

Institut für Physiologie, Biochemie und Hygiene der Tiere
Abteilung Biochemie
Prof. Dr. B. Schmitz

Einfluss einer oralen L-Argininhydrochlorid-Supplementation
auf den Knochenstoffwechsel gesunder postmenopausaler Frauen

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Ernährungs- und Haushaltswissenschaften
(Dr.oec.troph.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt im März 2003

von

Natalie Bäcker

aus

Nideggen

Referent:	Frau Prof. Dr. B. Schmitz
Korreferenten:	Herr PD Dr. A. Zittermann Herr Prof. Dr. R. Gerzer
Tag der mündlichen Prüfung:	01. August 2003
Gedruckt bei:	D 98

Zusammenfassung:

Einfluss einer oralen L-Argininhydrochlorid-Supplementation auf den Knochenstoffwechsel gesunder postmenopausaler Frauen

Einleitung: Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen eine positive Wirkung des freien Radikals Stickstoffmonoxid auf den Knochenstoffwechsel. Der Stickstoffmonoxidbestand des Organismus kann durch Gabe pharmakologischer NO-Donoren erhöht werden. Erste Humanexperimente bestätigen einen positiven Einfluss einer NO-Donoren-Applikation auf den Knochenstoffwechsel. Andererseits kann eine orale Supplementation des Stickstoffmonoxid-Vorläufers L-Arginin ebenfalls zu einer Erhöhung der NO-Produktion führen und scheint zudem, im Gegensatz zu den NO-Donoren, in Mengen bis 30 g frei von unerwünschten Wirkungen zu sein. Zudem führt eine orale Supplementation von L-Arginin zu einer signifikanten Steigerung der IGF 1 Konzentration, was ebenfalls einen positiven Einfluss auf den Knochenstoffwechsel ausübt.

Ziel: In der vorliegenden Studie wurde daher die Auswirkung einer sechsmonatigen Supplementation von 18 g L-Argininhydrochlorid auf den Knochenstoffwechsel postmenopausaler gesunder Frauen in einer ambulant durchgeführten Studie untersucht.

Methode: 30 gesunde postmenopausale Frauen, aufgeteilt auf zwei Gruppen à 15 Probandinnen, nahmen an der Untersuchung teil. Die Verumgruppe (54,5 ± 4,1 Jahre, 66,3 ± 10,5 kg) erhielt über sechs Monate eine tägliche Supplementation mit 18 g L-Argininhydrochlorid (14,8 g freies L-Arginin), die Placebogruppe (55,3 ± 4,4 Jahre, 64,2 ± 9,1 kg) erhielt 18 g Dextrose. Um exogene Einflussfaktoren auszuschließen wurden die Probandinnen gebeten ihre Essgewohnheiten und die sportliche Aktivität während des Studienzeitraumes nicht zu verändern. Zur Überprüfung wurden die Ernährungsgewohnheiten und die sportliche Aktivität innerhalb des Studienzeitraumes dokumentiert. Zur Kontrolle der L-Arginin-Einnahme wurde als „Compliance“-Parameter die Gesamtstickstoff-Exkretion zweier aufeinanderfolgender 24 Stunden-Urine zu Beginn, sowie nach zwei, vier und sechs Monaten, bestimmt. Zur Analyse von IGF 1, den Knochenformationsmarkern PICP, bAP und Osteocalcin, dem Knochenresorptionsmarker CTX, sowie Parathormon und Serum-Calcium wurden ebenfalls zu Beginn der Studie sowie nach zwei, vier und sechs Monaten Blutproben entnommen. Zudem wurde zu Beginn und zum Ende der Supplementation sowie nach insgesamt einem Jahr das trabekuläre und kortikale Knochenkompartiment von Radius und Tibia mittels peripherer quantitativer Computertomographie gemessen. Desweiteren wurden Parameter zur Beurteilung der Muskelkraft erfasst.

Ergebnisse: Die Probandinnen änderten weder ihre Essgewohnheiten, noch traten Veränderungen der sportlichen Aktivität während des Studienzeitraumes auf. Wie erwartet stieg die Gesamtstickstoff-Exkretion der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe signifikant an. Anhand der Biomarker des Knochenstoffwechsels konnten in diesem Experiment keine Veränderungen durch die L-Argininhydrochlorid-Supplementation beobachtet werden. Die Ergebnisse der pQCT-Messung zeigten ausschließlich bei der Messung der Kortikalisdicke des Radius eine supplementationsbedingte Erhöhung in der Verumgruppe. Zudem wurde keine Erhöhung der IGF 1-Konzentration durch die Supplementation ermittelt.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse zeigen, dass eine Supplementation mit L-Argininhydrochlorid nicht den einer NO-Donoren-Applikation vergleichbaren Effekt auf den Knochenstoffwechsel postmenopausaler Frauen ausübt. Einzig die Kortikalisdicke des Radius zeigte eine supplementationsbedingte Erhöhung in der Verumgruppe. Da kein Anstieg der IGF 1-Konzentration aufgrund der L-Argininhydrochlorid-Supplementation gemessen wurde, konnte zudem kein IGF 1-vermittelter Effekt auf den Knochenstoffwechsel erfolgen. Daher sollten mögliche Faktoren, die zu dieser reduzierten Wirkung geführt haben könnten, in Folgestudien untersucht werden um die Wirkung der Aminosäure auf den Knochenstoffwechsel zu verbessern.

Abstract:

Effect of an oral supplementation with L-argininehydrochloride on bone metabolism of healthy postmenopausal women

Introduction: Recent experimental studies indicate that nitric oxide (NO) is an important regulator of bone turnover by exerting an anabolic effect on bone cell activity. The NO-level of the human body can be elevated through application of pharmacological NO-donors. The first human trials conducted showed a positive effect of an NO-donor application on the metabolism of human bones. On the other hand L-arginine, the natural precursor of NO-synthesis, is also able to enhance NO-production and, in contrast to NO-donors, seems -in amounts to 30 g- to be free of undesirable effects. Furthermore, an oral L-arginine supplementation causes a significant increase in IGF 1 release, which also has a positive effect on bone metabolism.

Objective: The purpose of this study was to examine the effect of a six-month daily oral supplementation with 18 g L-argininehydrochloride on the bone metabolism of healthy postmenopausal women.

Method: Thirty healthy postmenopausal women, divided into two groups, took part in this study. One group (54.5 ± 4.1 years, 66.3 ± 10.5 kg) received a six-month daily oral supplementation with 18 g L-argininehydrochloride (i.e. 14.8 g free L-arginine). The other fifteen volunteers (55.3 ± 4.4 years, 64.2 ± 9.1 kg) obtained 18 g dextrose as placebo. To eliminate exogen influencing factors the volunteers were asked not to change their activity or eating behavior during the study. For checking purposes nutritional intake and physical activity were documented in protocols during the study. 24-hour urinary excretion of nitrogen, as an indicator for compliance, was analysed for two days at baseline and after two, four and six months. For the analysis of IGF 1, bone formation markers PICP, bAP, osteocalcin, the bone resorption marker CTX as well as for parathyroid hormone and serum-calcium blood was drawn at baseline and after two, four and six months of supplementation. pQCT measurements were performed at trabecular and cortical sites of radius and tibia at baseline, after six months and after one year.

Results: Volunteers did not change their eating behavior or physical activity during the six months of intervention. As expected, nitrogen excretion rose in the group with L-argininehydrochloride supplementation and remained constant in the placebo group. Biomarkers of bone metabolism did not change following the L-argininehydrochloride supplementation. The results from the pQCT-measurement showed a change at cortical bone site of the radius in the L-arginine group, but no significant changes were observed at any other site. A change in IGF 1 concentration due to the L-argininehydrochloride supplementation was also not evident.

Conclusion: The results show that a supplementation with L-argininehydrochloride is not as effective as an application of NO-donors to influence bone metabolism of postmenopausal women. Alone the cortical thickness of the radius showed a significant increase due to the supplementation. Furthermore in view of the fact that no change in IGF 1 concentration was observed, it was evident that there could be no IGF 1 dependent influence on bone metabolism. Therefore potential factors, which led to the reduced effect, should be checked in following studies, to intensify the impact of the amino acid L-arginine on bone metabolism.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AK	Antikörper
B0	maximale Bindung
bAP	knochenspezifische alkalische Phosphatase
BMD _{trab}	trabekuläre Knochendichte
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BMD _{kort}	kortikale Knochendichte
BMC _{trab}	trabekuläre Knochenmasse
BMC _{kort}	kortikale Knochenmasse
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CA	kortikale Knochenquerschnittsfläche
Ca ²⁺	Calcium
cm	Zentimeter
cNOS	konstitutive Stickstoffmonoxid-Synthase
CSA _{tot}	Gesamtquerschnittsfläche
CTX	Typ 1 Kollagen C-terminales Crosslink Telopeptid
d.h.	dass heißt
DLR	Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FAD	Flavinadenindinukleotid
FFQ	Food frequency questionnaire
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm
h	Stunde
IGF 1	Insulin-like growth factor 1
IGF 2	Insulin-like growth factor 2
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
kg	Kilogramm
KH	Kohlenhydrate
L	Liter
m	Meter
mg	Milligramm
MJ	Megajoule
Muskel CSA	Muskelquerschnittsfläche
n	Stichprobenumfang
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Nitrit
NO ₃	Nitrat

Abkürzungsverzeichnis

NSB	nichtspezifische Bindung
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PICP	Carboxyterminales Propeptid des Typ 1 Prokollagens
pmol	picomol
pQCT	periphere quantitative Computertomographie
PTH	Parathormon
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SGOT	Serum Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
SGPT	Serum Glutamat-Pyruvat-Transaminase
SSI	Strength-Strain-Index
STH	Somatotropin
TA	Totalaktivität
z. B.	zum Beispiel
γ GT	gamma-Glutamyl-Transferase
μ g	Mikrogramm

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
2 Thematische Einführung	4
2.1 Stoffwechsel und Morphologie des Knochens	4
2.2 Aufbau und Erhalt der Knochenmasse	6
2.3 Postmenopausale Osteoporose	6
2.4 Stickstoffmonoxid als mögliches Regulatormolekül des Knochenstoffwechsels	8
2.4.1 Stickstoffmonoxid-Donoren und Knochenstoffwechsel	10
2.4.2 L-Arginin und Knochenstoffwechsel	13
2.5 Einfluss des Somatotropins auf den Knochenstoffwechsel	16
2.6 Messung der Veränderungen des Knochenstoffwechsels	17
2.6.1 Biomarker des Knochenstoffwechsels	18
2.6.1.1 Typ 1 Kollagen C-terminales Crosslink Telopeptid (CTX)	18
2.6.1.2 Carboxyterminales Propeptid des Typ 1 Prokollagen (PICP)	18
2.6.1.3 Knochenspezifische alkalische Phosphatase (bAP)	18
2.6.1.4 Intaktes Osteocalcin	19
2.6.1.5 Parathormon (PTH)	19
2.6.2 Messung der Knochenstruktur und Knochendichte	20
2.7 Messung der Muskelkraft	20
2.8 Fragestellung dieser Arbeit	21
3 Material und Methoden	22
3.1 Versuchsdesign	22
3.1.1 Ethikkommission	22
3.1.2 Einschlussuntersuchung	22
3.1.3 Probandenkollektiv	23
3.1.4 Experimentablauf	24
3.1.5 Verum- und Plazebopräparat	25
3.1.6 Blutabnahmen	25
3.1.7 Urinabgaben	26
3.1.8 Körpergewicht	26
3.1.9 Ernährungsfragebogen	26
3.1.10 Aktivitätsprotokoll	27
3.2 Bestimmungsmethoden	27
3.2.1 Typ 1 Kollagen C-terminales Crosslink Telopeptid (CTX)	27
3.2.2 Carboxyterminales Propeptid des Typ 1 Prokollagen (PICP)	28

3.2.3	Knochenspezifische alkalische Phosphatase (bAP)	29
3.2.4	Intaktes Osteocalcin	30
3.2.5	Parathormon (PTH)	30
3.2.6	Insulin-like growth factor 1 (IGF 1)	31
3.3	Transformiertes Calcium	32
3.4	Gesamtstickstoff-Analyse	32
3.5	Messung der Knochenstruktur und Knochendichte	33
3.5.1	Messung am Radius	33
3.5.2	Messung an der Tibia	34
3.5.3	Messung der Knochendichte	34
3.5.4	Messung der Knochenmasse	35
3.5.5	Messung der Knochengeometrie	35
3.6	Messung der Muskelkraft	35
3.6.1	Messung der Muskelfläche	35
3.6.2	Messung des Strength-Strain-Index (SSI)	35
3.6.3	Messung der Griffstärke	36
3.7	Statistik	37
4	Ergebnisse	39
4.1	Körpergewicht	39
4.2	Ernährungsfragebogen	39
4.3	Aktivitätsfragebogen	41
4.4	Stickstoffausscheidung	42
4.5	Messung der Muskelkraft	44
4.5.1	Muskelquerschnittsfläche (Muskel CSA) des Unterarms	44
4.5.2	Muskelquerschnittsfläche (Muskel CSA) des Unterschenkels	45
4.5.3	Strength-Strain-Index (SSI) des Radius	46
4.5.4	Strength-Strain-Index (SSI) der Tibia	47
4.5.5	Griffstärke	47
4.6	Biomarker des Knochen- und Calciumstoffwechsels	48
4.6.1	Typ 1 Kollagen C-terminales Crosslink Telopeptid (CTX)	48
4.6.2	Carboxyterminales Propeptid des Typ 1 Prokollagen (PICP)	49
4.6.3	Knochenspezifische alkalische Phosphatase (bAP)	51
4.6.4	Intaktes Osteocalcin	52
4.6.5	Parathormon (PTH)	53
4.7	Insulin-like growth factor 1 (IGF 1)	55
4.8	Transformiertes Calcium	56
4.9	Messung der Knochendichte, -masse und -geometrie	56
4.9.1	Messung der Knochendichte	56
4.9.1.1	Trabekuläre Knochendichte (BMD_{trab}) des Radius	56
4.9.1.2	Trabekuläre Knochendichte (BMD_{trab}) der Tibia	57
4.9.1.3	Kortikale Knochendichte (BMD_{kort}) des Radius	58

4.9.1.4	Kortikale Knochendichte (BMD_{kort}) der Tibia	59
4.9.2	Messung der Knochenmasse	60
4.9.2.1	Trabekuläre Knochenmasse (BMC_{trab}) des Radius	60
4.9.2.2	Trabekuläre Knochenmasse (BMC_{trab}) der Tibia	61
4.9.2.3	Kortikale Knochenmasse (BMC_{kort}) des Radius	62
4.9.2.4	Kortikale Knochenmasse (BMC_{kort}) der Tibia	63
4.9.3	Messung der Knochengeometrie	64
4.9.3.1	Gesamte Knochenquerschnittsfläche (CSA_{tot}) von Radius und Tibia	64
4.9.3.2	Kortikale Knochenquerschnittsfläche (CA) des Radius	65
4.9.3.3	Kortikale Knochenquerschnittsfläche (CA) der Tibia	66
4.9.3.4	Kortikalisdicke des Radius	67
4.9.3.5	Kortikalisdicke der Tibia	68
5	Diskussion	70
6	Zusammenfassung	87
7	Literaturverzeichnis	89
8	Anhang	106
9	Danksagung	112

1 Einleitung

Bei der Osteoporose handelt es sich um eine mit Fraktur einhergehende Verminderung von Knochenmasse, -struktur und -funktion (Consensus development conference, 1993). Besonders davon betroffen sind Frauen nach Beginn der Menopause, da hier durch ein Ungleichgewicht zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau verstärkt Knochen degradiert wird. Ohne entsprechende präventive Maßnahmen kann man davon ausgehen, dass jede dritte bis vierte Frau im Alter von 70 Jahren mindestens eine osteoporotische Fraktur erleidet (Gotte *et al.*, 2001). Die zur Zeit angewandten therapeutischen Maßnahmen gegen den altersbedingten Knochenabbau, wie eine Behandlung mit Östrogenen, Bisphosphonaten oder Fluoriden sind jedoch zum Teil nicht ohne Nebenwirkungen oder zeigen nur begrenzt Erfolge. Daher ist die Erforschung effektiver therapeutischer Maßnahmen dringend erforderlich und auch gesellschaftlich von besonderer Relevanz.

Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen eine positive Wirkung des freien Radikals Stickstoffmonoxid (NO) auf den Knochenstoffwechsel. So spielt Stickstoffmonoxid eine wichtige Rolle als parakriner und autokriner Mediator der Knochenzellaktivität als Antwort auf Stimuli wie Cytokine (van't Hof *et al.*, 2001; Damoulis *et al.*, 1997; Ralston *et al.*, 1995), Östrogene (Armour *et al.*, 1998; Weiner *et al.*, 1994) und mechanische Belastung (Turner *et al.*, 1996; Klein-Nulend *et al.*, 1998; Zaman *et al.*, 1999). Ergebnisse aus in vitro Studien (Lowik *et al.*, 1994; Otsuka *et al.*, 1998) und Tierexperimenten (Aguirre *et al.*, 2001; Armour *et al.*, 2001) zeigten, dass NO die Osteoklasten (knochenabbauenden Zellen) in ihrer knochenresorptiven Eigenschaft zu hemmen scheint, während die Osteoblasten (knochenaufbauenden Zellen) in ihrer Aktivität unterstützt werden. NO wird enzymatisch mit Hilfe der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) aus dem Guanidino-Stickstoff des L-Arginins und molekularem Sauerstoff gebildet. Der Stickstoffmonoxidbestand des Körpers kann aber auch durch Gabe pharmakologischer NO-Donoren (organische Nitrate

und nichtnitratartige NO-Donoren) erhöht werden (Feelisch, 1991). NO-Donoren werden therapeutisch als Vasodilatoren bei Herzerkrankungen, wie der Angina pectoris, eingesetzt. Durch Denitrierung der NO-Donoren entstehen NO und Nitrosothiole, die für die Wirkung der Medikamente verantwortlich sind (Fung, 1993). Ergebnisse tierexperimenteller und erste humanphysiologische Untersuchungen zum Einfluss von NO-Donoren auf den Knochenstoffwechsel wurden bereits beschrieben (Wimalawansa, 2000a; Wimalawansa, 2000b). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Applikation von NO-Donoren einen knochen-erhaltenden Effekt ausübt. Nachteile der Therapie mit NO-Donoren bei Osteoporose-Patienten sind jedoch die erheblichen unerwünschten Wirkungen, wie ausgeprägte Kopfschmerzen, hypotone Kreislaufregulationsstörungen und Kollapszustände (Parker, 1993).

L-Arginin, als natürliche Vorläufersubstanz des Stickstoffmonoxids hingegen, scheint in Dosierungen bis 30 g frei von unerwünschten Wirkungen zu sein (Visek, 1985; (Buchman *et al.*, 1999; Hurson *et al.*, 1995; Kirk *et al.*, 1993; Luiking *et al.*, 1998). Da nicht nur eine NO-Donorentherapie, sondern auch eine orale L-Argininingabe zur Bildung von NO im Organismus führt (Bode-Boger *et al.*, 1996; Kharitonov *et al.*, 1995; Wheeler *et al.*, 1997; Clarkson *et al.*, 1996), ist anzunehmen, dass eine orale Supplementation mit L-Arginin einen signifikanten Anstieg der NO-Synthese bewirken und somit einen den NO-Donoren vergleichbaren Effekt auf den Knochenstoffwechsel ausüben könnte.

Das Wachstumshormon Somatotropin ist besonders in der Kindheit für seinen wachstumsfördernden Einfluss auf den Knochen bekannt (Froesch *et al.*, 1985). Die Rolle des Somatotropins und seines Wachstumsfaktors IGF 1 zur Erhaltung der Knochenmasse im Alter ist jedoch noch nicht geklärt. Die Sekretion des Somatotropins sowie die IGF 1-Konzentration im Blut nehmen im Alter ab (Marcus, 1997; Ravn *et al.*, 1995). Diese Abnahme wird unter anderem als Grund für eine Abnahme der Knochenmasse diskutiert, da eine positive Korrelation zwischen der IGF 1-Konzentration und der Knochenmasse postmenopausaler Frauen nachgewiesen werden konnte (Munoz-Torres *et al.*, 2001, Garnero *et al.*,

1999, Poiraudau *et al.*, 1997). Untersuchungen zeigen, dass eine erhöhte Arginingabe zu einer signifikanten Steigerung der IGF 1-Konzentration im Blut führt (Hurson *et al.*, 1995). Daher soll in der vorliegenden Studie L-Arginin oral supplementiert werden, um neben der Stimulation der Stickstoffmonoxid-Synthese, den Einfluss einer gesteigerten IGF 1-Bildung auf den Knochenstoffwechsel gesunder postmenopausaler Frauen zu untersuchen.

2 Thematische Einführung

2.1 Stoffwechsel und Morphologie des Knochens

Der Knochen ist ein ausgesprochen dynamisches Gewebe und befindet sich in einem ständigen Ab- und Aufbauprozess. Die Knochen degradierenden Zellen (Osteoklasten) und die Knochen bildenden Zellen (Osteoblasten) sind dabei eine Arbeitseinheit und beeinflussen sich gegenseitig (Aloia, 1994). Durch Osteoblasten und deren Mediatoren gesteuert, entfernen Osteoklasten an der Knochenoberfläche alte Knochenmatrix (Resorption), die anschließend von den Osteoblasten neu gebildet wird (Formation). Im Knochengewebe eingelagert befinden sich die Osteozyten, die aus Osteoblasten hervorgehen. Die Funktion der Osteozyten ist noch nicht eindeutig geklärt (Nijweide *et al.*, 2002). Ihnen wird eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion mechanischer und biochemischer Reize zugeordnet (Cowin *et al.*, 1991; Klein-Nulend *et al.*, 1995).

Der Knochen besteht aus vier unterschiedlichen Kompartimenten (Abbildung 2.1), der Knochenhaut (Periost), der Kortikalis (Kompakta), der endostalen Oberfläche und der Spongiosa. Die Kortikalis, die rund 80 % der gesamten Knochenmasse ausmacht, besteht aus einer calciumreichen dichten Mineralphase und ist dadurch sehr stabil. Die Spongiosa hingegen ist nur zu 20 % calcifiziert, besteht aus einem Bälkchen- oder Trabekelsystem und hat daher eine geringere Dichte als das kortikale Knochengewebe (Christenson, 1997). Im Vergleich zur Kortikalis weist die Spongiosa eine wesentlich schnellere Umbaudynamik auf. Die Ursache dafür liegt, neben der ungleichen Geometrie der Gewebe mit einem vollkommen unterschiedlichen Oberflächen/Volumen Verhältnis, in einer unterschiedlichen zellulären Aktivität in den Kompartimenten (Dodds *et al.*, 1989; Aloia, 1994). Der altersbedingte Knochenmasseverlust ebenso wie die Osteoporose manifestieren sich daher zunächst im spongiösen Knochen (Delling, 2001).

