette LL, Martin BR, Shahnazari M, Lee WL, Helferich WG, Quian J, Waters DJ, Arabshahi A, Barnes S, Welch J, Bostwick DG, Weaver CM (2009): Supplemental Dietary Racemic Equol Has Modest Benefits to Bone but Has Mild Uterotropic Activity in Ovariectomized Rats. *J Nutr* 10, 1908-1913

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

Löffler G, Petrides PE: *Biochemie & Pathobiochemie*. 7. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2003.

Lovejoy JC (2003): The menopause and obesity. *Prim Care* 30,317-25

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

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

Mellström D, Vandenput L, Mallmin H, Holmberg aH, Lorentzin M, Oden A, Johansson H, Orwoll ES, Labrie F, Karlsson MK, Ljunggeren Ö, Ohlsson C (2008): Older man with low Serum Estradiol and High Serum SHBG Have an Increased Risk of Fractures. *J Bon Min Res* 23, 1552-1560

Minamida K, Ota K, Nishimukai M, Tanaka M, Abe A, Stone T, Tomita F, Hara H, Asano K (2008): *Asaccharobacter celatus* gen. nov., sp. nov., isolated from rat caecum. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1238-1240

Mirani H, Minutoli L, Polito F, Bitto A, Altavilla D, Atteritano M, Gaudio A, Mazzaferro S, Frisina A, Frissina N, Lubrano C, Bonaiuto M, D`Anna R, Cannata ML, Corrado F, Adamo EB, Wilson S, Squadrito F (2007): Effects of the Phytoestrogen Genistein on Bone Metabolism in Osteopenic Postmenopausal Women. *Ann Intern Med* 146, 1-36

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

Neidlinger-Wilke C, Stalla I, Claes L, Brand R, Hoellen I, Rübenacker S, Arand M, Kinzl L (1995): Humans osteoblasts from younger normal and osteoporotic donors show differences in proliferation and TGF beta-release in response to cyclic strain. *J Biomech* 28, 1411-8

Niethard FU, Pfeil J: *Orthopädie* 4. Auflage Thieme Verlag, Stuttgart 2003, 146-312

Norman AW, Henry HL: Steroid nomenclature; in: Encyclopedia of Hormones, Norman W and Henry HL, Version 3, Academic Press, Elsevier Inc., San Diego/ USA 2003, 410-413

Orwoll ES (2003): Men, bone and estrogen: unresolved issues. *Osteoporos Int* 14, 93-98

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

Pfeilschifter J (2006): Osteoporose Update. *Osteologie* 15, 220-225

Raspe A, Matthis C, Scheidt- Nave C, Raspe H (1998):j European Study of Vertebral Osteoporosis (EVOS): design and implementation in 8 German study centres. *Med Klin (Munich)* 9312-16, 18

Rowland IR, Wiseman H, Sanders TA, Adlercreutz H, Bowey EA (2000): Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equolproduction by the gut microflora. *Nutr Cancer* 36(1),27-32

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

Schuldt A: Einfluss der Phytoöstrogene Genistein, Resveratrol und 8- Prenylnaringenin auf den Knochen und das Fettgewebe der männlichen Ratte. Med. Diss. Göttingen 2006

Seidlova- Wuttke D, Jarry H, Becker T, Christoffel V, Wuttke W (2003 a) Pharmacology of Cimicifuga racemosa extract BNO 1055 in rats : bone, fat and uterus. *Maturitas* 44, 39-50

Seidlova- Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V Spengler B, Becker T, Wuttke W (2003 b): Evidence of selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (Cimicifuga racemosa) extract: comparison with estradiol- 17beta. *Eur J Endocrinol* 149, 351-62

Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Pitzel L, Wuttke W (2004): Effects of estradiol 17 β , testosterone and black cohosh preparation on bone and prostate in orchidectomized rats. *Maturitas* 51, 177-186

Seidlova-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. *Maturitas* 55, 64-74