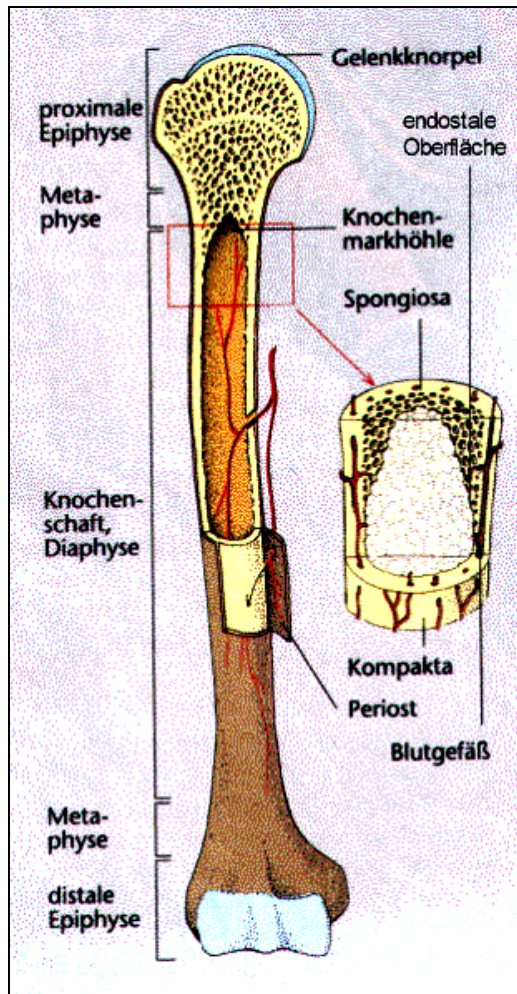


Abbildung 2.1: Knochenkompartimente des Röhrenknochens

Neben der unterschiedlichen Umbaudynamik weist der Knochen zwei unterschiedliche Umbauarten, das „Modeling“ und das „Remodeling“, auf. „Modeling“ führt zu einem gleichzeitigen Knochenabbau und -aufbau an parallelen Knochenoberflächen und verändert daher Form und Umfang des Knochens. Dieser Prozess findet vorwiegend im Wachstum sowie bei starker mechanischer Belastung der Knochen statt (Marks *et al.*, 2002). Der Prozess des „Remodeling“ beschreibt den zeitlich und räumlich gekoppelten Ersatz von altem durch neuen Knochen, wobei im Alter die Resorption die Formation übersteigt (de Vernejoul, 1996). „Remodeling“ erfolgt vorwiegend im Trabekelsystem, an der Oberfläche der Havers'schen Kanäle des kortikalen Knochens und an der endostalen Oberfläche (Frost, 1985). Ungefähr 95 % des adulten Knochenumbaus beruhen auf „Remodeling“-Prozessen.

2.2 Aufbau und Erhalt der Knochenmasse

Bis zum Ende der Wachstumsphase überwiegt der Knochenaufbau gegenüber dem Knochenabbau. Nach Erreichen der maximalen Knochenmasse (peak bone mass) zum Ende der zweiten Lebensdekade bis Mitte der dritten Lebensdekade, stehen Auf- und Abbau im Gleichgewicht (Rizzoli *et al.*, 1999). Wie viel Knochenmasse bis zu diesem Zeitpunkt aufgebaut wird, hängt ab von Geschlecht, der Bevölkerungszugehörigkeit, der genetischen Prädisposition, der Ernährung und vom Grad der mechanischen Belastung (Rizzoli *et al.*, 2001; Heaney *et al.*, 2000; Lau *et al.*, 1998; Schiessl *et al.*, 1998). Das Plateau der maximalen Knochenmasse bleibt bis maximal zum 50. Lebensjahr bestehen (Ziegler, 2001). Danach beginnt der physiologische Knochenabbau. Der Knochen nimmt von diesem Zeitpunkt an unabhängig von der Lokalisation kontinuierlich um ca. 0,5 bis 1 % pro Jahr ab (Schacht, 2000).

Nicht nur für den Aufbau sondern auch für den Erhalt des Knochens spielt die mechanische Belastung eine bedeutende Rolle. So ist vor allem bei Personen mit geringer körperlicher Aktivität und einer verminderten Belastung der Knochen, wie beispielsweise bei Immobilisation oder in der Schwerelosigkeit, eine Knochenatrophie zu beobachten (Kamps *et al.*, 2001; Scheld *et al.*, 2001; Heer *et al.*, 1999; Donaldson *et al.*, 1970). Zum Knochenerhalt ist die Art der Muskeltätigkeit bei körperlicher Belastung von entscheidender Bedeutung. Dabei üben Aktivitäten mit einem hohen Maß an Belastung (Kraftsportarten) einen größeren Einfluss auf den Knochen aus als Aktivitäten mit niedriger Intensität (Ausdauersportarten) (Colletti *et al.*, 1989; Heinrich *et al.*, 1990). Nach der Theorie von Frost *et al.* (Frost, 1987; Frost, 1997b) ist demnach ein bestimmter Schwellenwert an mechanischer Belastung notwendig um dem altersbedingten Knochenabbau entgegen zu wirken. Einfluss auf diesen Schwellenwert nehmen systemische und nichtmechanische Faktoren, wie Hormone, Ernährung, genetische Faktoren und Medikamente.

2.3 Postmenopausale Osteoporose

Durch einen erhöhten Knochenumsatz („high turnover“) mit einem Ungleichgewicht zwischen Resorption und Formation erfolgt bei Frauen ab der

Menopause bis zu zehn Jahren danach eine Beschleunigung des Knochenabbaus auf das fünf- bis zehnfache des prämenopausalen Wertes (Aloia, 1994; Ziegler, 2001). Hauptursache für die veränderte Knochenstoffwechsellage ist die veränderte Hormonproduktion. Das knochenprotektive Östrogen wird nur noch unzureichend gebildet und eine Beschleunigung des Knochenumbaus ist die Folge (Garton *et al.*, 1996). Die Umbauzyklen sind dabei derart verkürzt, dass die Resorption der Formation überwiegt (Ziegler, 2001). Bei Frauen, die in jungen Jahren eine geringe Knochenmasse aufgebaut haben, kann dieser erhöhte Knochenabbau in der Menopause zu einer postmenopausalen Osteoporose führen.

Laut WHO (World Health Organisation) handelt es sich bei der Osteoporose um „eine systemische Skeletterkrankung mit einer Verminderung der Knochenmasse und einer Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes mit entsprechend reduzierter Festigkeit und erhöhter Frakturneigung“ (Consensus development conference, 1993). So führt bei der postmenopausalen Osteoporose die gegenüber dem Aufbau erhöhte Abbaurrate zu einer langsam abnehmenden Knochendichte und damit zu einem konsequenten Anstieg der Knochenfragilität. Frakturen sind nicht selten die Folge.

Osteoporose stellt die häufigste metabolische Knochenerkrankung dar. Die Zahl der Osteoporosepatienten in Deutschland wird derzeit mit vier bis sechs Millionen angegeben (Gotte und Dittmar, 2001). Allein in Deutschland werden die durch die Erkrankung verursachten Folgekosten für Therapie, Rehabilitation und Pflege auf über 3,5 Milliarden Euro geschätzt (Pollaehne *et al.*, 2001). Aufgrund einer erhöhten Lebenserwartung und der Altersstruktur ist mit einer Verdoppelung der Kosten bis ins Jahr 2030 zu rechnen (Gotte und Dittmar, 2001). Therapeutische Gegenmaßnahmen sind daher dringend erforderlich. Zurzeit ist jedoch keine effektive, nebenwirkungsfreie Therapie der postmenopausalen Osteoporose bekannt, die fähig ist, dem Knochenabbau entgegenzuwirken (Hanley *et al.*, 1996).

2.4 Stickstoffmonoxid als mögliches Regulatormolekül des Knochenstoffwechsels

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kurzlebiges, freies Radikal mit einer hohen Reaktivität, dessen Halbwertszeit nur wenige Sekunden beträgt. In einer Sauerstoff (O₂)-abhängigen Reaktion wird L-Arginin katalytisch mit Hilfe der NO-Synthasen (NOS) zu NO und dem Koprodukt L-Citrullin synthetisiert (Palmer *et al.*, 1988) (Abbildung 2.2). Es existieren drei verschiedene Isoenzyme der NO-Synthase. Hier wird zwischen einer neuronalen (nNOS), einer endothelialen (eNOS) und einer induktiven (iNOS) Form unterschieden (Moncada *et al.*, 1993). Aufgrund gleicher Regulationsmechanismen werden eNOS und nNOS zusammen als konstitutive Form (cNOS) bezeichnet. Während Substrat und Kofaktoren für alle Isoenzyme identisch sind und cNOS wie iNOS als Homodimere vorliegen, unterscheiden sich die Regulationsmechanismen der Enzymaktivität für die einzelnen Isoformen grundlegend.

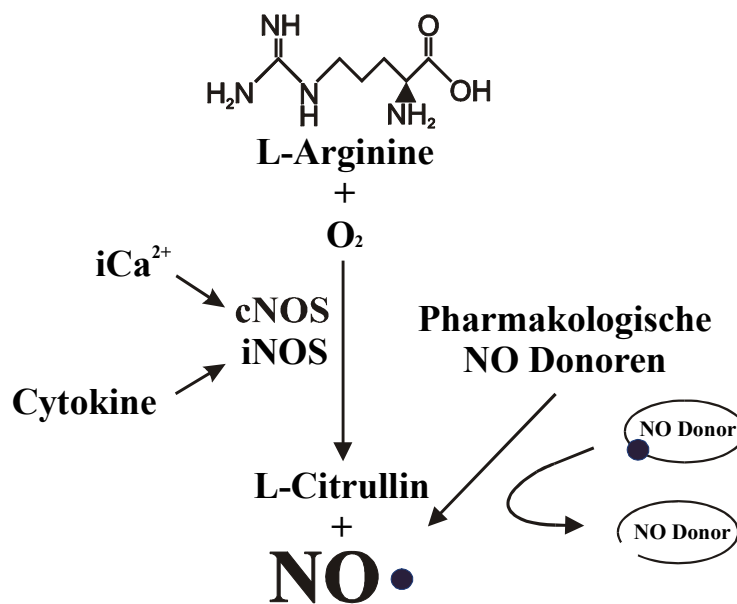


Abbildung 2.2: Syntheseweg des Stickstoffmonoxids (NO)

Bei der cNOS erfolgt die Regulation primär posttranslational über eine Veränderung der Enzymaktivität. Sie wird ständig exprimiert und zeigt basale Aktivität. Stimulus der NO-Synthese ist eine Erhöhung bzw. eine Erniedrigung der Calcium (Ca²⁺)-Konzentration in der Zelle. Ca²⁺ aktiviert den Calciumdetektor Calmodulin, der nun die Synthase aktiviert. Es folgt eine rasch einsetzende und

reversible Stimulation der NO-Synthase die zur Produktion picomolarer NO-Mengen führt (Forstermann *et al.*, 1998).

Die NO-Synthese über die iNOS erfolgt nach Stimulation von Zellen, die zur Expression der iNOS fähig sind. Stimuli sind dabei Cytokine sowie mikrobielle Faktoren (z. B. Endotoxin), die zur de novo Expression der iNOS-RNA führen (Robbins *et al.*, 1994). Die Synthese erfolgt als aktives Homodimer, wobei Calmodulin irreversibel an das Enzym gebunden ist. Somit ist die iNOS weitgehend unabhängig von dem Ca^{2+} Gehalt der Zelle. Die iNOS unterliegt einer transkriptionalen Kontrolle. Wird die iNOS durch Stimulation von Cytokinen oder mikrobiellen Faktoren exprimiert, so werden konstant nanomolare Mengen NO produziert. Nach Expression des Proteins ist die Verfügbarkeit von Substrat und Kofaktoren der limitierende Faktor der NO Produktion.

Sowohl eNOS als auch iNOS werden im Knochen exprimiert und üben durch die unterschiedlichen Regulationsmechanismen einen Einfluss auf die Knochenzellen aus (Ralston, 1997; Helfrich *et al.*, 1997). Die Aktivierung der iNOS im Knochen erfolgt dabei ausschließlich in entzündlichen Prozessen über proinflammatorische Cytokine. Die Ergebnisse verschiedener Studien weisen dabei darauf hin, dass eine hohe NO-Freisetzung über diesen Weg den entzündungsbedingten Knochenverlust potenziert (Damoulis und Hauschka, 1997; Ralston *et al.* 1995; van't Hof und Ralston, 2001). Unter physiologischen Bedingungen ist jedoch die eNOS die im Knochen vorherrschende NO-Synthase (Brandi *et al.*, 1995; Helfrich, *et al.* 1997; Fox *et al.*, 1998). Ihr scheint hingegen eine positive, regulative Rolle vor allem bei der Osteoblastenaktivität und der Knochenformation zuzukommen. So wurde bei eNOS knock-out Mäusen ein Defekt der Knochenformation und osteoblastären Aktivität festgestellt (Armour *et al.*, 2001; Aguirre *et al.*, 2001). Der Grund für die unterschiedliche Wirkung der NO-Freisetzung über die iNOS und die eNOS auf die Knochenzellen wird der unterschiedlichen Höhe der NO-Produktion über die beiden Synthesen zugeschrieben (van't Hof und Ralston, 2001).

Zudem gilt das über die eNOS gebildete NO als Mediator des anabolen Effekts der Östrogene auf den Knochenstoffwechsel. Östrogene stimulieren dabei die eNOS Aktivität in Osteoblasten (Armour und Ralston, 1998; Weiner *et al.*, 1994).

Wimalawansa et al. (Wimalawansa *et al.*, 1996) zeigten im Rattenmodell, dass bei Gabe von eNOS Inhibitoren der protektive Effekt der Östrogene auf den Knochenstoffwechsel unterbrochen wird, was zu einem Abbau an Knochenmasse führt. Hinweise auf einen Zusammenhang gibt auch die Beobachtung, dass die NO-Produktion bei Frauen in der Menopause abnimmt, während eine Östrogensubstitution zu einem Wiederanstieg der NO-Produktion führt (Cicinelli *et al.*, 1997; Rosselli *et al.*, 1995). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der stimulatorische Effekt der Östrogene auf die Osteoblasten auf eine lokale NO-Produktion der Knochenzellen über die eNOS zurückzuführen ist. So kann sich eine Aktivierung der eNOS mit einer NO-Produktion im picomolaren Bereich vor allem in der Postmenopause positiv auf den Knochenerhalt auswirken.

Auf der zellulären Ebene zeigte sich, dass auch mechanische Belastung eine schnell einsetzende NO-Produktion über die eNOS in Osteoblasten und Osteozyten bewirkt (Pitsillides *et al.*, 1995; Klein-Nulend *et al.*, 1998; Zaman *et al.*, 1999). Diese NO-Freisetzung scheint den Reiz der mechanischen Belastung über die Osteozyten an den Knochen weiterzuleiten und so die Knochenformation zu fördern (Uematsu *et al.*, 1995; Fox *et al.*, 1996). Turner et al. (1996) wiesen auch im Tierversuch nach, dass die Gabe des NO-Synthase Inhibitors L-NAME die mechanisch induzierte Knochenformation um 66 % reduziert. Beim Menschen konnte bisher eine Erhöhung der NO-Produktion nach sportlicher Aktivität durch Messung der stabilen Endprodukte des NO-Stoffwechsels, Nitrit (NO₂) und Nitrat (NO₃), beobachtet werden (Bode-Boger *et al.*, 1994b; Jungersten *et al.*, 1997).

2.4.1 Stickstoffmonoxid-Donoren und Knochenstoffwechsel

Stickstoffmonoxid kann auch nichtenzymatisch durch Einnahme pharmakologischer NO-Donoren (organische Nitrate und nicht-nitratartige NO-Donoren) im Organismus gebildet werden (Feelisch, 1991) (Abbildung 2.2). NO-Donoren werden hauptsächlich als Vasodilatoren bei Herz-Kreislaufpatienten und aufgrund der antiaggregatorischen Wirkung auf gefäßwandnahe Thrombozyten eingesetzt. Das gemeinsame Strukturmerkmal der organischen Nitrate besteht aus einem aliphatischen Grundgerüst, das mit bis zu vier Molekülen Salpetersäure verestert ist. Für die Wirkung der NO-Donoren sind nicht die organischen Nitrate

selbst, sondern die durch Denitrierung entstehenden Produkte (NO und Nitrosothiole) verantwortlich (Feelisch *et al.*, 1987). Organische Nitrate sind daher sogenannte „prodrugs“ ihrer eigentlich wirksamen Metaboliten und setzen NO entweder bei einer chemischen Redoxreaktion mit Thiolen wie Cystein oder Methionin frei oder durch eine reduktive Biotransformation im Gewebe. Der Einsatz von NO-Donoren als Koronarmittel beruht auf der Aktivierung der wasserlöslichen Guanylyl-Cyclase, wodurch der cGMP-Spiegel erhöht wird, was letztendlich zur Relaxation in der glatten Muskelzelle führt, wie sie beispielsweise in der Herzmuskulatur vorzufinden ist (Honicka *et al.*, 1997). Zu den wichtigsten klinisch eingesetzten NO-Donoren gehören Nitroglycerin, Glyceryltrinitrat, Isosorbiddinitrat, Isosorbid-5-mononitrat und Pentaerithryltetranitrat sowie die nicht nitratartigen NO-Donoren Molsidomin und Nitroprussid.

Ist es möglich, den Knochenstoffwechsel durch eine NO-Donoren Gabe zu beeinflussen? Im Tierversuch konnte ein positiver Effekt einer transdermalen NO-Donoren Applikation (Nitroglycerin) auf den Knochenstoffwechsel ovariektomierter Ratten gezeigt werden (Wimalawansa *et al.*, 1996). Dabei wies die Applikation einen den Östrogenen vergleichbaren, hemmenden Effekt auf die Knochenresorption und eine erhöhte Knochenformation auf. Jamal *et al.* (1998) stellten eine höhere Knochendichte bei postmenopausalen Frauen mit intermittierender NO-Donoreinnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe fest. Wimalawansa *et al.* (2000a) zeigte, dass bei ovariektomierten Frauen im Alter von 36 bis 45 Jahren eine kutane Applikation des NO-Donors Nitroglycerin die Knochenresorption hemmt und die Formation erhöht. Dieser Effekt wurde anhand der Biomarker des Knochenstoffwechsels und Messungen der Knochendichte gezeigt.

Auf der Basis dieser Forschungsergebnisse untersuchten wir in einem epidemiologischen Vorexperiment, ob ein positiver Zusammenhang zwischen der Knochendichte und der Einnahme von NO-Donoren bestehen könnte. Dazu wurde ein retrospektives Screening am Patientenkollektiv des Osteoporose Diagnostik- und Therapiezentrum in München durchgeführt, von denen bereits eine

radiologische Befundung mittels peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT, Typ Densiscan 1000, Scanco Medical AG, Schweiz) vorlag, um die Häufigkeit der Einnahme von NO-Donoren bei Osteoporosepatientinnen epidemiologisch zu erfassen. Mit Hilfe eines Fragebogens (siehe Anhang 8.1) wurde ermittelt, wie viele der Osteoporosepatientinnen NO-Donoren als Arzneimittel erhielten, welche NO-Donoren wie lange eingenommen wurden und welche Dosierung erfolgt ist. Angeschrieben wurden 1409 Osteoporosepatientinnen. Auf die Fragebögen haben insgesamt 590 Frauen (Durchschnittsalter $61,3 \pm 9,8$ Jahre) geantwortet.

Insgesamt nahmen 33 der Frauen NO-Donoren ein, von denen 17 eine kurzzeitige NO-Donoreneinnahme aufwiesen (entweder einmalig als Spray oder kurzzeitige Einnahme über wenige Monate). Die übrigen 16 Frauen nahmen permanent NO-Donoren ein. Hier wurden vor allem die NO-Donoren Nitrolingual (Wirkstoff: Glyceroltrinitrat), Corvaton (Wirkstoff: Molsidomin) und Isoket (Wirkstoff: Isosorbiddinitrat) eingesetzt. Von den 16 Frauen mit permanenter NO-Donoreneinnahme konnten nur acht als sogenannte „fast looser“ eingestuft werden. Fast looser sind definiert als Patienten mit einem Verlust von mehr als 3 % der trabekulären Knochendichte des Radius im Zeitraum von einem Jahr (Christiansen *et al.*, 1990).

Die Auswertung der Fragebögen zeigte, dass nur acht Frauen gefunden werden konnten, die über längere Zeit NO-Donoren eingenommen haben und an Osteoporose leiden. Basierend auf diesem Experiment der retrospektiven Datenerfassung und den in der Literatur beschriebenen positiven Effekten der NO-Donoren (Wimalawansa *et al.*, 1996; Jamal *et al.*, 1998; Wimalawansa, 2000a) könnte spekuliert werden, dass eine Therapie mit NO-Donoren einer Reduktion der Knochenmasse entgegenwirkt. Vermutlich könnte daher eine Therapie mit NO-Donoren die Entwicklung von osteoporotischen Veränderungen des Knochens gehemmt haben.

Einer erkennbaren positiven Wirkung der NO-Donoren auf den Knochenstoffwechsel stehen jedoch erhebliche unerwünschte Nebenwirkungen gegenüber (Parker, 1993). So kann es bei der Einnahme von medikamentös

verwendeten organischen Nitraten zu ausgeprägten Kopfschmerzen, hypotonen Kreislaufregulationsstörungen und Kollapszuständen kommen. Daher gilt der Einsatz von NO-Donoren in der Therapie als nicht unbedenklich.

2.4.2 L-Arginin und Knochenstoffwechsel

Anders als bei den NO-Donoren weist L-Arginin (2-Amino-5-Guanidinopentansäure) als natürlicher Vorläufer der Formation von Stickstoffmonoxid in Dosierungen bis zu 30 g keine unerwünschten Wirkungen auf (Visek, 1986; Barbul, 1986; Mocchegiani *et al.*, 1990). L-Arginin ist eine stark basische Aminosäure, die eine Vielzahl metabolischer Funktionen im Organismus aufweist (Barbul, 1986; Beaumier *et al.*, 1996) und eine zentrale Rolle beim Organwachstum und im Immunsystem spielt (Daly *et al.*, 1988).

Es existieren drei verschiedene Argininquellen. Dazu zählt das im Protein-Abbau gebildete Arginin, das Arginin aus der endogenen Synthese und das über die Nahrung aufgenommene Arginin (Beaumier *et al.*, 1996; Barbul, 1986; Harper *et al.*, 1993). Die im Erwachsenenalter unter physiologischen Bedingungen nicht essentielle Aminosäure wird unter pathogenen Bedingungen, wie bei einer Gewebeschädigung oder bei der Wundheilung, durch einen erhöhten Bedarf essentiell (Laidlaw *et al.*, 1987; Albina *et al.*, 1990). Die durchschnittliche orale L-Arginin Aufnahme eines 70 Kilogramm schweren Menschen über die Nahrungsmittelaufnahme beträgt 5 g pro Tag, davon ca. 70 % durch die Aufnahme von tierischem Protein (Visek, 1986). Aber auch Nüsse (1,1-3,2 g/100 g), Sojamehl (3,2 g/100 g) und Sesamkörner (2,2 g/100 g) weisen einen hohen Arginingehalt auf. Die orale Bioverfügbarkeit von L-Arginin liegt bei 68 % (Bode-Boger *et al.*, 1998). L-Arginin ist eine nicht toxische Aminosäure, die über längere Zeit in Dosierungen bis zu 30 g pro Tag ohne Nebenwirkungen eingenommen werden kann (Visek, 1986; Barbul, 1986; Mocchegiani *et al.*, 1990). Dies wird auch durch Studien zur Untersuchung der vasodilatorischen Wirkung von NO durch L-Arginin-Supplementation belegt (Buchman *et al.*, 1999; Hurson *et al.*, 1995; Kirk *et al.*, 1993; Luiking *et al.*, 1998; Blum *et al.*, 2000a). Hier erfolgten L-Arginin-Supplementationen in Dosierungen zwischen 9 und 30 g pro Tag.

Wie in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden konnte, kann die Bildung von NO im menschlichen Organismus durch orale L-Arginin-Supplementation (Bode-Boger *et al.*, 1996; Kharitonov *et al.*, 1995; Wheeler *et al.*, 1997; Clarkson *et al.*, 1996) oder durch L-Arginin-Infusion (Bode-Boger *et al.*, 1994a) erhöht werden. In Langzeitstudien wird jedoch die orale Supplementation der Infusion aufgrund der besseren Durchführbarkeit vorgezogen (Preli *et al.*, 2002). Obwohl die physiologische intrazelluläre L-Arginin-Konzentration (2 mmol/L) im Vergleich zu dem K_m -Wert der NO-Synthase (2,9 μ mol/L) sehr hoch ist und die Synthase daher mit Substrat abgesättigt sein müsste, lässt sich die NO-Synthase durch eine Supplementation mit L-Arginin erhöhen (Wu und Meininger, 2000; Fryburg, 2000; Peters *et al.*, 1999). Unterschiedliche Theorien sind bisher zur Klärung dieses sogenannten „Arginin-Paradoxons“ aufgestellt worden (Wu und Meininger, 2000). So wird zum Beispiel als ein Grund die Lokalisierung von L-Arginin und den NO-Synthasen in unterschiedlichen intrazellulären Kompartimenten diskutiert (Bode-Boger *et al.*, 1998; Castillo *et al.*, 1993). Zudem wurde im Plasma und in kultivierten humanen Endothelzellen der endogene kompetitive Inhibitor der NO-Synthase ADMA (Asymmetrisches Dimethylarginin) entdeckt, der als limitierender Faktor der NO-Synthase aus L-Arginin gilt (Boger *et al.*, 2000; Rees *et al.*, 1990). Bode-Boger *et al.* (1998) zeigten jedoch, dass ein erhöhtes Substratangebot an L-Arginin das Konzentrationsverhältnis von ADMA und L-Arginin so weit verschiebt, dass der NO-Synthase vermehrt L-Arginin als Substrat zur Verfügung steht und somit auch vermehrt NO gebildet werden kann.

Die intestinale Absorption der Aminosäuren erfolgt, abhängig von der Molekülstruktur, über unterschiedliche Transportsysteme. Die Absorption des L-Arginin im Jejunum erfolgt über ein Transportsystem, das ebenso andere basische Aminosäuren transportiert. Da nach erhöhter Gabe von L-Arginin ein Anstieg der L-Arginin-Konzentration im Blut zu verzeichnen ist (Bode-Boger *et al.*, 1998), ist anzunehmen, dass L-Arginin die übrigen Aminosäuren bei der Absorption verdrängt und dadurch mehr L-Arginin verstoffwechselt wird. Eine Messung der L-Arginin-Konzentration im Blut zur Erfassung einer Konzentrationserhöhung ist jedoch nur postprandial sinnvoll, da Regulationsmechanismen dafür

sorgen, dass eine stoßartige Konzentrationserhöhung nach der Nahrungsaufnahme rasch ausgeglichen wird (Castillo *et al.*, 1993).

Wie bereits erwähnt ist L-Arginin nicht nur Vorläufersubstanz der NO-Synthese. L-Arginin dient auch als Quelle zur Ornithin-Synthese im Intestinum, ist im Harnstoffzyklus involviert, ist der Amidin-Donor zur Kreatin-Synthese oder wird in der Niere zu Agmatin decarboxyliert. So könnte eine zusätzliche L-Arginin-Supplementation auch andere Stoffwechselwege beschreiten, die nicht zu einer erhöhten Synthese von NO führen. Zum Beispiel wird auch die Argininosuccinase-Defizienz durch Anreicherung der Diät mit L-Arginin behandelt (Stryer, 1996). Warum eine zusätzliche Gabe von L-Arginin daher zu einer Erhöhung der NO-Synthese führt ist noch nicht geklärt (Peters *et al.*, 1999).

Obwohl in der Literatur Untersuchungen über den Einfluss einer L-Arginin-Supplementation auf den Knochenstoffwechsel des Menschen gefordert werden (Visser *et al.*, 1994; Lowe, 1998), wurden bisher noch keine humanen Studien zur Klärung eines Zusammenhanges durchgeführt. Ein positiver Einfluss von L-Arginin auf den Knochenstoffwechsel wurde bisher ausschließlich im Zell- und im Tierexperiment erforscht. Chevalley *et al.* (1998) fanden eine Stimulation der Insulin-like growth factor 1 (IGF 1)-Produktion und der Kollagensynthese in Osteoblasten nach Zugabe von L-Arginin zu dem Medium. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Arginin zum einen direkt die Knochenformation stimuliert zum anderen eine indirekte Stimulation über IGF 1 erfolgt.

Erste tierexperimentelle Untersuchungen der Wirkung einer L-Arginin-Supplementation auf den Knochenstoffwechsel wurden von Fiore *et al.* (2000) durchgeführt. Im Rattenmodell konnte ein Anstieg der Knochendichte nach L-Arginin-Supplementation festgestellt werden. Die Untersuchungsergebnisse von Clementi *et al.* (2001) weisen ähnliche Ergebnisse auf. Hier wurde durch Gabe von Cyclosporin A ein Verlust des Knochenmineralgehalts induziert. Dieser Verlust konnte durch gleichzeitige Gabe von L-Arginin verhindert werden.

2.5 Einfluss des Somatotropins auf den Knochenstoffwechsel

Insulin-like growth factor 1 (IGF 1) und Insulin-like growth factor 2 (IGF 2) bezeichnet man als Somatomedine, die unter dem Einfluss des Wachstumshormons Somatotropin (STH) in der Leber gebildet werden und über spezifische Rezeptoren als Mediatoren (second messenger) des Somatotropins wirken. Die über die Somatomedine vermittelten Wirkungen des Somatotropins haben neben Auswirkungen auf den Protein-, Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel in erster Linie einen Einfluss auf das Wachstum von Skelett und Organen sowie auf die Schaffung der dafür erforderlichen metabolischen Voraussetzungen. Ziel ist die Stimulation der DNA-Synthese, die im Skelettsystem eine Teilung der Zellen des nichtverknöchernden Knorpels der Epiphysenfugen sowie ein Längen- und Dickenwachstum des Knochens zur Folge hat (Froesch *et al.*, 1985). Dieser Effekt ist von einer verstärkten Synthese der extrazellulären Grundsubstanz des Knorpel- und Knochengewebes (z. B. Kollagen) begleitet.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen zu einer Wirkung des Somatotropins und seines Wachstumsfaktors IGF 1 auf den Knochenstoffwechsel in der Postmenopause durchgeführt (Ebeling *et al.*, 1993; Munoz-Torres *et al.*, 2001; Ghiron *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1999; Sugimoto *et al.*, 1999; Marcus, 1997; Ravn *et al.* 1995). Ravn *et al.* (1995) sowie Marcus *et al.* (1997) zeigten, dass die Sekretion des Somatotropins sowie die IGF 1-Konzentration in der Menopause abnimmt und im Blut osteoporotischer Frauen signifikant erniedrigt ist. Bei Erhöhung der IGF 1-Konzentration durch STH oder IGF 1-Supplementation steigt dagegen die Knochenmasse signifikant an (Sugimoto *et al.*, 1999; Ebeling *et al.*, 1993; Vestergaard *et al.*, 1999). Zudem konnte eine positive Korrelation zwischen der IGF 1-Konzentration und der Knochenmasse postmenopausaler Frauen nachgewiesen werden (Munoz-Torres *et al.*, 2001; Garnero *et al.*, 1999; Poiraudau *et al.*, 1997). Infolgedessen wird die Abnahme der IGF 1-Konzentration in der Menopause unter anderem als ein Grund für eine Abnahme der Knochenmasse diskutiert (Kim *et al.*, 1999; Ravn *et al.*, 1995).

L-Arginin ist nicht nur das Substrat für die NO-Synthase, sondern auch ein bekannter Stimulus für die Freisetzung von STH und damit auch wie bereits erwähnt seines Mediators IGF 1 (Merimee *et al.*, 1965; Isidori *et al.*, 1981). Der

Mechanismus der STH-Freisetzung über L-Arginin ist noch nicht vollständig erforscht. Angenommen wird hier eine Inhibition der Somatostatin-Sekretion, eines Inhibitors der STH-Freisetzung, die im Hypothalamus erfolgt und somit zu einer erhöhten STH-Freisetzung führt (Ghigo *et al.*, 1991; Koppeschaar *et al.*, 1992). Hurson *et al.* (1995) zeigten, dass eine orale Arginingabe von 17 g bei älteren Menschen (67 bis 83 Jahre) zu einer signifikanten Steigerung der IGF 1-Konzentration im Blut führt. Eine L-Arginin-Supplementation könnte daher zusätzlich über eine erhöhte Freisetzung von STH und somit von IGF 1 auf den Knochenstoffwechsel postmenopausaler Frauen wirken.

2.6 Messung der Veränderungen des Knochenstoffwechsels

Um Veränderungen des Knochenstoffwechsels zu erfassen, werden biochemische Marker und bildgebende Verfahren herangezogen. Wie bereits erwähnt ist der Knochenstoffwechsel keine statische Größe, sondern ein kontinuierlicher Umbauprozess, auf den verschiedene Regulationsmechanismen einwirken. Dieser dynamische Knochenstoffwechsel und damit die Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten, lässt sich durch biochemische Blut- und Urinmarker erfassen (Eyre, 1997; Schmolke, 2001), die in die Zirkulation gelangen und zum Teil über die Niere ausgeschieden werden. Während des Knochenaufbaus werden verschiedene Proteine oder Peptide, wie das Propeptid des Typ-I-Kollagen (PICP), die knochenspezifische alkalische Phosphatase (bAP) und Osteocalcin in die Zirkulation abgegeben, deren Konzentration im Blut gemessen werden kann. Der Knochenabbau kann beispielsweise durch die Konzentration des C- oder N-terminalen Telopeptids (CTX, NTX) ebenfalls im Blut erfasst werden.

Veränderungen des Knochenstoffwechsels haben durch den Auf- und Abbau der calciumreichen Mineralphase auch Einfluss auf den Calciumstoffwechsel. Die Calciumkonzentration im Blut, die einer strengen homöostatischen Kontrolle unterliegt, wird über Hormone gesteuert. Als Marker des Calciumstoffwechsels wird hier das Parathormon (PTH) herangezogen.

Im Gegensatz zur Knochenzellaktivität werden Veränderungen der Knochendichte und Knochenstruktur nur langsam sichtbar. Diese Veränderungen können mit Hilfe

bildgebender Verfahren, wie der peripheren quantitativen Computertomographie (pQCT), erfasst werden.

2.6.1 Biomarker des Knochenstoffwechsels

2.6.1.1 Typ 1 Kollagen C-terminales Crosslink Telopeptid (CTX)

Der Telopeptid Marker CTX ist zur Zeit der aussagekräftigste Resorptionsmarker der systemischen Osteoklastenaktivität (Rosen *et al.*, 2000). Während des Knochenabbaus erzeugen die Osteoklasten durch Abbau des Typ 1 Kollagens kleine C- und N-terminale Kollagen Bruchstücke (Telopeptide), die zunächst rasch in die Zirkulation abgegeben werden und dann über die Niere in den Harn ausgeschieden werden. Der Grad der Knochenresorption ist dabei der sezernierten Telopeptidmenge direkt proportional (Schmolke, 2001). Die CTX-Konzentration steigt während der Menopause signifikant zwischen 50 bis 150 % an (Garnero *et al.*, 1997).

2.6.1.2 Carboxyterminales Propeptid des Typ 1 Prokollagen (PICP)

PICP ist ein biochemischer Marker der Knochenformation. Die von den Osteoblasten gebildete kollagene Knochenmatrix besteht zu mehr als 90 % aus Typ 1 Kollagen (Christenson, 1997). Vorläufer des Typ 1 Kollagens ist das von den Osteoblasten gebildete Prokollagen, dessen aminoterminales (PINP) und carboxyterminales (PICP) Ende vor dem Einbau in die Knochenmatrix enzymatisch en bloc abgespalten werden (Christenson, 1997). Diese Peptidfragmente gelangen in die Zirkulation und reflektieren die osteoblastäre Kollagenneusynthese (Garnero und Delmas, 1997; Eriksen *et al.*, 1995). PICP steigt nach der Menopause um 20 % an (Hassager *et al.*, 1994).

2.6.1.3 Knochenspezifische alkalische Phosphatase (bAP)

Die knochenspezifische alkalische Phosphatase gehört ebenfalls zu den Formationsmarkern und ist ein Membranprotein der Osteoblasten mit enzymatischer Aktivität. Die Konzentration an bAP gilt als Maß für die Osteoblasten-Aktivität (Akesson, 1995). Sie wird von den Osteoblasten in der Phase der Kollagenreifung synthetisiert und sezerniert und löst die Einlagerung

von Calciumphosphatkristallen aus. Ein Anstieg der bAP-Konzentration von 20 bis 50 % im Serum während der Menopause wurde von Woitge *et al.* (Woitge *et al.*, 1996) und Delmas *et al.* (Delmas *et al.*, 1983) beobachtet. Eine Erhöhung der Enzymaktivität der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase ist sicher als protektive Reaktion des Körpers zu interpretieren, möglichst viel an abgebautem Knochen zu ersetzen.

2.6.1.4 Intaktes Osteocalcin

Osteocalcin ist ein sensibler und hochspezifischer Formationsmarker der Matrix Mineralisation, der ausschließlich in den Osteoblasten produziert wird (Seibel *et al.*, 1993; Eyre, 1997; Akesson, 1995). Osteocalcin ist ein Hydroxylapatit bindendes, knochenspezifisches Protein, das etwa 20 % des nichtkollagenen Proteins der Knochenmatrix darstellt (Cormier, 1995). Nach Vitamin K abhängiger Synthese wird der größte Anteil des neugebildeten Osteocalcins direkt in die extrazelluläre Knochenmatrix eingebaut (Lee *et al.*, 2000). 10 bis 40 % werden jedoch an den Extrazellularraum abgegeben (Blumsohn *et al.*, 1995). Dieser Anteil kann im Blut bestimmt werden. Die Osteocalcin-Konzentration im Blut ist nach der Menopause um 50 % erhöht (Epstein *et al.*, 1984; Stepan, 2000).

2.6.1.5 Parathormon (PTH)

Ein Anteil von circa 99 % des Calciumgehalts des Körpers ist im Knochen gespeichert, so dass für eine schnelle Bereitstellung von Calcium zur Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase ein ständiger Umbau des Knochens notwendig ist. PTH ist ein calciotropes Hormon, das die Retention von Calcium aus der Niere fördert und die Phosphatrückresorption hemmt. Durch diese Wirkung wird der Serumcalciumspiegel erhöht und das Serumphosphat erniedrigt (Hodsman *et al.*, 2002). Die Sekretion wird hauptsächlich durch die Konzentration an ionisiertem Calcium im Blut und durch 1,25-(OH)₂-Vitamin D reguliert. Nach der Sekretion durch die Nebenschilddrüse wird das zirkulierende Parathormon rasch proteolytisch gespalten und bildet Hormonfragmente. Das biologisch aktive oder auch intakte Parathormon bleibt im Blut stabil und kann daher mit Hilfe immunoradiometrischer Assays gemessen werden.

2.6.2 Messung der Knochenstruktur und Knochendichte

Verschiedenste Messgeräte erlauben eine Aussage über die Knochenstruktur und Knochendichte. Entscheidend für die Auswahl des Gerätes zur Beurteilung von Veränderungen des Knochens in der Menopause ist die Reproduzierbarkeit, die Nichtinvasivität, eine geringe Strahlenbelastung und die Fähigkeit Veränderungen der Knochendichte, Knochenmasse und Knochengometrie getrennt erfassen zu können (Genant *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 1997; Augat *et al.*, 1998a). Diese Voraussetzungen erfüllt die periphere quantitative Computertomographie (Ito *et al.*, 1997). Neben der QCT ist die pQCT zur Zeit die einzige Methode, die die wirkliche volumetrische Knochendichte misst und zusätzlich noch Aussagen über geometrische Parameter wie Gesamtknochenfläche und Kortikalisdicke zulässt (Groll *et al.*, 1999; Sievanen *et al.*, 1998). Die pQCT bietet dabei den Vorteil, neben der selektiven Messung rein trabekulärer Strukturen im ultradistalen Bereich von Radius und Tibia auch rein kortikale Strukturen im distalen Drittel von Radius und Tibia in die Messung mit einzubeziehen.

2.7 Messung der Muskelkraft

Wie bereits zu Anfang erwähnt, stellt Bewegung und Muskelkraft den wahrscheinlich größten Stimulus auf den Knochenumsatz dar (Frost, 1987; Frost, 1997b). Daher sollten Veränderungen der Muskelkraft, sowie der Muskelmasse und Muskelfläche bei der Beurteilung anderer Einflussfaktoren auf den Knochenstoffwechsel, wie der L-Arginin-Supplementation, dokumentiert werden, um Fehlbeurteilungen bezüglich eines Einflusses auszuschließen. Auf Grund der guten Reproduzierbarkeit hat sich zur Beurteilung der Muskelkraft die Bestimmung der Griffstärke durchgesetzt. Hier wird die isometrische Muskelkontraktion untersucht, die die statische Arbeit misst.

Eine Erfassung der Muskelfläche ist mit Hilfe des pQCT möglich. Auch lassen sich mittels pQCT die morphologischen Informationen erfassen, die zur Berechnung des sogenannten Strength-Strain Index (SSI) notwendig sind. Dieser Index gibt Auskunft über die mechanische Festigkeit des Knochens, wird als eine Messzahl für die Bruchfestigkeit des Knochens angegeben und korreliert unabhängig von Alter und Geschlecht hoch signifikant mit der Muskelkraft (Ferretti *et al.*, 1996;

Augat *et al.*, 1998b). Veränderungen der Einflussgröße Muskelstoffwechsel können somit zusätzlich erfasst werden.

2.8 Fragestellung dieser Arbeit

Ziel dieser Studie ist es, den Einfluss einer sechsmonatigen oralen L-Arginin-Supplementation in Form von L-Argininhydrochlorid auf den Knochenstoffwechsel gesunder, postmenopausaler Frauen zu untersuchen. Dabei sollen folgende Fragestellungen geklärt werden:

- Welchen Einfluss nimmt die L-Argininhydrochlorid-Supplementation auf die Biomarker des Knochenstoffwechsels?
- Ist durch die L-Argininhydrochlorid-Supplementation eine Veränderung der Knochendichte, -masse oder -geometrie, gemessen durch ein bildgebendes Verfahren, möglich?
- Wird das trabekuläre oder das kortikale Knochenkompartiment durch die L-Argininhydrochlorid-Supplementation beeinflusst?
- Wird die IGF 1-Produktion durch die orale L-Argininhydrochlorid-Supplementation gesteigert und kann dies als sekundäre Einflussgröße einen Effekt auf den Knochenstoffwechsel ausüben?

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsdesign

Im Rahmen der prospektiven, plazebo-kontrollierten Untersuchung zur Überprüfung der Auswirkung einer L-Argininhydrochlorid-Supplementation auf den Knochenstoffwechsel wurden 60 gesunde, postmenopausale Frauen untersucht, von denen 30 in die Studie aufgenommen wurden. Die Studie wurde ambulant durchgeführt. Die postmenopausalen Frauen wurden randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt. Die Hälfte der Probandinnen (n = 15) erhielt über ein halbes Jahr eine tägliche Supplementation von 18 g L-Argininhydrochlorid (dies entspricht einer Supplementation von 14,8 g L-Arginin). Die übrigen 15 Probandinnen erhielten als Kontrollgruppe 18 g Glucose-Monohydrat (Dextrose).

3.1.1 Ethikkommission

Das Experiment wurde von der Ethikkommission Nordrhein begutachtet und als ethisch unbedenklich angesehen. Nach Aufklärung über mögliche Risiken und Nebenwirkungen der Studie haben alle Probandinnen eine schriftliche Einverständniserklärung zur freiwilligen Teilnahme an dieser Studie unterzeichnet.

3.1.2 Einschlussuntersuchung

Eine Woche vor Versuchsbeginn erfolgte die medizinische Einschlussuntersuchung in der Flieger-Untersuchungsstelle des Instituts für Luft- und Raumfahrtmedizin (DLR, Köln). Die Untersuchung bestand aus einer klinisch-chemischen Untersuchung (Kreatinin, Harnstoff, Eiweiß, Albumin, SGOT, SGPT, γ GT, Lipase, alkalische Phosphatase, Elektrolyte, Calcium, Glucose), Hämatologie (kleines Blutbild, Blutsenkung), Urinuntersuchung (Glucose, Eiweiß, Urobilinogen), Belastungs-EKG sowie einer Anamnese.