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

Setchell KD, Lydeking- Olsen E (2003): Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr* 78, 593-609

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

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

Sims Na, Clement- Lacroix P, Minet D (2003): A functional androgen receptor is not sufficient to allow estradiol to protect bone after gonadectomy in estradiol receptor- deficient mice. *J Clin Invest* 111, 1319-27

Sliwinski L, Folwarczana J, Janiec W, Gryniewicz G, Kuzyk K (2005): Differential effects of genistein, estradiol and raloxifene on rat osteoclasts in vitro. *Pharmacological Reports* 57, 352-359

Spelsberg TC, Subramaniam M, Riggs BL, Khosla S (1999): The action and interaction of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. *Mol Endocrinol* 13, 819-28

Statistisches Bundesamt, Wiesbaden (2006): Bevölkerung Deutschland bis 2050, Artikelnummer: 5124202069005. (<https://www-c.destatis.de/csp/shop/sfg/bpm.html.cms.cBroker.cls?cmspath=struktur,vollanzeige.csp&ID=1019440>)

Stephens FO (1997): Breast cancer: aetiological factors and associations (a possible protective role of phytoestrogens). *Aust N Z J Surg.* 67,755-60

Stock H, Schneider A, Strauss Elton (2004): Osteoporosis a Disease in Men. *Clin Orthop Relat Res* 425, 143-151

Stolze M: Der Einfluss von Testosteron, estradiol und Substanzen mit endokrinen Disruptor-Eigenschaften auf den Knochen- und Fettstoffwechsel des Mannes am Beispiel der männlichen Ratten. *Med. Diss. Göttingen 2007*

Stürmer EK, Seidlova-Wuttke D, Sehmisch S, Rack T, Wille J, Frosch KH, Wuttke W, Stürmer KM (2006): Standardized Bending and Breaking Test for the Normal and Osteoporotic Metaphyseal Tibias of the Rat: Effect of Estradiol, Testosterone and Raloxifene. *J Bone Miner Res.* 21, 89-96

Stürmer EK, Sehmisch S, Tezval M, Tezval H, Rack t, Boeckhoff J, Wuttke W, Herrmann TRW, Seidlova Wuttke D, Stürmer KM (2009): Effect of testosterone, raloxifene and estrogen replacement on the microstructure and biomechanism of metaphyseal osteoporotic bones in orchietomized male rats. *World J Urol* 27, 547-555

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

Tamura M, Tsushida T, Shinohara K(2007): Isolation of an isoflavone- metabolizing, Clostridium- like bacterium, strain TM- 40, from human faeces. *Anaerobe* 13, 32-35

Tham DM, Christopher D, Gardner D, Haskell WL (1998): Potential health benefit of dietary phytoestrogens: A review of the clinical, epidemiological and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 2223-2235

Vandenput L, Boonden S, van Herck E, Swinnen JV, Bouillon R, Vanderschueren D (2002): Evidence From the Aged Orchidectomized Male Rat Model That 17 β -Estradiol Is a More Effective Bone-Sparing and Anabolic Agent Than 5 α -Dihydrotestosterone, *J Bone Miner Res* 17, 2080-2086

Vanderschueren D, Herck E, Scot P, Rush E, Einhorn T, Geusens P, Bouillon R (1993) :The aged male rat as a model for human osteoporosis: Evaluation by nondestructive measurements and biomechanical testing. *Calcif Tissue Int* 53, 342-347

Vanderschueren D, Boonen S, Ederveen AG, Van Herck E, Moermans K, Vandenput L, Verstuyf A, Bouillon R (2000 a): Skeletal effects of deficiency as induced by an aromatase inhibitor in an aged male rat model. *Bone* 27, 611-7

Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, van Herck E, Swinnen JV, Bouillon R (2000 b): An Aged Rat Model of Partial Androgen Deficiency: Prevention of Both Loss of Bone and Lean Body Mass by Low- Dose Androgen Replacement. *Endocrinology* 5, 1642-1647