3.1.3 Probandenkollektiv

Für die teilnehmenden Probandinnen wurden folgende Einschlusskriterien festgelegt:

- Weibliche, gesunde Probandinnen im Alter zwischen 45 und 60 Jahren
- Gesicherte Menopause, d. h. seit mindestens sechs Monaten keine Regelblutung mehr
- Probandinnen, die physisch und psychisch bereit und in der Lage sind an der gesamten Untersuchung teilzunehmen
- Teilnahme und erfolgreicher Abschluss der Einschlussuntersuchung

Aus der Studie ausgeschlossen wurden Probandinnen mit folgenden Kriterien:

- Drogen-, Medikament- oder Alkoholabusus (regelmäßiger Genuss von mehr als 15 g Alkohol/Tag)
- Teilnahme an einer anderen klinischen Studie innerhalb der letzten 30 Tage vor Beginn dieser Untersuchung
- Niereninsuffizienz
- Blutspende innerhalb der vergangenen drei Monate
- Hormoneinnahme (z. B. Östrogentherapie)
- Hysterektomie
- Ovariectomie
- Knochenbrüche innerhalb der letzten sechs Monate
- Diabetes mellitus
- Steroidhormoneinnahme
- Rheumatische Erkrankung
- Keine schriftlich vorliegende Einverständniserklärung vor Beginn der Studie
- Jeder andere Zustand, der nach Ansicht des Prüfers den Patienten für die Aufnahme in die Studie als ungeeignet erscheinen lässt

Nähere Angaben zu den Studienteilnehmerinnen (Alter, Gewicht zu Studienbeginn, Größe und Body-Mass-Index (BMI)) sind Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tabelle 3.1 Anthropometrische Daten der Probandinnen

	Alter (Jahre) MW ± SD	Gewicht (kg) MW ± SD	Größe (cm) MW ± SD	BMI (kg/m ²) MW ± SD
Verumgruppe	54,5 ± 4,1	66,3 ± 10,5	165,8 ± 6,1	24,0 ± 3,0
Plazebogruppe	55,3 ± 4,4	64,2 ± 9,1	165,6 ± 5,6	23,3 ± 3,1

BMI = Body Mass Index

Der Body-Mass-Index (BMI) errechnet sich dabei aus der Formel nach Du Bois (Du Bois *et al.*, 1989):

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht}[kg]}{\text{Körpergröße}^2[m^2]}$$

3.1.4 Experimentablauf

Der Gesamtablauf der Studie ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die L-Argininhydrochlorid- bzw. Plazeboeinnahme erfolgte dreimal täglich zu den Mahlzeiten. Initial sowie nach zwei, vier und sechs Monaten fand eine morgendliche Blutabnahme zur Analyse von IGF 1, der Biomarker des Knochen- und Calciumstoffwechsels und der Elektrolyte statt. Jeweils zwei Tage vor dem Termin zur Blutabnahme sammelten die Probandinnen zwei 24-Stunden Urine, zur Analyse der Gesamt-Stickstoffausscheidung als Compliance Parameter. Um die Ernährungsgewohnheiten der Probandinnen erfassen zu können, wurden diese angehalten jeweils zwei Wochen vor den Blutabnahmetermeninen ein Food-Frequency-Questionnaire (FFQ) auszufüllen. Dadurch konnte die Häufigkeit des Verzehrs der aufgenommenen Nahrungsmittel eines Tages und die durchschnittliche Nährstoffzufuhr pro Tag erfasst werden. Die Probandinnen wurden am Tag der Blutabnahme gewogen, um Gewichtsveränderungen erfassen zu können. Zudem füllten die Probandinnen über den gesamten Studienzeitraum Aktivitätsprotokolle aus.

Vor Beginn der Supplementation bzw. Plazeboeinnahme, sowie nach sechs Monaten wurde die trabekuläre und kortikale Knochenmasse distal und proximal an Radius und Tibia mit Hilfe eines pQCT-Messgerätes erfasst (XCT 2000TM, Stratec, Birkenfeld, Deutschland). Die pQCT-Messung wurde ein weiteres Mal nach insgesamt einem Jahr durchgeführt. Grund dafür war, dass die Effekte einer

Intervention bei den bildgebenden Verfahren erst langsam sichtbar werden. Weiterhin konnte mit dem pQCT-Messgerät die Muskelfläche bestimmt werden. Die Griffstärke wurde ebenfalls vor Beginn der Studie sowie nach sechs und 12 Monaten mittels eines Griffstärkemessgerätes erfasst (Jamar Handdynamometer, Jackson, USA). Diese Messungen wurden in der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde der Universität Köln durchgeführt. Die gesamte Betreuung der Probandinnen und die Blutabnahmen fanden im Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin des DLR in Köln statt.

	Initial	nach 1 Monat	nach 2 Monaten	nach 3 Monaten	nach 4 Monaten	nach 5 Monaten	nach 6 Monaten	nach 12 Monaten
	Arginin- oder Placeboeinnahme (18 g, 3 x täglich)							
Blutabnahme	x		x		x		x	
Urinsammlung (2 x 24 h)	x		x		x		x	
FFQ (je 2 Wochen)	x		x		x		x	
Aktivitätsprotokoll	x	x	x	x	x	x	x	
pQCT-Messung	x						x	x

Abbildung 3.1: Gesamtablauf der Studie

3.1.5 Verum- und Placebopräparat

Als Verumpräparat wurde Argininhydrochlorid (18 g pro Tag entsprechen 14,8 g Arginin pro Tag) der Firma Omikron GmbH, Neckarwestheim, Deutschland, verwendet. Als Placebopräparat wurde Glucose-Monohydrat (18 g) der Firma Euro OTC Pharma[®], Kamen, Deutschland, verwendet. Sowohl das Verum- als auch das Placebopräparat wurde gleichmäßig auf drei Einnahmezeiten verteilt zu den Mahlzeiten in Wasser oder Saft gelöst eingenommen. Dies entspricht 6 g L-Argininhydrochlorid oder Glucose-Monohydrat pro Einnahmezeitpunkt.

3.1.6 Blutabnahmen

Die Blutabnahmen erfolgten in zweimonatigem Abstand morgens zwischen 08:00 Uhr und 08:30 Uhr in Nüchternzustand. Die letzte Mahlzeit inklusive der Getränke durfte am Vorabend des Experimenttages bis 20:00 Uhr eingenommen werden.

Die Blutabnahmen erfolgten durch einmaligen Einstich in eine periphere Vene des Unterarmes mittels Butterfly (Sarstedt-System®). Zur Abnahme wurden Monovetten mit EDTA-Additiv und Serum-Monovetten verwendet. Die EDTA-Monovetten wurden vor und nach der Abnahme auf Eis gekühlt und zehn Minuten bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Serum-Monovetten wurden 30 Minuten nach der Blutabnahme bei 3500 rpm zentrifugiert. Die Proben wurden aliquotiert und bis zur Bearbeitung im tiefgefrorenen Zustand (-20°C bzw. -80°C) gelagert.

3.1.7 Urinabgaben

Jeweils zwei Tage vor den Blutabnahmen sammelten die Probandinnen zwei 24-Stunden Urine. Zum Sammeln der Urine erhielten die Probandinnen nummerierte, gewogene Polyethylenflaschen. Die Probandinnen wurden angehalten die Uhrzeit jeder Urinabgabe zu dokumentieren. Die Urine wurden bis zur Ankunft im DLR in Kühltaschen mit Kühlakkus gekühlt und bei Eintreffen im DLR sofort weiterverarbeitet. Dabei wurden die Gewichte der Urine durch Wiegen der Urinflaschen und Abzug der Flaschentara ermittelt und dokumentiert. Durch Poolen der einzelnen Urine eines Tages wurden 24-Stunden Urine ermittelt. Die 24-Stunden Urine wurden aliquotiert und bis zur Bestimmung der einzelnen Parameter bei -20°C tiefgefroren.

3.1.8 Körpergewicht

Die Probandinnen wurden initial sowie nach zwei, vier und sechs Monaten Supplementation nach einem standardisierten Protokoll (nüchtern, nach Urinabgabe, vor der Blutabnahme, mit Unterwäsche bekleidet) gewogen (Soehnle Personenwaage). Das Körpergewicht wurde dokumentiert.

3.1.9 Ernährungsfragebogen

Zur Erfassung des Ernährungsstatus und -musters wurde ein Ernährungsfragebogen in Form eines Food-Frequency-Questionnaires (FFQ) eingesetzt. Dieser ermöglicht es eine kurze Beschreibung des aktuellen Ernährungsmusters zu fest definierten Zeitpunkten innerhalb der Studie zu erhalten, da eine kontrollierte, nährstoffdefinierte Diät während der Studiendauer von einem halben Jahr, die zudem ambulant durchgeführt wurde, nicht möglich

war. Food-Frequency-Questionnaires sind ein geeignetes Mittel die Nährstoffzufuhr während Langzeitstudien zu beurteilen (Winkler, 1995). Dieser Fragebogen gibt Auskunft darüber, welche Mengen an bestimmten Lebensmitteln zu den einzelnen Mahlzeiten verzehrt werden. Ein FFQ in dieser Studie war für sieben Tage ausgelegt. Jeweils zwei Wochen vor den Blutabnahmen füllten die Probandinnen zwei FFQs in zwei aufeinander folgenden Wochen aus (siehe Anhang 8.2). Über die Auswertung mittels einer kommerziell erhältlichen Software (EBIS Pro) (Erhardt, 1999) wurde dann die Nährstoffzufuhr der Probandinnen abgeschätzt. Um die Genauigkeit des Protokollierens zu erhöhen, enthält das Protokoll Beschreibungen durchschnittlicher Portionsgrößen. Zudem hatten die Probandinnen die Möglichkeit nicht aufgeführte Lebensmittel sowie die verzehrte Portionsgröße zu ergänzen. Um ernährungsbedingte Einflussfaktoren auf den Knochenstoffwechsel ausschließen zu können, wurden die Probandinnen angehalten ihre Ernährungsgewohnheiten während der Studiendauer nicht zu verändern.

3.1.10 Aktivitätsprotokoll

Die sportliche Aktivität der Probandinnen wurde während der gesamten Studiendauer überprüft. Die Versuchsteilnehmerinnen füllten daher jeweils für zwei Monate ein Aktivitätsprotokoll (siehe Anhang 8.3) aus, in dem die Dauer und die Art der sportlichen Aktivität innerhalb dieser zwei Monate abgefragt wurde. Zudem konnten die Probandinnen zwischen sieben verschiedenen sportlichen Aktivitätsarten auswählen. Die Gesamtzeit der sportlichen Aktivität wurde in Minuten in einem freien Antwortformat angegeben.

3.2 Bestimmungsmethoden

3.2.1 Typ 1 Kollagen C-terminales Crosslink Telopeptid (CTX)

Testprinzip:

Die Konzentration von CTX im Serum wird mit Hilfe eines Festphasen-ELISAs (Enzym-Linked Immunosorbend Assay) quantitativ bestimmt (Osteometer Bio Tech A/S, OsteoPark, Herlev, Dänemark). In dem Assay werden zwei monoklonale Antikörper (AK) verwendet. Ein biotinylierter und ein Peroxidase-

konjugierter AK bilden einen Komplex mit dem in der Probe enthaltenen CTX aus. Dieser Komplex bindet mit dem biotinylierten AK an das mit Streptavidin beschichtete Röhrchen (Festphase). Die Absorption wurde im ELISA-Reader gemessen und ist der CTX-Konzentration in der Probe direkt proportional.

Assay-Durchführung:

Standards, Kontrollen und Serum-Proben wurden in mit Streptavidin beschichtete Mikrotiter-Röhrchen pipettiert. Eine Mixtur aus biotinyliertem und Peroxidase-konjugiertem AK wurde jedem Röhrchen hinzugegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT) auf dem Mischer wurden die Proben fünf mal gewaschen. Anschließend wurde ein chromogenes Substrat hinzugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe einer Stopplösung unterbrochen. Die Extinktion konnte bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen werden.

Der Nachweisbereich lag zwischen 448 und 17878 pmol/L. Der Intraassay-Variationskoeffizient betrug 5,2 % und der Interassay-Variationskoeffizient 6,7 %.

3.2.2 Carboxyterminales Propeptid des Typ 1 Prokollagen (PICP)

Testprinzip:

Zur Bestimmung von PICP im Serum wurde ein immunoradiometrischer Assay (Orion Diagnostika, Espoo, Finnland) gewählt. Zugrunde liegt das Prinzip der kompetitiven Hemmung. Radioaktiv markierte und unmarkierte Antigene konkurrieren um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen eines spezifischen Antiserums. Hohe Serum PICP-Konzentrationen werden durch geringe Radioaktivität, niedrige Serum PICP-Konzentrationen durch hohe Radioaktivität widerspiegelt. Die jeweiligen Konzentrationen werden anhand einer Standardkurve ermittelt.

Assay-Durchführung:

Die Totalaktivität (TA), Serumproben und Kontrollen wurden in Duplikaten, die nichtspezifische Bindung (NSB), die maximale Bindung (B0) und die Standards in Triplikaten in Polystyrolröhrchen angesetzt. In alle Röhrchen wurde ¹²⁵Jod markiertes PICP pipettiert. PICP-Antiserum wurde in alle Polystyrolröhrchen außer

in NSB und TA gegeben. In die NSB Röhren wurde die gleiche Menge destilliertes Wasser gegeben. Alle Röhren wurden mit Parafilm abgedeckt, gemischt und bei 37°C im Inkubator für zwei Stunden inkubiert. Ein Separationsreagenz mit einem zweiten AK, der an feste Partikel gebunden ist, wurde in alle Röhren außer TA pipettiert und gemischt. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt (30 Minuten bei RT), bei dem sich die noch freien Antigene an den zweiten Antikörper binden. Nach 15-minütiger Zentrifugation (2000 rpm, 4°C) wurde der Überstand abgesaugt. Die Radioaktivität des gebundenen Präzipitats wurde im Gamma-Counter gemessen und die in der Probe vorhandene PICP-Konzentration durch Interpolation über die Standardkurve ermittelt.

Der Nachweisbereich des Assays lag zwischen 25 und 500 µg/l. Der Intraassay-Variationskoeffizient betrug 2,8 % und der Interassay-Variationskoeffizient 5,1 %.

3.2.3 Knochenspezifische alkalische Phosphatase (bAP)

Testprinzip:

Die Bestimmung wurde mit Hilfe eines immunoradiometrischen Festphasen-Assays (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) im Zweischrittverfahren durchgeführt. Die Serumprobe reagiert mit zwei verschiedenen monoklonalen AKs, die spezifisch für zwei verschiedene Bindungsstellen des Moleküls sind. Ein AK ist an eine Kunststoffkugel gebunden, während der zweite AK mit ¹²⁵Jod markiert ist. Beide monoklonalen AKs binden nach dem Sandwichmodell an die bAP-Bindungsstellen. Die Menge der gemessenen Radioaktivität ist dem bAP-Spiegel im Blut direkt proportional.

Assay-Durchführung:

TA, Kontrollen und Serum Proben wurden in Duplikaten, Nullstandard und die übrigen Standards in Triplikaten angesetzt. Standards, Kontrollen und Plasmaproben wurden in die vorbereiteten Polystyrolröhren pipettiert. In jedes Teströhren wurde ein ¹²⁵Jod-Antikörpergemisch gegeben und umgerührt. Die mit AK beschichteten Kugeln wurden mit einem Kugeldispenser in Standards, Kontrollen und Plasmaproben gegeben. Nach kurzem Mischen inkubierten die Röhren bei 2 bis 8°C im Kühlschrank. Nach der Inkubation wurden alle Proben

drei mal mit einer Waschlösung gewaschen, dekantiert und drainiert. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Gamma-Counter. Der Nachweisbereich des Assays lag zwischen 7,75 µg/l und 60,7 µg/l. Der Intraassay-Variationskoeffizient betrug 7,4 % und der Interassay-Variationskoeffizient 4,8 %.

3.2.4 Intaktes Osteocalcin

Testprinzip:

Osteocalcin wurde mit Hilfe eines immunoradiometrischen Festphasen (ELSA)-Assays (CIS Diagnostik GmbH, Dreieich, Deutschland) bestimmt. In dem Assay werden zwei monoklonale AKs verwendet, die an sterisch entfernte Bindungsstellen des Osteocalcin-Moleküls binden und einen Sandwich-Komplex ausbilden. Ein AK ist dabei am ELSA-Festkörper gebunden, der zweite ist ¹²⁵Jod markiert. Die an der ELSA-Festphase gebundene Radioaktivität ist proportional der Konzentration von intaktem Osteocalcin in der Probe.

Assay-Durchführung:

Plasma-Proben wurden vor Gebrauch im Eisbad aufgetaut. Die lyophilisierten Standards und Kontrollen im Eisbad aufgelöst. Die Standards wurden dreifach, die TA, B0, Kontrollen und Serum Proben wurden in Doppelbestimmungen angesetzt. Nach Pipettieren in die ELSA-Röhrchen wurde in alle Röhrchen ¹²⁵Jod markiertes Anti-Human Osteocalcin gegeben. Die Röhrchen wurden gemischt und zwei Stunden (RT) auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden alle Röhrchen drei mal mit Waschlösung gewaschen. Die an ELSA gebundene Radioaktivität wurde im Gamma-Counter gemessen.

Der Nachweisbereich des Assays lag zwischen 4,0 und 172,0 ng/ml. Der Intraassay-Variationskoeffizient betrug 3,7 % und der Interassay-Variationskoeffizient 4,0 %.

3.2.5 Parathormon (PTH)

Testprinzip:

Die Bestimmung erfolgte mit einem zweiseitigen immunoradiometrischen Assay (IRMA) (Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA, USA). Zwei

verschiedene polyklonale AKs, die spezifisch für zwei verschiedene Bereiche des PTH-Moleküls sind, bilden zusammen mit PTH einen Sandwich-Komplex aus. Dabei ist ein AK 125 Jod markiert, der Zweite ist an eine Kugel gebunden. Die Radioaktivität des Komplexes steht in direktem Verhältnis zu der in der Probe vorhandenen Konzentration an PTH.

Assay-Durchführung:

Standards, Kontrollen, Plasma-Proben und Teströhrchen wurden während des Ansatzes im Eisbad gelagert. Die Standards wurden in Triplikaten angesetzt. TA, Nullstandard, Kontrollen und Plasma-Proben in Duplikaten. 125 Jod radioaktiv markierter AK wurde in alle Röhrchen, außer der TA pipettiert. Anschließend wurde mit dem Kugel-Dispensor je eine biotinylierte Kugel gegeben. Es folgte eine Inkubation für 22 Stunden bei RT. Nach zweimaligem Waschen mit Waschlösung und dekantieren der Röhrchen wurde die Aktivität im Gamma-Counter gemessen.

Der Nachweisbereich des Assays lag zwischen 7,5 und 505,0 pg/ml. Der Intraassay-Variationskoeffizient betrug 2,6 % und der Interassay-Variationskoeffizient 5,9 %.

3.2.6 Insulin-like growth factor 1 (IGF 1)

Testprinzip:

Der IGF 1 IRMA (Immunoradiometrischer Assay) verwendet zwei polyklonale, regionspezifische AKs (Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA, USA). Ein AK ist an Biotin gebunden, während der zweite AK radioaktiv markiert ist. Das IGF 1 in der Probe bildet einen Sandwich-Komplex zwischen diesen beiden AKs. Als Festphase dient eine Avidin beschichtete Kugel, die den Sandwichkomplex bindet. Die gemessene Radioaktivität ist direkt proportional zu der IGF 1 Menge in der Probe.

Assay-Durchführung:

Die Serum-Proben und Kontrollen wurden vor Einsatz in den Assay angesäuert. Nach Rekonstruktion der Standards und Kontrollen mit bidestilliertem Wasser wurden selbige und die Serum-Proben in die vorbereiteten Polystyrolröhrchen pipettiert. TA, Kontrollen und Serum-Proben wurden in Duplikaten, Nullstandard

und übrige Standards in Triplikaten angesetzt. Biotinylierter und ^{125}Jod -markierter AK wurden nacheinander in alle Röhrchen pipettiert und umgerührt. Mit Avidin beschichtete Kugeln wurden mit einer Kunststoffpistole in die Standards, Kontrollen und Serum-Proben gegeben. Nach einer Inkubation (4 h, RT) auf dem Mischer wurden alle Proben gewaschen, dekantiert und drainiert. Durch Messung der Radioaktivität im Gamma-Counter wurde die IGF 1-Konzentration der Proben bestimmt.

Der Nachweisbereich des Assays lag zwischen 32 und 1100 ng/ml. Der Intraassay-Variationskoeffizient betrug 4,0 % und der Interassay-Variationskoeffizient 11,8 %.

3.3 Transformiertes Calcium

Zur Beurteilung des Calciumstoffwechsels kann die Bestimmung von Gesamtcalcium und ionisiertem Calcium im Blut herangezogen werden. Das Gesamtcalcium ist dem ionisierten Calcium gleichwertig, wenn keine Veränderung des Gesamteiweißes vorliegt. Ist nur eine Messung der Gesamtcalcium-Konzentration ($\text{Ca}_{\text{gemessen}}$) möglich, so kann dies bei Vorliegen einer abnormalen Gesamteiweiß-Konzentration zur besseren Vergleichbarkeit auf einen Albuminwert von 4 g/dl (Korrektur nach Payne *et al.*, 1979) korrigiert werden. Dieser Wert wird transformiertes Calcium genannt. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Calcium}_{\text{transformiert}} = \left(\text{Calcium}_{\text{gemessen}} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right] - 0,025 \right) * \text{Albumin}_{\text{gemessen}} \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] + 1.0$$

Die Bestimmung von Calcium und Albumin in Blut und Urin erfolgte mit Hilfe eines vollselektiven, diskreten Mehrfachanalysensystems (Hitachi 704, Boehringer, Mannheim).

3.4 Gesamtstickstoff-Analyse

Testprinzip:

Die Probe wird in einer Atmosphäre von relativ reinem Sauerstoff bei 1050°C im hochsensitiven Stickstoffanalysator (Antec 7000 V, CTC Analytics AG) verbrannt. Chemisch gebundener Stickstoff wird dabei quantitativ zu Stickstoffmonoxid

überführt. Das freigesetzte Stickstoffmonoxid wird anschließend mit Ozon zu einem meta-stabilen Sauerstoffradikal umgewandelt. Der Übergang in den stabilen Grundzustand kann photometrisch gemessen werden und ist direkt proportional zu der Gesamtstickstoffmenge in der Probe.

Die Gesamtstickstoff-Bestimmung erfolgte pro Probandin aus zwei 24-Stunden-Urinen. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde der Mittelwert aus den beiden gemessenen Werten genommen.

Der Variationskoeffizient wurde aus 20 Analysen einer Protein-Standardlösung (α -Lactalbumin, 2,5 mg/mL) ermittelt und lag unter 3 %.

3.5 Messung der Knochenstruktur und Knochendichte

Der spongiöse und kortikale Knochen distal und proximal an Radius und Tibia wurde initial, sowie nach sechs und 12 Monaten Studiendauer computertomographisch mit Hilfe des XCT 2000TM (Stratec, Birkenfeld, Deutschland) eines pQCT-Messgerätes erfasst (Abbildung 3.2). Dieses Messgerät misst durch eine bildgebende, hochpräzise, quantitative Computertomographie. Als Strahlenquelle wird eine Röntgenröhre mit einem Energieniveau von 38,5 KeV eingesetzt. Gemessen wird dabei die echte volumetrische Knochendichte (mg/cm^3) der Kortikalis und der Spongiosa distal und proximal sowohl des Radius als auch der Tibia unter einer Strahlenbelastung von $< 2 \mu\text{Sv}$. Der Variationskoeffizient beträgt 0,5 bis 1,4 %. Zusätzlich misst das Gerät die Geometrie des Knochens, was zudem eine Abschätzung der Knochenfestigkeit erlaubt. Das Gerät befindet sich in der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde der Universität Köln.

3.5.1 Messung am Radius

Vor der Messung scannt das pQCT planar ein Übersichtsbild (scout view) im distalen Bereich des Radius, anhand dessen die Referenzlinie medial an der Endplatte des Radius gelegt wird. Nach dieser Linie setzt das Gerät nach proximal gehend automatisch die zu scannende Position bei 4 % der Gesamtlänge des Unterarms fest. Es wird eine einzelne Dünnschicht-Aufnahme von 2,0 mm Dicke mit einer Voxelgröße von 0,4 mm gescannt. Im metaphysären, distalen Bereich

des Radius wird die kompakte Knochenmasse bestimmt. Die zu scannende Position liegt, ausgehend von der Referenzlinie, bei 65 % der Gesamtlänge des Unterarmes. Jedes einzelne Tomogramm kann qualitativ beurteilt werden.

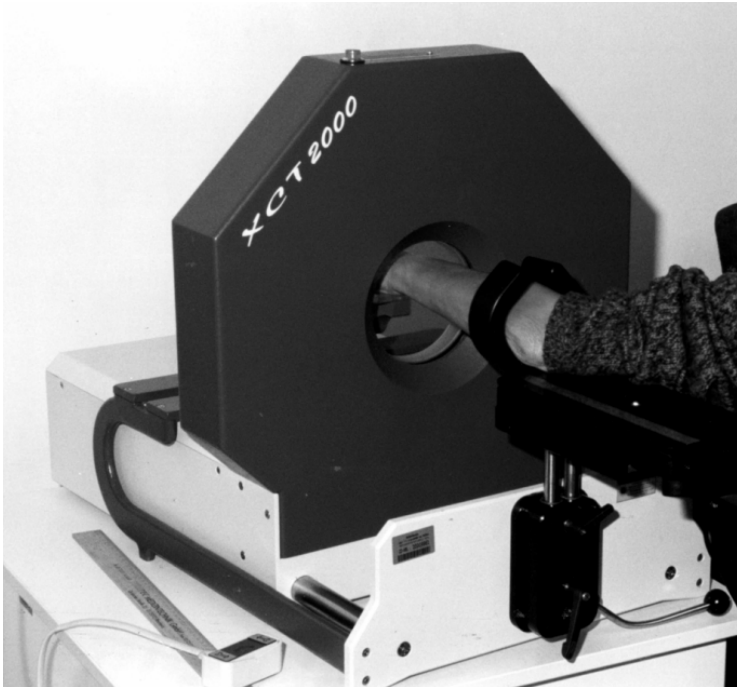


Abbildung 3.2: pQCT-Messgerät

3.5.2 Messung an der Tibia

Ebenso wie am Radius wird ein scout view im distalen Bereich der Tibia gescannt und die Referenzlinie im medialen Bereich der Endplatte der Tibia platziert. Gemessen wird an den Positionen 4 % und 38 % der Unterschenkellänge.

Bei der Messung nach sechs und 12 Monaten wird computerkontrolliert an den selben Messpunkten an Radius und Tibia gemessen.

3.5.3 Messung der Knochendichte

Die Gesamte Knochendichte (BMD_{tot}) setzt sich zusammen aus der trabekulären und kortikalen mineralisierten Knochenmasse dividiert durch das relative Volumen des zugehörigen trabekulären und kortikalen Kompartiments. Die Maßeinheit ist mg/cm^3 . Dabei erlaubt die Messung am 4 % Messort des Radius eine Aussage über die trabekuläre Knochendichte (BMD_{trab}), die Messung am 65 % Messort des

Radius eine Aussage über die kortikale Knochendichte (BMD_{kort}). Ebenso wie am Radius erlaubt die Messung am 4 % Messort der Tibia eine Aussage über die trabekuläre Knochendichte und die Messung am 38 % Messort eine Aussage über die kortikale Knochendichte.

3.5.4 Messung der Knochenmasse

Die Knochenmasse (BMC) setzt sich zusammen aus der mineralisierten Masse (BMD) pro Einheit der Knochenquerschnittsfläche (CSA). Die Berechnung der BMC erfolgt nach folgender Formel:

$$BMC \left[\frac{mg}{mm} \right] = \frac{CSA [mm^2] * BMD \left[\frac{mg}{cm^3} \right]}{1000}$$

BMC = Knochenmasse

CSA = Knochenquerschnittsfläche

BMD = Knochendichte

3.5.5 Messung der Knochengeometrie

Zur Beurteilung von Veränderungen der Geometrie wird die gesamte Knochenquerschnittsfläche (CSA_{tot}), die kortikale Knochenquerschnittsfläche (CA) und die Kortikalisdicke an 65 % Messort erfasst. Die Beziehung zwischen CSA_{tot} , CA und der Kortikalisdicke an 65 % gibt dabei Auskunft über Veränderungen des Knochendurchschnitts.

3.6 Messung der Muskelkraft

3.6.1 Messung der Muskelfläche

Die Messung der Muskelquerschnittsfläche (Muskel CSA) erfolgte ebenfalls mit dem pQCT Gerät. Der Messort am Radius wurde am 65 % Messort durchgeführt, an der Tibia am 66 % Messort, da an diesen Messorten der größte Muskelumfang ist.

3.6.2 Messung des Strength-Strain Index (SSI)

Der Strength-Strain Index errechnet sich aus der Kortikalisdicke und der dazugehörigen geometrischen Anordnung im Knochenquerschnitt, dargestellt als

„polares Trägheitsmoment des Querschnitts“. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$SSI [mm^3] = \sum \frac{(d^2 * A * vBMD_{(vox)})}{d_{(max)}}{vBMD_{(max)}}$$

- d = Entfernung eines Voxels (hier 0,4 mm x 0,4 mm) vom Zentrum der Gravitation der Fläche des Kortikalisquerschnitts (mm)
 A = Fläche des Voxels
 vBMD_(vox) = Knochendichte im Voxel (mg/cm³)
 Vbmd_(max) = maximale physiologische Knochendichte
 d_(max) = maximale Entfernung eines Voxels vom Gravitationszentrum

3.6.3 Messung der Griffstärke

Gemessen wurde die Muskelkraft der Hand mit Hilfe eines hydraulischen Handdynamometers (Jamar Handdynamometer, Jackson, USA). Das Gerät (Abbildung 3.3) hält dabei automatisch die höchste gemessene Kraft in Kilogramm (kg) auf einer Anzeige fest. Gemessen wird die Kraft an beiden Händen. Der Ellenbogen befindet sich dabei in einem 90° Winkel. Die Probandin drückt mit ganzer Kraft die zwei Metallstäbe des Dynamometers zusammen, so dass die maximale Handkraft in der Anzeige abgelesen werden kann. Jede Messung wurde zwei mal wiederholt.



Abbildung 3.3: Jamar Handdynamometer

3.7 Statistik

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD). Durchgeführt wurde die statistische Auswertung mit dem Statistikprogramm SYSTAT (2000). Der Einfluss der L-Argininhydrochlorid-Supplementation im Vergleich zu Placebo wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, General Linear Model) mit Messwertwiederholung (repeated measure design), die zudem Veränderungen im zeitlichen Verlauf der Studie anzeigt, untersucht. Dabei wurde der angepasste Greenhouse-Geisser-Wert als Signifikanzschranke verwendet. War der p-Wert kleiner als das Signifikanzniveau von 0,05 wurde die Nullhypothese verworfen und die post-hoc Testung mit einem t-Test mit Bonferroni-Adjustierung zur Fehlerminimierung durchgeführt um die einzelnen Messzeitpunkte zu vergleichen.

Statistische signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Signifikante Veränderungen der untersuchten Parameter im zeitlichen Verlauf aller Probandinnen sind mit einem offenen Kreis (°) gekennzeichnet.

Ist der p-Wert kleiner 0,001 so wird, zum besseren Verständnis, nicht der tatsächliche p-Wert sondern $p < 0,001$ verwendet. Alle p-Werte mit $p > 0,001$ werden als exakte Werte beschrieben.

4 Ergebnisse

4.1 Körpergewicht

In Tabelle 4.1 ist das morgendliche Körpergewicht in Kilogramm (kg) der Probandinnen im Studienverlauf dargestellt. Das Körpergewicht liegt im Mittel bei $66,5 \pm 10,6$ kg in der Verumgruppe und bei $63,8 \pm 8,5$ kg in der Plazebogruppe. Die statistische Auswertung mittels ANOVA (repeated measure design) zeigte keine signifikanten Unterschiede des Körpergewichtes der Probandinnen im Vergleich der beiden Gruppen ($p = 0,161$; Greenhouse-Geisser angepasst).

Ebenso sind keine statistisch signifikanten Veränderungen des Körpergewichts beider Gruppen im zeitlichen Verlauf erkennbar ($p = 0,374$; Greenhouse-Geisser angepasst). Sowohl bei der Verum- als auch bei der Plazebogruppe blieb das Körpergewicht im Verlauf der Studie konstant.

Tabelle 4.1: Körpergewichte in Kilogramm (kg) der Probandinnen (Verumgruppe und Plazebogruppe) initial, sowie nach zwei, vier und sechs Monaten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD)

	Initial Körpergewicht in kg	2 Monate Körpergewicht in kg	4 Monate Körpergewicht in kg	6 Monate Körpergewicht in kg	p
Verumgruppe	66,3 \pm 10,5	66,2 \pm 10,7	66,6 \pm 10,8	66,8 \pm 10,4	ns
Plazebogruppe	64,2 \pm 9,1	63,5 \pm 8,4	63,8 \pm 8,3	63,7 \pm 8,1	

ns = nicht signifikant

p = Unterschied zwischen den Gruppen

4.2 Ernährungsfragebogen

Tabelle 4.2 zeigt die Auswertung der Ernährungsfragebögen. Der prozentuale Anteil der Hauptnährstoffe an der Gesamtnährstoffzufuhr verteilt sich in der Verumgruppe im Mittel auf $55,6 \pm 0,2$ % Kohlenhydrate (KH), $23,3 \pm 0,7$ % Fett, $19,4 \pm 0,7$ % Proteine und $1,7 \pm 0,3$ % Alkohol pro Tag. In der Plazebogruppe liegt die prozentuale Verteilung im Mittel bei $57,4 \pm 0,5$ % KH, $22,2 \pm 0,8$ % Fett, $18,6 \pm 1,6$ % Proteine und $1,8 \pm 0,3$ % Alkohol pro Tag.

Tabelle 4.2: Auswertung der Ernährungsfragebögen der beiden untersuchten Gruppen. Dargestellt ist die durchschnittliche Energie- und Makronährstoffaufnahme sowie die Aufnahme von Calcium und Arginin pro Tag innerhalb von zwei Wochen vor jeder Blutabnahme initial sowie nach zwei, vier und sechs Monaten Intervention. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD

Verumgruppe	Initial	nach 2 Monaten	nach 4 Monaten	nach 6 Monaten
MJ	8,279 \pm 0,919	7,856 \pm 0,759	7,750 \pm 0,730	7,915 \pm 0,604
KH (g)	207,2 \pm 25,3	211,3 \pm 26,3	209,3 \pm 18,4	215,8 \pm 17,2
Fett (g)	90,3 \pm 13,9	87,8 \pm 9,0	86,8 \pm 10,8	88,2 \pm 8,8
Protein (g)	68,8 \pm 8,5	75,9 \pm 9,3	72,3 \pm 9,9	78,2 \pm 8,0
Alkohol (g)	5,5 \pm 2,4	7,4 \pm 1,7	7,6 \pm 3,3	6,0 \pm 2,7
Calcium (g)	1196,0 \pm 170,4	1211,9 \pm 110,3	1211,2 \pm 178,0	1110,5 \pm 164,3
Arginin (g)	3,5 \pm 0,5	3,8 \pm 0,5	3,6 \pm 0,5	4,0 \pm 0,4
Plazebogruppe	Initial	nach 2 Monaten	nach 4 Monaten	nach 6 Monaten
MJ	8,201 \pm 0,823	8,010 \pm 1,055	8,074 \pm 0,587	7,844 \pm 0,837
KH (g)	220,1 \pm 19,5	211,3 \pm 24,7	209,3 \pm 24,6	209,6 \pm 30,9
Fett (g)	88,5 \pm 12,5	80,2 \pm 14,1	79,5 \pm 7,0	80,1 \pm 8,5
Protein (g)	64,8 \pm 6,2	72,0 \pm 12,7	72,2 \pm 9,3	66,6 \pm 8,9
Alkohol (g)	6,4 \pm 3,2	7,6 \pm 4,1	7,3 \pm 4,1	5,4 \pm 3,0
Calcium (g)	1060,0 \pm 117,4	1082,6 \pm 182,8	1244,2 \pm 219,2	919,5 \pm 156,8
Arginin (g)	3,2 \pm 0,3	3,6 \pm 0,6	3,3 \pm 0,5	3,4 \pm 0,5
p	ns	ns	ns	ns

ns = nicht signifikant

p = Unterschied zwischen den Gruppen

MJ = Megajoule

KH = Kohlenhydrate

Die statistische Auswertung mittels ANOVA (repeated measure design) zeigte keine signifikanten Unterschiede bei der Zufuhr der Hauptnährstoffe ($p > 0,05$ für KH, Fett, Protein, Alkohol; Greenhouse-Geisser angepasst), sowie von Arginin ($p = 0,314$; Greenhouse-Geisser angepasst) und Calcium ($p = 0,398$; Greenhouse-Geisser angepasst) im Vergleich beider Gruppen.

Die ANOVA zeigte zudem keine statistisch signifikanten Veränderungen der Nährstoffzufuhr im Zeitverlauf des gesamten Studienkollektivs ($p > 0,05$ für KH, Fett, Protein, Alkohol; Greenhouse-Geisser angepasst). Auch die mit der Nahrung aufgenommene Argininzufuhr zeigte keine statistisch signifikante Veränderung im Studienverlauf in den beiden untersuchten Gruppen ($p = 0,059$; Greenhouse-Geisser angepasst). Jedoch konnte eine signifikante Abnahme der Calciumzufuhr im Zeitverlauf ermittelt werden ($p = 0,030$; Greenhouse-Geisser angepasst). Die

Nachtestung (gepaarter t-Test mit Bonferroni-Adjustierung) zeigte dabei eine signifikante Abnahme ($p = 0,012$) der Calciumzufuhr zwischen dem vierten und sechsten Monat der Intervention. Die Calciumzufuhr liegt dennoch in beiden Gruppen während des gesamten Studienzeitraums im empfohlenen Bereich für postmenopausale Frauen (Deutsche Gesellschaft fuer Ernährung, 2000). So liegt die Calciumzufuhr der Verumgruppe mit Werten zwischen $1110,5 \pm 164,3$ mg und $1211,9 \pm 110,3$ mg und die Zufuhr in der Plazebogruppe insgesamt mit Werten zwischen $919,5 \pm 156,8$ mg und $1244,2 \pm 219,9$ mg im empfohlenen Bereich.

Die orale Argininaufnahme über die tägliche Ernährung liegt mit Werten zwischen $3,5 \pm 0,5$ g und $4,0 \pm 0,4$ g in der Verumgruppe bei einem Körpergewicht von durchschnittlich $66,5 \pm 10,6$ kg und zwischen $3,2 \pm 0,3$ g und $3,6 \pm 0,6$ g bei einem Körpergewicht von durchschnittlich $63,8 \pm 8,5$ kg in der Plazebogruppe etwas unterhalb der in der Literatur beschriebenen durchschnittlichen Argininaufnahme von 5 g pro Tag für einen 70 kg schweren Menschen (Visek, 1986).

4.3 Aktivitätsfragebogen

Bei der Auswertung der Aktivitätsfragebögen (Tabelle 4.3) lässt sich eine deutliche Präferenz der Probandinnen beider Gruppen für Sportarten mit niedriger Kraftintensität erkennen. Zum besseren Verständnis wurden hier jeweils die Veränderungen der sportlichen Aktivität als prozentuale Abweichung vom initialen Mittelwert dargestellt. Die bevorzugten Aktivitäten der Probandinnen lagen überwiegend im Ausdauersportbereich. Ein Vergleich (ANOVA, repeated measure design) der beiden Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede bei der Verteilung und Dauer der einzelnen Sportarten ($p > 0,05$; Greenhouse-Geisser angepasst).

Auch die statistische Testung von Veränderungen im Studienverlauf wies keine signifikanten Veränderungen der Verteilung und Dauer der einzelnen sportlichen Aktivitäten in den beiden untersuchten Gruppen auf (für alle Aktivitäten $p > 0,05$; Greenhouse-Geisser angepasst).

Tabelle 4.3: Sportliche Aktivität der Probandinnen (Verum- und Plazebogruppe) im Studienverlauf. Dargestellt ist die Dauer der sportlichen Aktivität zu Beginn der Studie (initial) in Minuten pro Woche (Mittelwerte \pm SD) und die prozentuale Abweichung ($\Delta\%$) der sportlichen Aktivität nach zwei, vier und sechs Monaten Intervention in Bezug auf den Anfangswert

Verumgruppe	Initial Aktivität (min/Woche)	$\Delta\%$ Abweichung der Aktivität vom initialen Wert nach 2 Monaten	$\Delta\%$ Abweichung der Aktivität vom initialen Wert nach 4 Monaten	$\Delta\%$ Abweichung der Aktivität vom initialen Wert nach 6 Monaten
Radfahren	163,0 \pm 249,1	20,6 \pm 57,6	51,5 \pm 86,6	71,6 \pm 168,9
Gymnastik	61,0 \pm 96,6	5,7 \pm 96,4	26,3 \pm 129,6	22,2 \pm 107,1
Ausdauersport	59,0 \pm 122,0	-3,8 \pm 49,3	-8,4 \pm 59,8	4,8 \pm 69,2
Kraftsport	4,0 \pm 16,4	0,0 \pm 0,0	-6,7 \pm 26,7	6,7 \pm 26,7
Kampfsport	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Spielsport	26,0 \pm 71,1	1,3 \pm 9,9	11,1 \pm 78,0	1,3 \pm 22,7
Wandern	282,0 \pm 277,3	-25,7 \pm 33,9	-9,7 \pm 59,3	-6,4 \pm 62,8
Plazebogruppe	Initial Aktivität (min/Woche)	$\Delta\%$ Abweichung der Aktivität vom initialen Wert nach 2 Monaten	$\Delta\%$ Abweichung der Aktivität vom initialen Wert nach 4 Monaten	$\Delta\%$ Abweichung der Aktivität vom initialen Wert nach 6 Monaten
Radfahren	118,0 \pm 153,2	1,2 \pm 37,8	14,3 \pm 53,0	26,2 \pm 108,8
Gymnastik	82,0 \pm 89,6	-4,7 \pm 16,4	-2,2 \pm 48,9	-1,5 \pm 50,5
Ausdauersport	114,7 \pm 261,8	17,3 \pm 73,5	23,4 \pm 111,4	35,6 \pm 100,4
Kraftsport	2,0 \pm 7,8	6,7 \pm 25,8	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Kampfsport	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Spielsport	40,0 \pm 83,8	-3,3 \pm 39,9	11,7 \pm 31,2	21,1 \pm 38,0
Wandern	208,0 \pm 220,9	-16,7 \pm 83,0	15,9 \pm 95,5	0,9 \pm 82,0
p	ns	ns	ns	ns

ns = nicht signifikant

p = Unterschied zwischen den Gruppen

* Ausdauersport = Jogging, Dauerlauf, Schwimmen

4.4 Stickstoffausscheidung

Die renale Stickstoffausscheidung als „Compliance“-Parameter ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Die statistische Auswertung (ANOVA, repeated measure design) ergab einen signifikanten Unterschied im Vergleich der Verum- mit der Plazebogruppe ($p = 0,008$; Greenhouse-Geisser angepasst). Die Nachtestung (ungepaarter t-Test mit Bonferroni-Adjustierung) ergab einen signifikanten Unterschied zum Messzeitpunkt nach zwei Monaten von $p < 0,001$, nach vier Monaten von $p = 0,018$ und nach sechs Monaten von $p < 0,001$. Da die initialen Werte statistisch nicht signifikant unterschiedlich sind ($p = 1,00$), sind die

signifikanten Unterschiede in der renalen Stickstoffausscheidung nach zwei, vier und sechs Monaten als Folge der L-Argininhydrochlorid-Supplementation einzustufen. Die Stickstoffausscheidung zu Anfang der Studie lag in der Verumgruppe bei $443,7 \pm 109,9 \mu\text{mol}/\text{min}$ und stieg nach zwei Monaten Intervention im Mittel um 51,7 % an. Nach vier Monaten lag die Ausscheidung in der Verumgruppe um 41,6 % höher als der Anfangswert und blieb auch nach sechs Monaten Intervention um 47,3 % gegenüber der initialen Konzentration erhöht. In der Plazebogruppe blieb die Stickstoffausscheidung im Zeitverlauf mit einem Anfangswert von $417,3 \pm 131,7 \mu\text{mol}/\text{min}$ und einem Endwert von $403,6 \pm 71,7 \mu\text{mol}/\text{min}$ konstant.