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

van Patten CL, Olivotto IA, Chambers GK, Gelmon KA, Hislop TG, Templeton E, Wattie A, Prior JC (2002): effect of soy phytoestrogens on hot flashes in postmenopausal women with breast cancer: a randomized, controlled clinical trial; *J Clin Oncol*; 15, 1449-55

Vermeulen A (2000): Andropause. *Maturitas* 34, 5-15

Wangen KE, Duncan AM, Xu X, Kurzer MS (2001): Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 73, 225-31

Weaver CM, Legette LL (2010): Equol, via Dietary Sources or Intestinal Production, May Ameliorate Estrogen Deficiency- Induced Bone Loss. *J Nutr* 140, 1377-1379

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

Wronski TJ, Cintron M, Dann LM (1988): Temporal relationship between bone loss and increased boneturnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 43, 179-83

Wüster C, Ziegler R: Metabolische Knochenerkrankungen: in: Thieme Innere Medizin, Alexander K, Daniel WG, Diener HC, Freund M, Köhler H, Matern S, Maurer HH, Michael BA, Nowak D, Risler T, Schaffner A, Scherbaum WA, Sybrecht GW, Wolfram G, Zeitz M; Georg Thieme Verlag Stuttgart 1999, 350-373

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

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

Yamaguchi M, Weitzmann MN (2009): The estrogen 17 beta-estradiol and phytoestrogen genistein mediate defferential effects an osteoblastic NF-kappa B activity. *Int J Mol Med* 23, 297-301

Zanner R. :Knochen in Junqueira LC, Carneiro J: *Histologie.* 5. Auflage; Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 2002 93-105

Danksagung

Meinem Doktorvater 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 Dr. med. MUDr. Dana Seidlova-Wuttke für die herzliche und hilfsbereite Zusammenarbeit während der gesamten Studie sowie für die unermüdliche und ausführliche Beantwortung all meiner Fragen.

Ganz besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Dr. med. G. Wiese für die originelle Ausarbeitung und Durchführung der Trepanation sowie für die konstruktive Kritik und die vielen weiterführenden Ratschläge.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für experimentelle Endokrinologie bedanken; besonders großer Dank gilt hierbei Priya Kapur, Sabine Lüdemann, Sabine Niebert und Antje Ahrbecker für die große Unterstützung während der Versuchsdurchführung.

Großer Dank gilt auch meiner Freundin Katharina Zachert, die mir mit sehr viel Rat und Unterstützung beistand. Ebenfalls danke ich Johanna Temme und meinem Bruder Markus, die mit großer Sorgfalt und Geduld meine Arbeit korrekturgelesen haben.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir diese Dissertation ermöglicht haben

Lebenslauf

Am 23 November 1980 wurde ich, Tassilo Christian Kunzmann, als Sohn der Allgemeinärztin Christa Kunzmann und des Künstlers Norman Will-Kerry in München geboren.

Von 1987 bis 1991 besuchte ich die Grundschule in München. Nach einem Jahr auf der Hauptschule in Weilheim wechselte ich 1992 auf das Benediktiner Gymnasium Ettal, wo ich 2001 die Allgemeine Hochschulreife erlangte.

Bis zur Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen im April 2002 arbeitete ich als Sanitäts-Helfer und an einem Musik-Projekt mit der Band Tubestar. Nach vier Vorklinischen Semestern absolvierte ich im Wintersemester 2003/2004 mein Physikum und nach weiteren acht Semestern im Sommer 2008 mein Examen.

In der Arbeitsgruppe für experimentelle Endokrinologie in Göttingen fertigte ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. W. Wuttke von Herbst 2008 bis Herbst 2009 meine Dissertationsarbeit an. In dieser Zeit arbeitete ich als wissenschaftliche Hilfskraft in dieser Abteilung.

Seit Februar 2010 arbeite ich als Assistenzarzt in der Abteilung für Nephrologie und Rheumatologie im Klinikum der Universität Göttingen