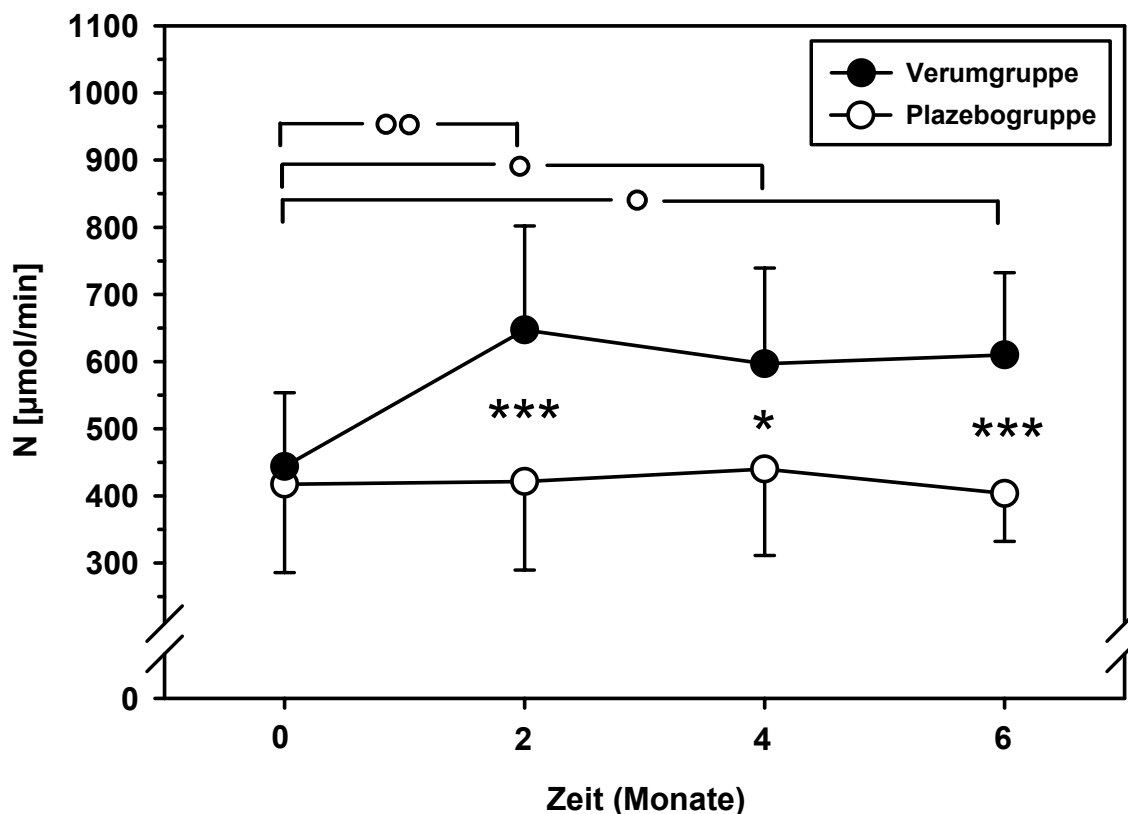


Abbildung 4.1: Renale Stickstoffausscheidung im 24-Stunden Harn initial, sowie nach zwei, vier und sechs Monaten Intervention. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Verum- und der Plazebogruppe. ANOVA: Unterschied zwischen den Gruppen: $p = 0,008$ (Nachtestung: * $p = 0,018$; *** $p < 0,001$); Veränderung im Studienverlauf: $p < 0,001$; (Nachtestung: ° $p = 0,009$; °° $p < 0,05$)

Im zeitlichen Verlauf zeigten sich ebenfalls signifikante Veränderungen der Stickstoffausscheidung beider Gruppen ($p < 0,001$; Greenhouse-Geisser

angepasst). Die Nachtestung mittels gepaartem t-Test mit Bonferroni-Adjustierung zwischen den einzelnen Messzeitpunkten ergab eine signifikante Erhöhung der Stickstoffausscheidung vom initialen Messzeitpunkt zum Messzeitpunkt nach zwei Monaten ($p = 0,009$) sowie vom initialen Messzeitpunkt zum Messzeitpunkt nach vier Monaten ($p = 0,027$) und vom initialen Messzeitpunkt zum Messzeitpunkt nach sechs Monaten ($p = 0,043$).

4.5 Messung der Muskelkraft

4.5.1 Muskelquerschnittsfläche (Muskel CSA) des Unterarms

Abbildung 4.2 zeigt die Muskel CSA gemessen am 65 % Messort des Unterarmes beider untersuchter Gruppen. Die statistische Auswertung mittels ANOVA (repeated measure design) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen bei Betrachtung der Muskelquerschnittsfläche des Unterarmes ($p = 0,298$; Greenhouse-Geisser angepasst).

Jedoch konnte eine zeitliche Veränderung der Muskelquerschnittsfläche beider Gruppen im Studienverlauf festgestellt werden ($p < 0,001$; Greenhouse-Geisser angepasst). Die Nachtestung (gepaarter t-Test mit Bonferroni-Adjustierung) zeigte eine signifikante Abnahme der Muskelquerschnittsfläche der Verum- und der Plazebogruppe von der initialen Messung zur Messung nach sechs Monaten ($p = 0,001$).

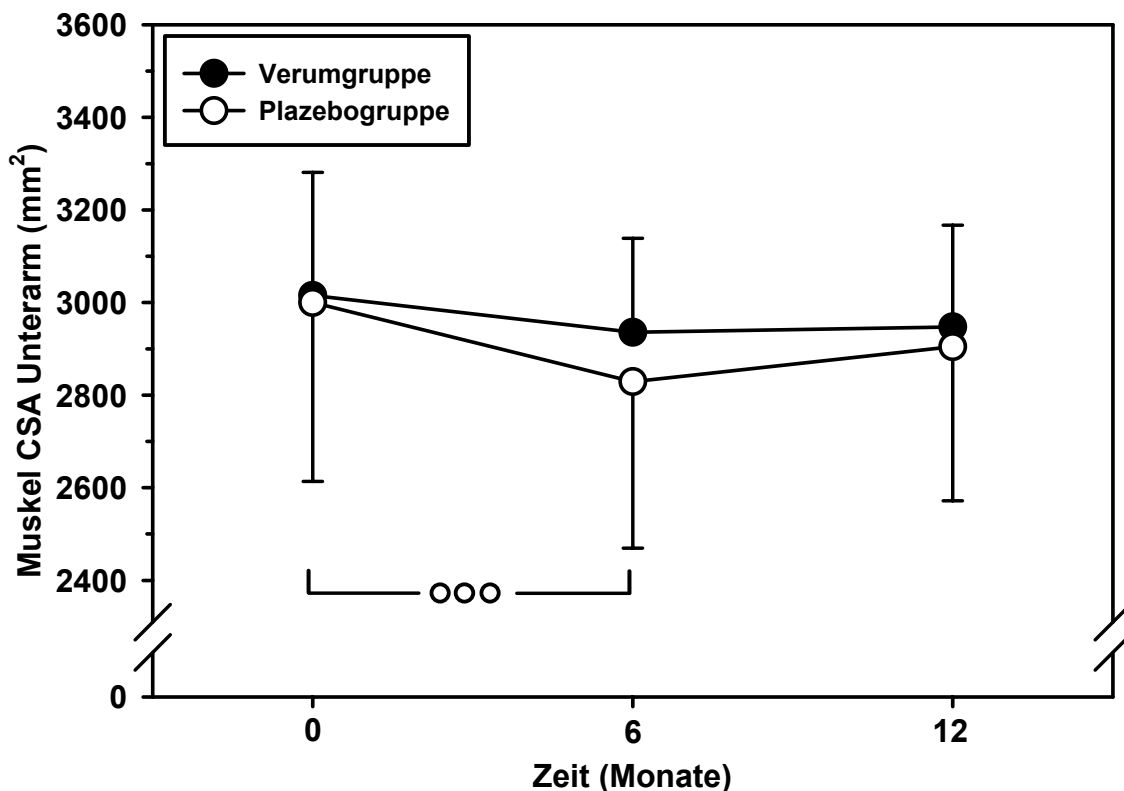


Abbildung 4.2: Die Abbildung zeigt die Muskelquerschnittsfläche (Muskel CSA) gemessen am Unterarm der beiden untersuchten Gruppen initial, sowie nach sechs und 12 Monaten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD. ANOVA: Unterschied zwischen den Gruppen: $p = 0,298$; Veränderung im Studienverlauf: $p < 0,001$ (Nachtestung: $^{ooo}p = 0,001$)

4.5.2 Muskelquerschnittsfläche (Muskel CSA) des Unterschenkels

Die Muskelquerschnittsfläche (Muskel CSA) gemessen am 38 % Messort des Unterschenkels der Verum- und der Placebogruppe ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Im statistischen Vergleich der beiden Gruppen (ANOVA, repeated measure design) wies die Muskel CSA des Unterschenkels keine signifikanten Unterschiede auf ($p = 0,780$; Greenhouse-Geisser angepasst).

Bei der statistischen Betrachtung von Veränderungen im zeitlichen Verlauf weist die ANOVA eine signifikante Veränderung ($p = 0,007$; Greenhouse-Geisser angepasst) der Muskel CSA des Unterschenkels beider untersuchter Gruppen auf. Dabei zeigte die statistische Nachtestung (gepaarter t-Test, Bonferroni-adjustiert) eine signifikante Zunahme der Muskelquerschnittsfläche des Unterschenkels

zwischen der basalen Messung zu Studienbeginn und der Messung nach sechs Monaten ($p = 0,001$). Zwischen der basalen Messung und der Messung nach 12 Monaten ist eine Tendenz in Richtung Zunahme der Muskelquerschnittsfläche des Unterschenkels zu erkennen ($p = 0,057$).

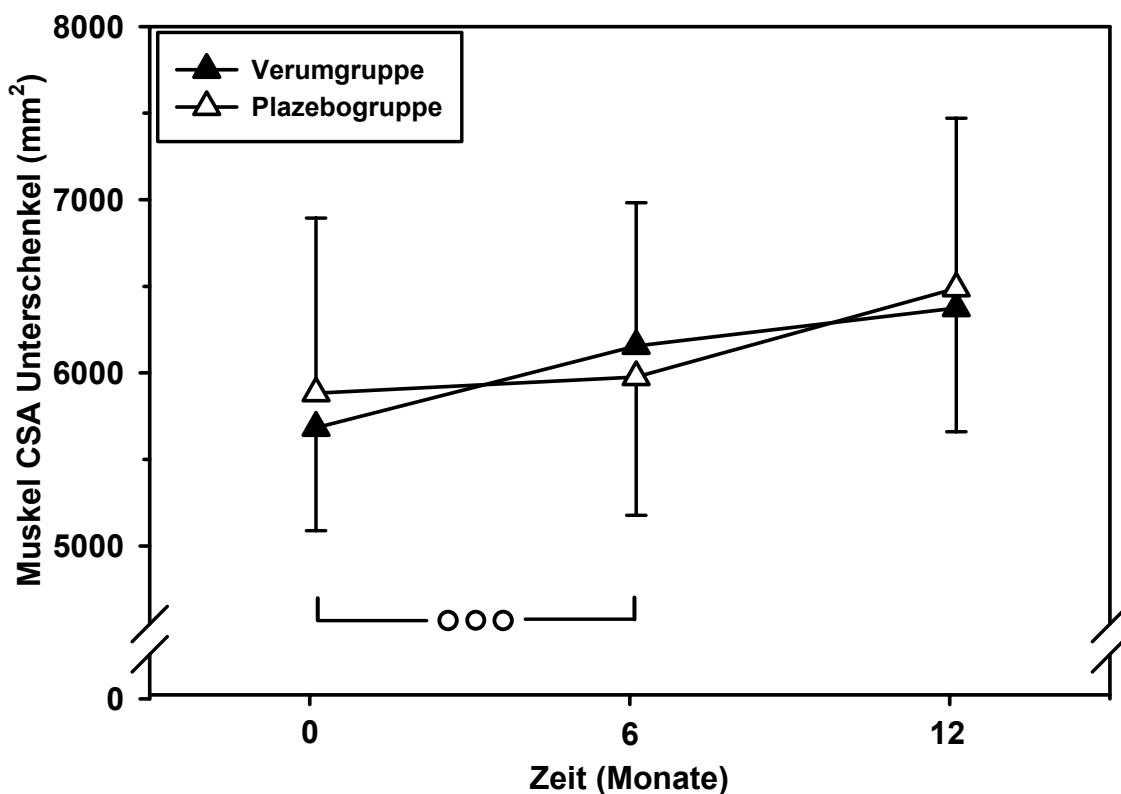


Abbildung 4.3: Die Abbildung zeigt die Muskelquerschnittsfläche (Muskel CSA) des Unterschenkels der beiden untersuchten Gruppen im Zeitverlauf, dargestellt als Mittelwerte \pm SD. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p = 0,780$; Veränderung im Studienverlauf: $p = 0,007$ (Nachtestung: $^{ooo}p = 0,001$)

4.5.3 Strength-Strain Index (SSI) des Radius

Der berechnete Strength-Strain Index (SSI) des Radius der Verum- und der Plazebogruppe im zeitlichen Verlauf der Studie ist in Tabelle 4.4 dargestellt. Die ANOVA (repeated measure design) zeigte keine signifikanten Unterschiede des SSI zwischen den beiden untersuchten Gruppen ($p = 0,389$; Greenhouse-Geisser angepasst). Ebenso konnte keine signifikante Veränderung im zeitlichen Verlauf festgestellt werden ($p = 0,706$; Greenhouse-Geisser angepasst).

4.5.4 Strength-Strain Index (SSI) der Tibia

In Tabelle 4.4 ist ferner der berechnete Strength-Strain Index (SSI) der Tibia der beiden beobachteten Gruppen im zeitlichen Verlauf dargestellt. Bei der statistischen Auswertung (ANOVA, repeated measure design) konnte kein signifikanter Unterschied des SSI zwischen den beiden untersuchten Gruppen beobachtet werden ($p = 0,783$; Greenhouse-Geisser angepasst). Auch der zeitliche Verlauf zeigte keine signifikanten Veränderungen des SSI beider untersuchter Gruppen ($p = 0,406$; Greenhouse-Geisser angepasst).

Tabelle 4.4: Berechneter Strength-Strain Index (SSI) des Radius und der Tibia der beiden untersuchten Gruppen initial sowie nach sechs und 12 Monaten dargestellt als Mittelwerte \pm SD

Zeit in Monaten	SSI Radius (mm ³)		p	SSI Tibia (mm ³)		p
	Verumgruppe	Plazebogruppe		Verumgruppe	Plazebogruppe	
0	266,3 \pm 56,1	240,3 \pm 38,8	ns	1460,0 \pm 193,4	1408,6 \pm 134,5	ns
6	258,1 \pm 51,6	237,7 \pm 42,1		1460,5 \pm 195,4	1397,8 \pm 134,7	
12	252,7 \pm 48,7	233,7 \pm 36,5		1450,8 \pm 212,6	1393,9 \pm 137,2	

ns = nicht signifikant

p = Unterschied zwischen den Gruppen

4.5.5 Griffstärke

Ein weiteres Beurteilungskriterium der Muskelkraft ist die Griffstärke, gemessen mit einem hydraulischen Handdynamometer (Abbildung 4.4). Die statistische Auswertung (ANOVA, repeated measure design) zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Griffstärke im Vergleich der beiden untersuchten Gruppen ($p = 0,364$; Greenhouse-Geisser angepasst).

Zudem konnte keine signifikante Veränderung der Griffstärke beider Gruppen im zeitlichen Verlauf festgestellt werden ($p = 0,061$; Greenhouse-Geisser angepasst). Die Messungen tendieren jedoch eher zu einer Erhöhung der Griffstärke beider Gruppen im Studienverlauf.

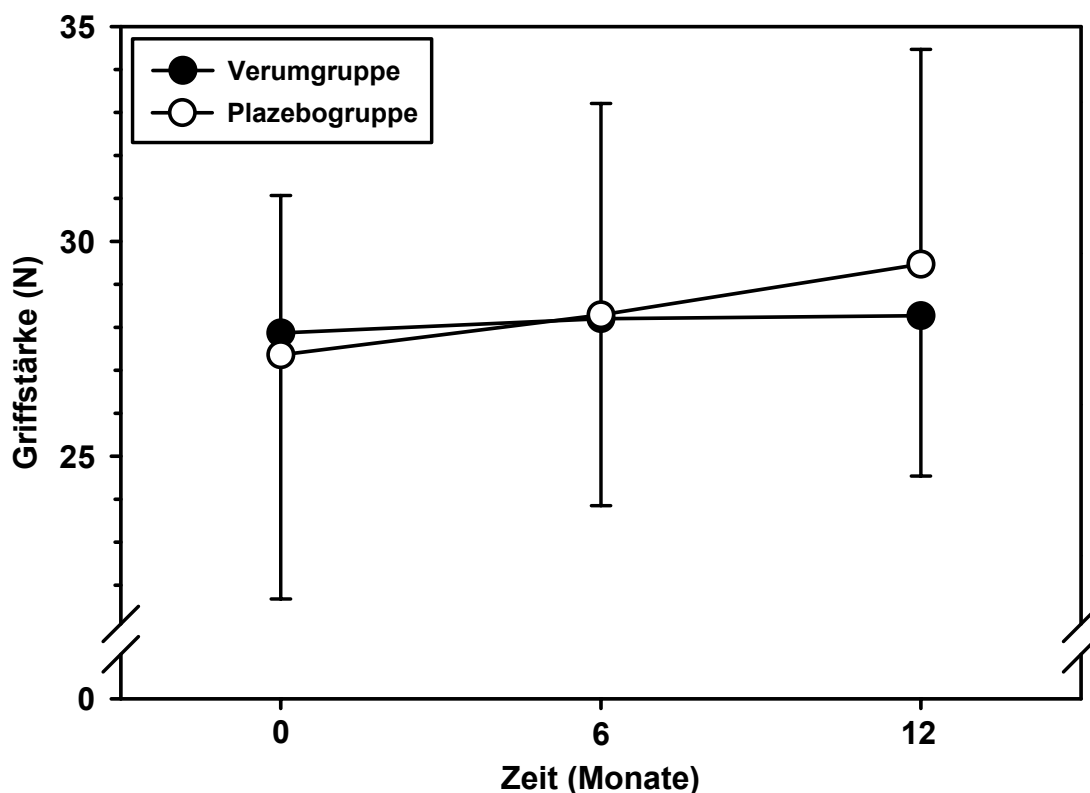


Abbildung 4.4: Griffstärke der beiden untersuchten Gruppen initial, sowie nach sechs und 12 Monaten. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SD. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p = 0,364$; Veränderung im Studienverlauf: $p = 0,061$

4.6 Biomarker des Knochen- und Calciumstoffwechsels

4.6.1 Typ 1 Kollagen C-terminales Crosslink Telopeptid (CTX)

Die CTX-Konzentration (Abbildung 4.5) als Marker der Osteoklastenaktivität, zeigte im statistischen Vergleich (ANOVA repeated measure design) der Kurvenverläufe zwischen den untersuchten Gruppen keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,533$; Greenhouse-Geisser angepasst).

Jedoch konnten statistisch signifikante Veränderungen im zeitlichen Verlauf in der CTX-Konzentration beider Gruppen ($p = 0,008$; Greenhouse-Geisser angepasst) festgestellt werden. Die Nachtestung (gepaarter t-Test mit Bonferroni-Adjustierung) ergab beim Vergleich der einzelnen Messzeitpunkte eine signifikante

Erhöhung der CTX-Konzentration aller Probandinnen zwischen dem basalen Wert und der Messung nach vier Monaten ($p = 0,036$).

Der vom Assay-Hersteller angegebene Normwert für postmenopausale Frauen liegt bei 3634 ± 1833 pmol/L (Mittelwert \pm SD). Die Mittelwerte der Probandinnen beider Gruppen liegen an der oberen Grenzen dieses angegebenen Normbereichs.

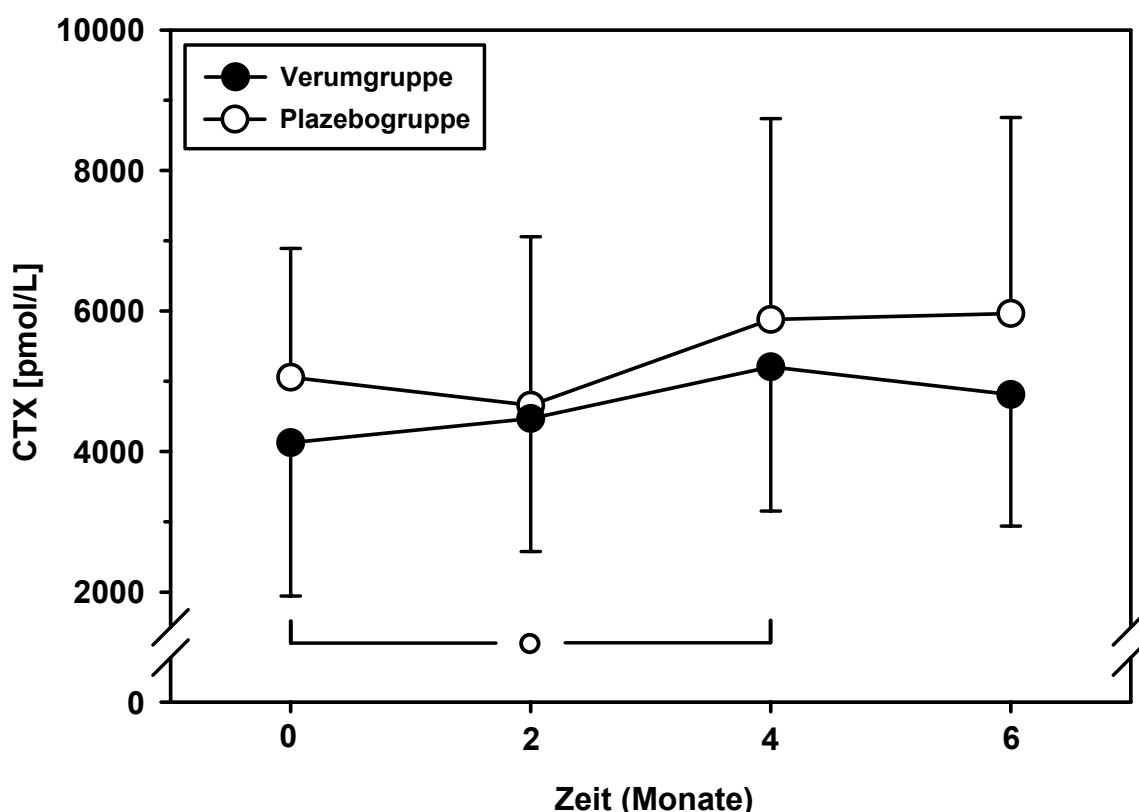


Abbildung 4.5: CTX-Konzentration im Serum der Probandinnen (Verum- und Plazebogruppe) initial, sowie nach zwei, vier und sechs Monaten Intervention. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen $p = 0,533$; Veränderung im Studienverlauf: $p = 0,008$ (Nachtestung: $^{\circ}p = 0,036$)

4.6.2 Carboxyterminales Propeptid des Typ 1 Prokollagen (PICP)

In Abbildung 4.6 ist die Veränderung der osteoblastären Kollagensynthese durch den Formationsmarker PICP in den beiden untersuchten Gruppen dargestellt. Die statistische Auswertung (ANOVA, repeated measure design) zeigte einen signifikanten Unterschied im Vergleich der Verum- mit der Plazebogruppe

($p = 0,026$; Greenhouse-Geisser angepasst). Die Nachtestung mittels ungepaartem t-Test mit Bonferroni-Adjustierung zu den einzelnen Messzeitpunkten wies jedoch keinen signifikanten Unterschied der PICP-Konzentrationen im Vergleich der beiden Gruppen auf. Grund dafür ist die vorgenommene α -Adjustierung nach Bonferroni. Die Wahrscheinlichkeit oder das Risiko fälschlicherweise einen signifikanten Unterschied oder eine signifikante Veränderung anzunehmen steigt mit der Anzahl der Vergleiche. Um die globale Fehlerwahrscheinlichkeit einzuhalten, wird bei der Bonferroni-Adjustierung die Fehlerwahrscheinlichkeit der Einzeltests durch die Anzahl der Vergleiche dividiert:

$$\alpha_{\text{Bonferroni}} = \frac{\alpha_F}{k}$$

$\alpha_{\text{Bonferroni}}$ = Fehlerwahrscheinlichkeit mit Bonferroni Korrektur
 α_F = Fehlerwahrscheinlichkeit der Einzeltests (Testfamilie)
 k = Anzahl der Vergleiche

Die Fehlerwahrscheinlichkeit für den Einzeltest wird dadurch kleiner als ursprünglich und eine Signifikanz ist damit im Einzeltest schwerer nachzuweisen. Gleichwohl ist aber auch das Risiko fälschlicherweise einen signifikanten Unterschied anzunehmen durch die α -Adjustierung nach Bonferroni stark reduziert.

Im zeitlichen Verlauf ergab die ANOVA (repeated measure design) keine signifikanten Veränderungen ($p = 0,263$; Greenhouse-Geisser angepasst) der PICP-Konzentration beider untersuchter Gruppen.

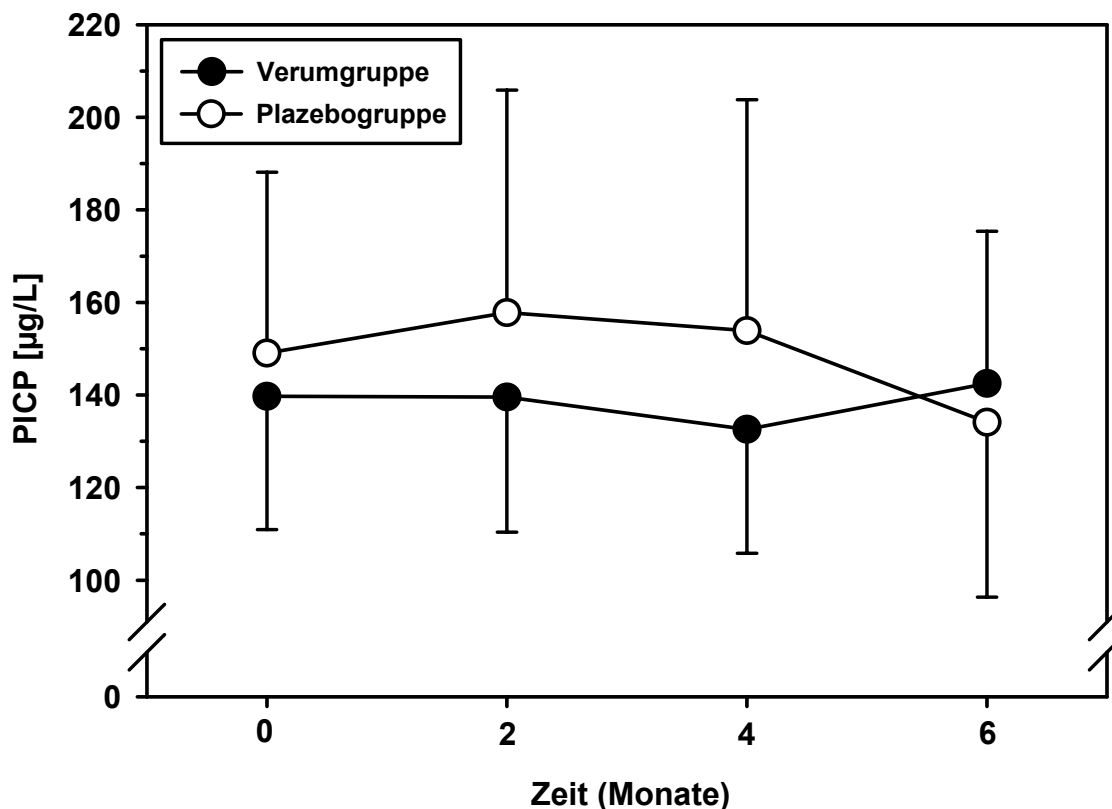


Abbildung 4.6: Die PICP-Konzentration im Serum der Probandinnen (Verumgruppe und Plazebogruppe) initial, sowie nach zwei, vier und sechs Monaten Intervention. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p = 0,026$ (Nachtestung ohne Signifikanz); Veränderung im Studienverlauf: $p = 0,263$

Vom Assay-Hersteller wurden keine Normbereiche der PICP-Konzentration im Serum postmenopausaler Frauen angegeben. De Leo et al. (2000) untersuchte 202 postmenopausale Frauen im Alter von 55 ± 4 Jahren mit dem auch von uns verwendeten PICP-Assay und fand Messwerte zwischen 103 und 172 $\mu\text{g/L}$. Die im vorliegenden Experiment gemessenen Konzentrationen sind vergleichbar mit diesen Angaben.

4.6.3 Knochenspezifische alkalische Phosphatase (bAP)

Die bAP-Konzentration, als Maß für die osteoblastäre Aktivität, ist in Abbildung 4.7 dargestellt. Im statistischen Vergleich (ANOVA, repeated measure design) der Verum- mit der Plazebogruppe weisen die Kurven keine signifikanten Unterschiede im Studienverlauf auf ($p = 0,187$; Greenhouse-Geisser angepasst).

Jedoch zeigt die ANOVA eine signifikante Veränderung des zeitlichen Verlaufs der bAP-Konzentration aller Probandinnen an ($p = 0,002$; Greenhouse-Geisser angepasst). Die Nachtestung wies dabei eine signifikante Erhöhung der bAP-Konzentration zwischen dem Anfangswert und der Messung nach sechs Monaten auf ($p = 0,017$).

Der Assay-Hersteller gibt als Normbereich für postmenopausale Frauen einen Mittelwert von $13,2 \pm 4,7 \mu\text{g/L}$ an. Die in dieser Studie gemessenen Werte von Frauen in der frühen Postmenopause liegen im oberen Bereich und höher.

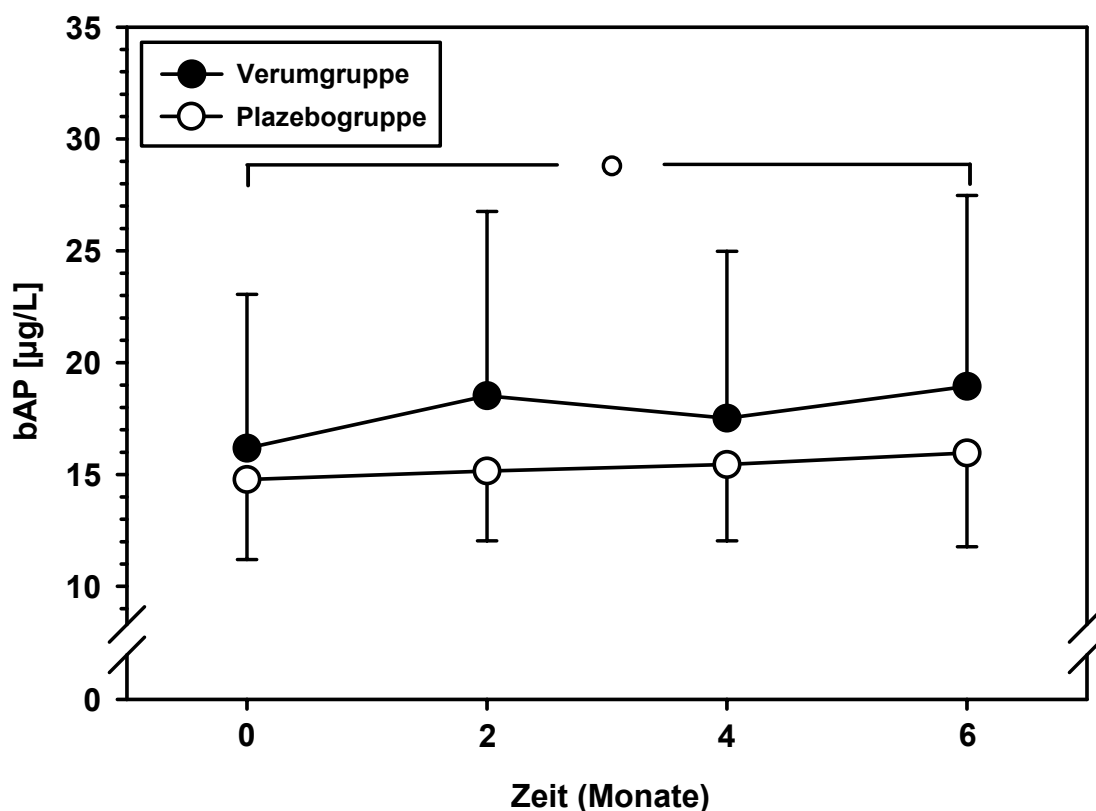


Abbildung 4.7: Dargestellt sind die bAP-Konzentrationen im Serum der beiden untersuchten Gruppen als Mittelwerte \pm SD initial, sowie nach zwei, vier und sechs Monaten Intervention. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p = 0,187$; Veränderung im Studienverlauf: $p = 0,002$ (Nachtestung: $p = 0,017$)

4.6.4 Intaktes Osteocalcin

Abbildung 4.8 zeigt die Konzentration des Intakten Osteocalcins, einem Marker der Matrix Mineralisation, im zeitlichen Verlauf beider untersuchter Gruppen. Die

ANOVA (repeated measure design) zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Gruppen ($p = 0,369$; Greenhouse-Geisser angepasst). Auch die statistische Auswertung der zeitlichen Veränderungen zeigte keine Signifikanz ($p = 0,358$; Greenhouse-Geisser angepasst).

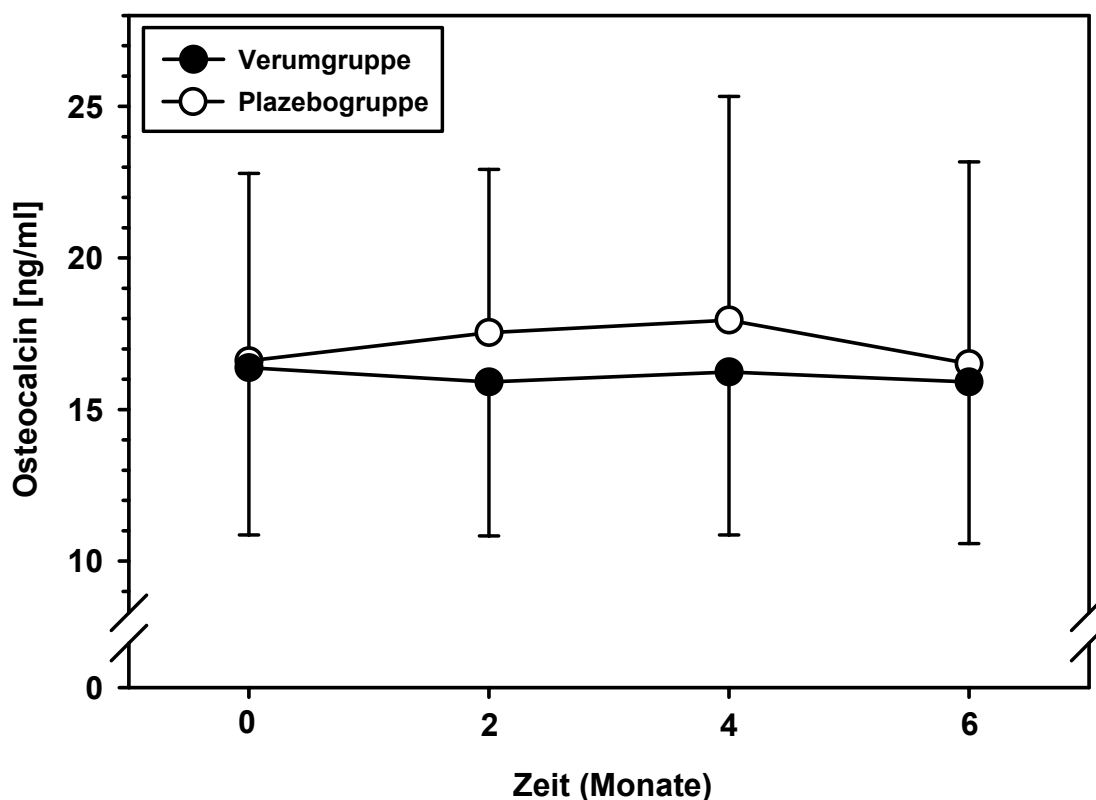


Abbildung 4.8: Osteocalcin-Konzentrationen im Serum der Verum- und der Plazebogruppe initial, sowie nach zwei, vier und sechs Monaten Intervention. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p = 0,369$; Veränderung im Studienverlauf: $p = 0,358$

Vom Assay-Hersteller sind keine Normbereiche für postmenopausale Frauen angegeben. Gernerio et al. (1994) ermittelte bei postmenopausalen Frauen mit dem auch in dieser Studie verwendeten Assay Konzentrationen von $15,4 \pm 4,8$ ng/ml. Diese Angaben sind mit den in der vorliegenden Studie gemessenen Werten vergleichbar.

4.6.5 Parathormon (PTH)

PTH (Abbildung 4.9), als Regulator der Calciumhomöostase, wies keine signifikanten Unterschiede zwischen der Verum- und der Plazebogruppe im statistischen

Vergleich auf ($p = 0,247$; ANOVA, repeated measure design; Greenhouse-Geisser angepasst).

Die ANOVA zeigte jedoch eine statistisch signifikante Veränderung der PTH-Konzentration im zeitlichen Verlauf beider Gruppen an ($p = 0,009$; Greenhouse-Geisser angepasst). Die Nachtestung mit gepaartem t-Test (Bonferroni-adjustiert) konnte jedoch keine signifikante Veränderung zwischen bestimmten Messzeitpunkten feststellen (siehe 4.6.2).

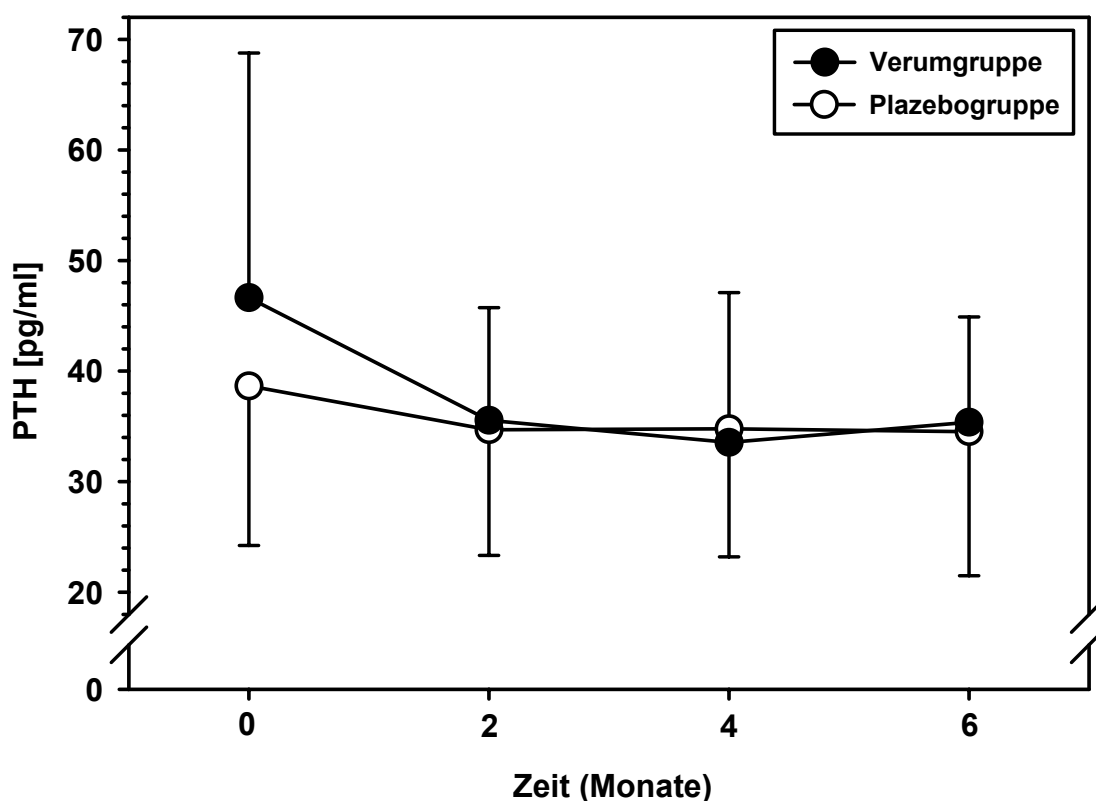


Abbildung 4.9: Dargestellt ist die PTH-Konzentration als Mittelwerte \pm SD der Verum- und der Plazebogruppe im zeitlichen Verlauf. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p = 0,247$; Veränderung im Studienverlauf: $p = 0,009$ (Nachtestung ohne Signifikanz)

Der Assay-Hersteller gibt keine Normbereich für postmenopausale Frauen an. Der Normbereich für gesunde Erwachsene wird mit Werten zwischen 10 und 65 pg/ml (geometrischer Mittelwert \pm 2 SD) angegeben. Cantatore et al. (1999) geben eine Konzentration von $33,4 \pm 6,5$ pg/ml für postmenopausale Frauen an. Diese Messwerte stimmen mit den hier ermittelten Werten überein.

4.7 Insulin-like growth factor 1 (IGF 1)

In Abbildung 4.10 sind die IGF 1-Konzentrationen der beiden untersuchten Gruppen im Zeitverlauf dargestellt. IGF 1, als Mediator des Somatotropins, blieb in beiden Gruppen über die Zeit unverändert. Die ANOVA (repeated measure design) zeigte weder einen signifikanten Unterschied in den Kurvenverläufen der beiden untersuchten Gruppen ($p = 0,889$; Greenhouse-Geisser angepasst) noch signifikante zeitliche Veränderungen der IGF 1-Konzentration aller Probandinnen ($p = 0,316$; Greenhouse-Geisser angepasst).

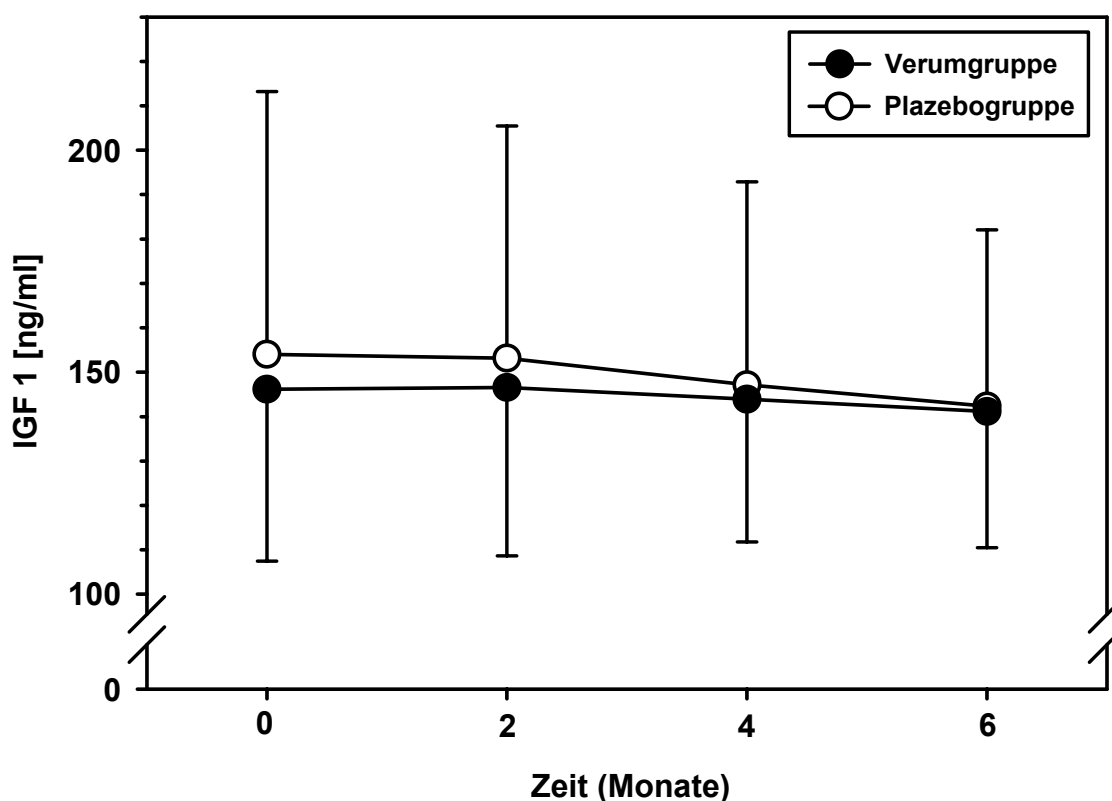


Abbildung 4.10: Die IGF 1-Konzentration im Serum initial, sowie nach zwei, vier und sechs Monaten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Verum- und der Plazebogruppe. Die statistische Auswertung (ANOVA) ergab weder signifikante Veränderungen zwischen den Gruppen ($p = 0,889$) noch im Studienverlauf ($p = 0,316$)

Für postmenopausale Frauen wurde vom Assay-Hersteller ein Messbereich von 48 ng/ml bis 255 ng/ml (Geometrischer Mittelwert \pm 2 SD) beobachtet. Die IGF 1-Konzentrationen in der vorliegenden Studie liegen innerhalb dieses Messbereichs.

4.8 Transformiertes Calcium

Das Transformierte Calcium (ohne Abbildung) als Maß der Calciumhomöostase im Blut zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen ($p = 0,56$; ANOVA, repeated measure design, Greenhouse-Geisser angepasst). Die Konzentration des transformierten Calciums blieb in den beiden untersuchten Gruppen auch im Zeitverlauf konstant ($p = 0,338$; Greenhouse-Geisser angepasst). Die durchschnittliche Konzentration lag bei $2,34 \pm 0,07$ mmol/L in der Verumgruppe und bei $2,36 \pm 0,06$ mmol/L in der Plazebogruppe.

4.9 Messung der Knochendichte, -masse und -geometrie

4.9.1 Messung der Knochendichte

4.9.1.1 Trabekuläre Knochendichte (BMD_{trab}) des Radius

In Abbildung 4.11 ist die BMD_{trab} am 4 % Messort des Radius der beiden untersuchten Gruppen dargestellt. Die statistische Auswertung (ANOVA, repeated measure design) zeigte keine signifikanten Unterschiede in der trabekulären Knochendichte des Radius ($p = 0,536$; Greenhouse-Geisser angepasst) im Vergleich beider Gruppen.

Auch die statistische Testung von zeitlichen Veränderungen der BMD_{trab} des Radius im gesamten Studienkollektiv zeigte keine Signifikanz ($p = 0,113$; Greenhouse-Geisser angepasst).

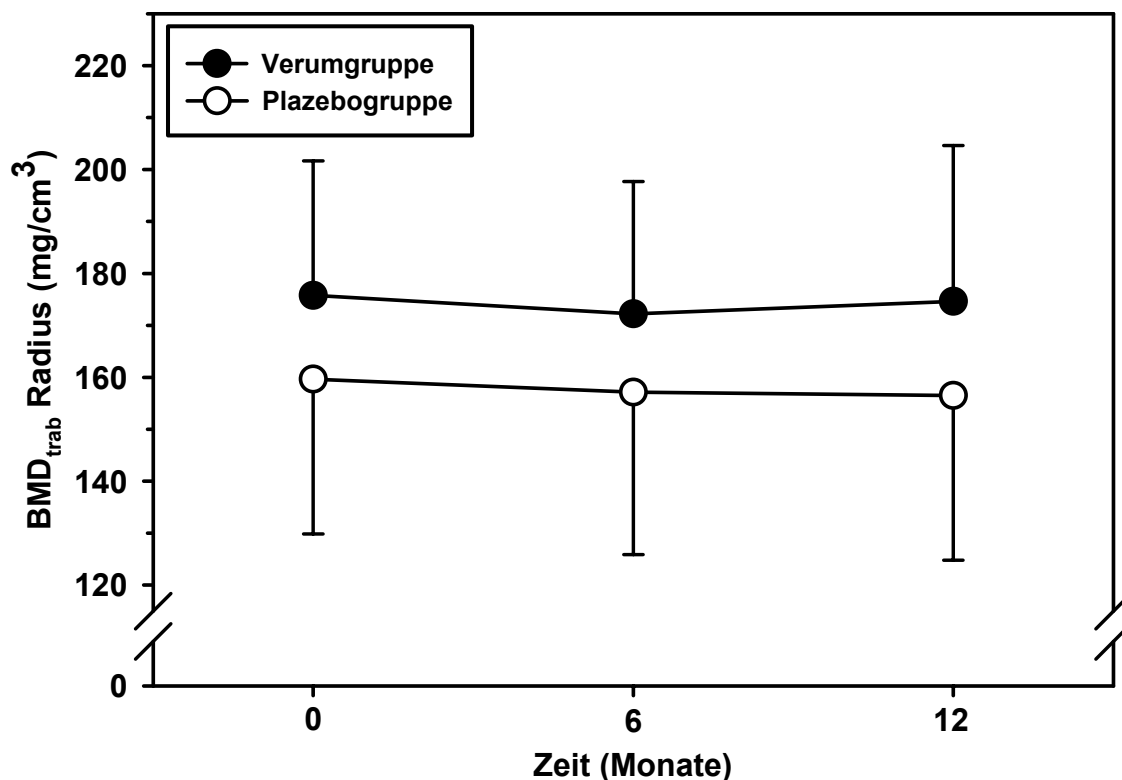


Abbildung 4.11: Trabekuläre Knochendichte (BMD_{trab}) des Radius am 4 % Messort der Verum- und der Placebogruppe initial, sowie nach Ende der Supplementation und nach insgesamt einem Jahr. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p = 0,536$; Veränderung im Studienverlauf: $p = 0,113$

4.9.1.2 Trabekuläre Knochendichte (BMD_{trab}) der Tibia

Abbildung 4.12 zeigt die BMD_{trab} am 4 % Messort der Tibia der beiden untersuchten Gruppen. Hier wies die statistische Auswertung (ANOVA, repeated measure design) keine signifikanten Unterschiede im Vergleich beider Gruppen auf ($p = 0,501$; Greenhouse-Geisser angepasst).

Zudem konnte keine signifikante Veränderung der BMD_{trab} der Tibia beider Gruppen im Studienverlauf ermittelt werden ($p = 0,336$; Greenhouse-Geisser angepasst).

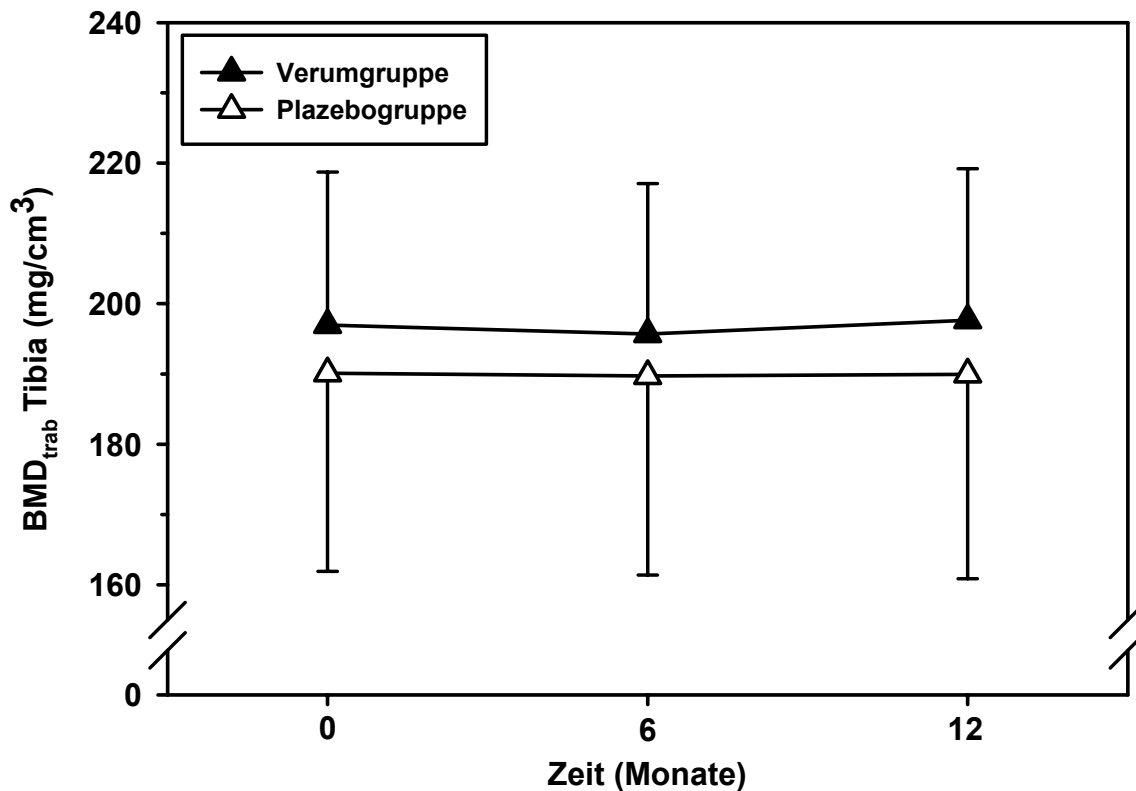


Abbildung 4.12: Trabekuläre Knochendichte (BMD_{trab}) der Tibia am 4 % Messort der beiden untersuchten Gruppen im Zeitverlauf. Gemessen wurde initial, sowie nach sechs und 12 Monaten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p = 0,501$; Veränderung im Studienverlauf: $p = 0,336$

4.9.1.3 Kortikale Knochendichte (BMD_{kort}) des Radius

Die BMD_{kort} des Radius (65 % Messort) der Verum- und der Plazebogruppe ist in Abbildung 4.13 gezeigt. Die ANOVA (repeated measure design) wies hier weder signifikante Unterschiede im Vergleich der beiden Gruppen ($p = 0,394$; Greenhouse-Geisser angepasst) noch im zeitlichen Verlauf der Studie auf ($p = 0,319$; Greenhouse-Geisser angepasst).

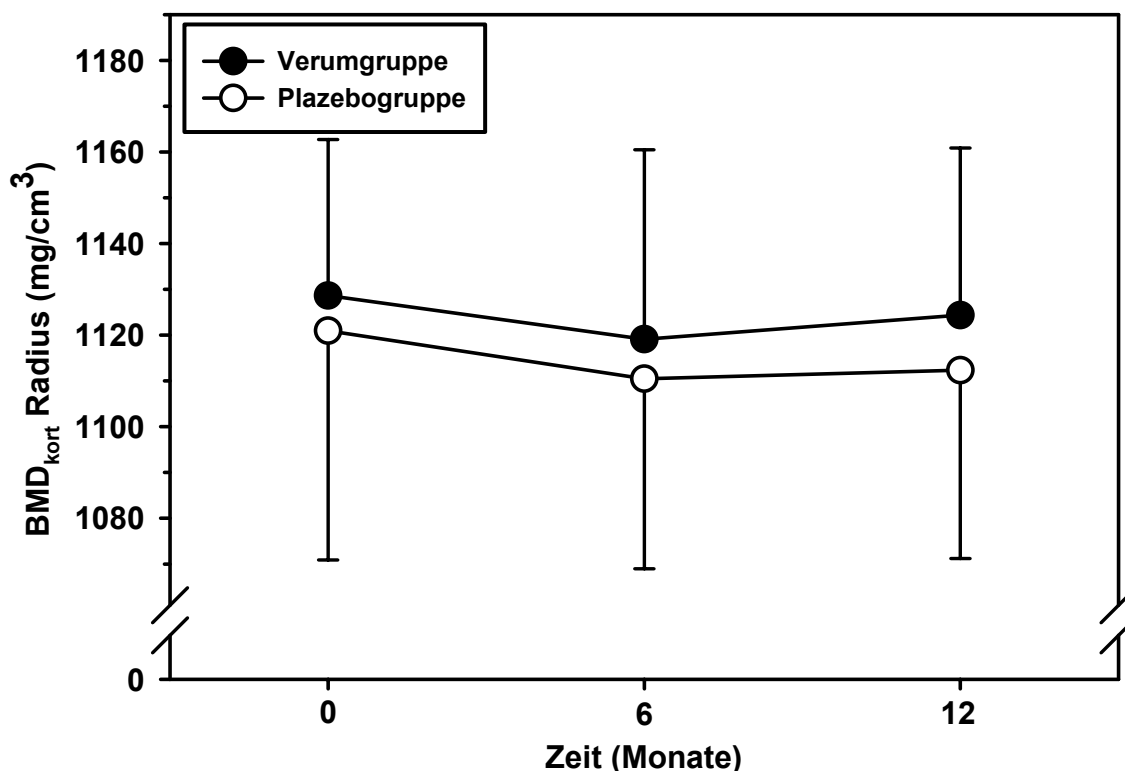


Abbildung 4.13: Dargestellt ist die kortikale Knochendichte (BMD_{kort}) am 65 % Messort des Radius als Mittelwerte \pm SD initial, sowie nach sechs und 12 Monaten der beiden untersuchten Gruppen. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p = 0,394$; Veränderung im Studienverlauf: $p = 0,319$

4.9.1.4 Kortikale Knochendichte (BMD_{kort}) der Tibia

Abbildung 4.14 zeigt die BMD_{kort} der Tibia (38 % Messort) der beiden untersuchten Gruppen. Bei der statistischen Auswertung (ANOVA, repeated measure design) wurden keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Gruppen ermittelt ($p = 0,692$; Greenhouse-Geisser angepasst).

Jedoch zeigte sich hier eine statistisch hochsignifikante Veränderung der BMD_{kort} der Tibia aller Probandinnen im zeitlichen Verlauf ($p < 0,001$; Greenhouse-Geisser angepasst). Die Nachtestung mittels gepaartem t-Test (Bonferroni-adjustiert) zwischen der initialen Messung und der Messung nach sechs Monaten wies dabei eine signifikante Abnahme auf ($p = 0,012$). Zudem konnte eine signifikante Abnahme ($p = 0,001$) zwischen der initialen Messung und der Messung nach 12 Monaten festgestellt werden.

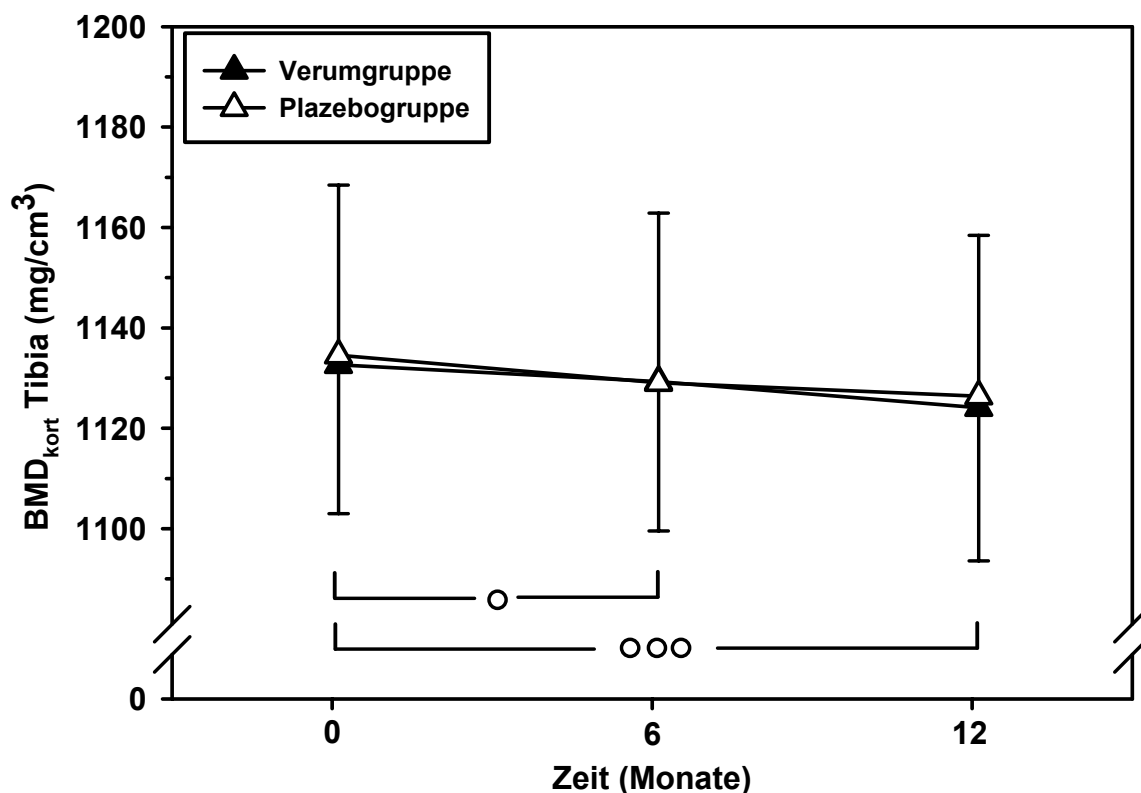


Abbildung 4.14: Kortikale Knochendichte (BMD_{kort}) am 38 % Messort der Tibia der beiden untersuchten Gruppen dargestellt als Mittelwerte \pm SD initial, sowie nach sechs und 12 Monaten. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p = 0,692$; Veränderung im Studienverlauf: $p < 0,001$ (Nachtestung: $^{\circ}p = 0,012$; $^{ooo}p = 0,001$)

4.9.2 Messung der Knochenmasse

4.9.2.1 Trabekuläre Knochenmasse (BMC_{trab}) des Radius

Abbildung 4.15 zeigt die BMC_{trab} des Radius am 4 % Messort. Die statistische Auswertung mittels ANOVA (repeated measure design) wies keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen innerhalb eines Jahres auf ($p = 0,426$; Greenhouse-Geisser angepasst).

Die ANOVA zeigte jedoch eine statistisch signifikante Veränderung im zeitlichen Verlauf der BMC_{trab} des Radius ($p < 0,001$; Greenhouse-Geisser angepasst). Die Nachtestung (gepaarter t-Test mit Bonferroni-Adjustierung) zeigte dabei eine Abnahme der BMC_{trab} des Radius der beiden untersuchten Gruppen zwischen der

initialen Messung und der Messung nach sechs Monaten ($p = 0,009$) und zwischen der initialen Messung und der Messung nach 12 Monaten ($p = 0,005$).

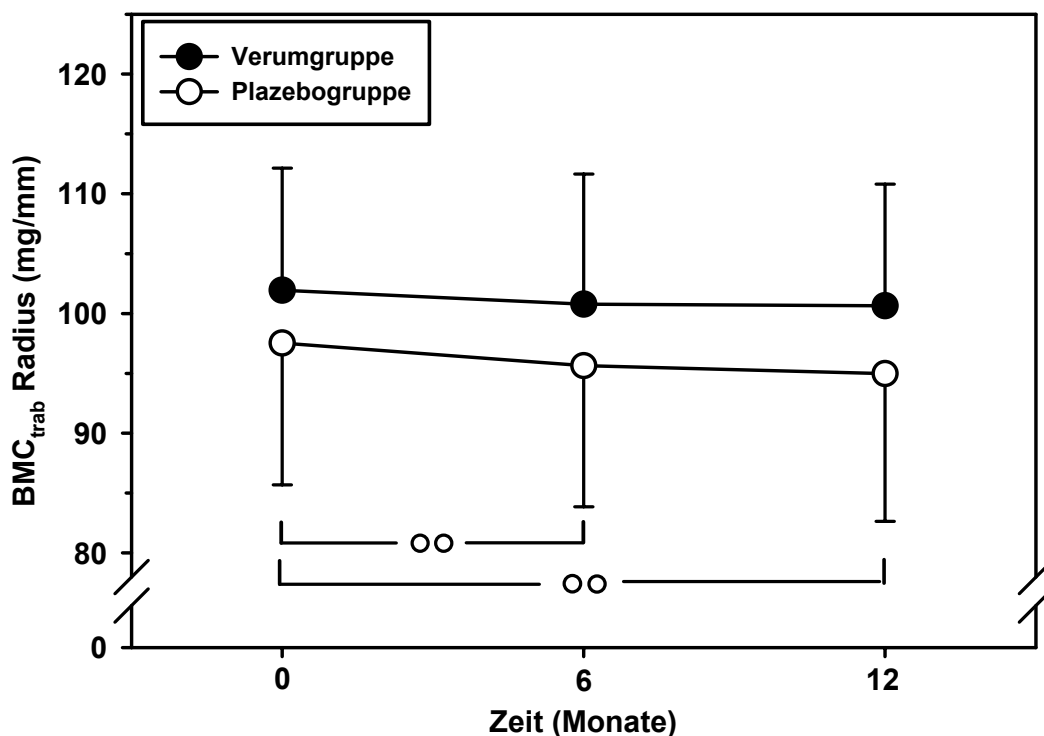


Abbildung 4.15: Knochenmasse im trabekulären Bereich (BMC_{trab}) am 4 % Messort des Radius der Verum- und der Placebogruppe im Zeitverlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p = 0,426$; Veränderung im Studienverlauf: $p < 0,001$ (Nachtestung: $^{\circ\circ}p < 0,01$)

4.9.2.2 Trabekuläre Knochenmasse (BMC_{trab}) der Tibia

Abbildung 4.16 zeigt die BMC_{trab} der Tibia am 4 % Messort. Die statistische Auswertung mittels ANOVA (repeated measure design) zeigte keine signifikanten Veränderungen im Vergleich der beiden Gruppen innerhalb eines Jahres ($p = 0,370$; Greenhouse-Geisser angepasst).

Die statistischen Testung von Veränderungen im zeitlichen Verlauf ermittelte keine signifikanten Veränderungen der BMC_{trab} der Tibia des gesamten Studienkollektivs ($p = 0,279$; Greenhouse-Geisser angepasst).

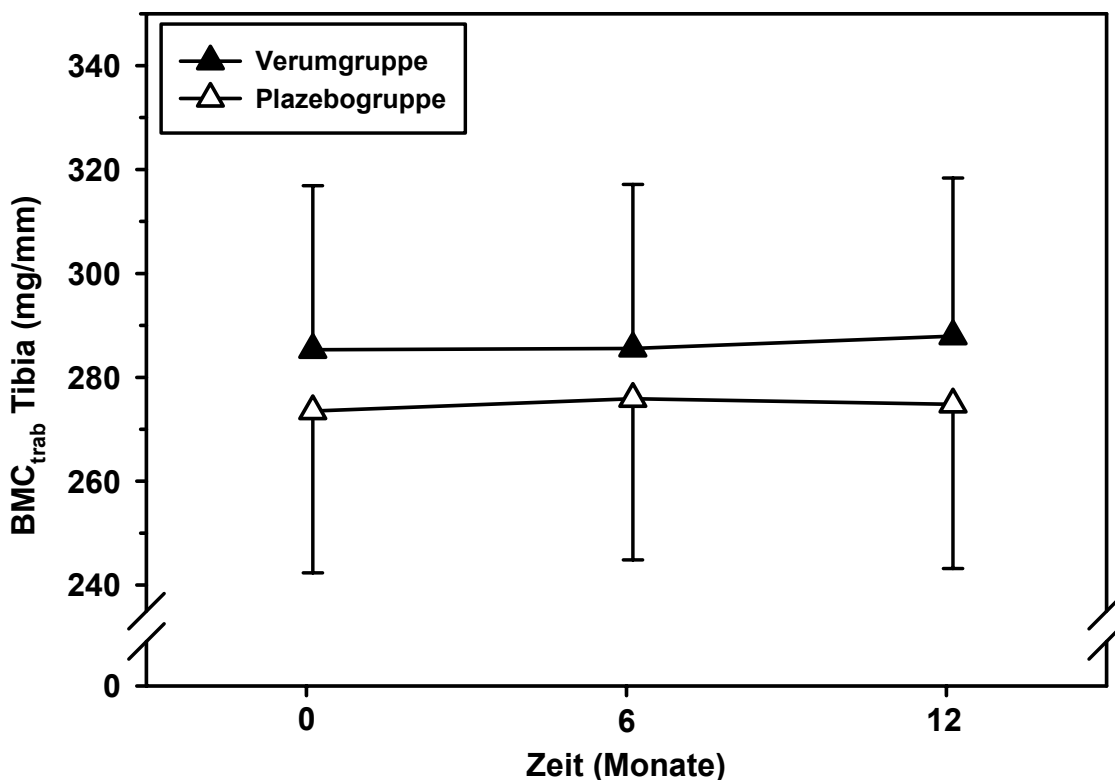


Abbildung 4.16: Knochenmasse im trabekulären Bereich (BMC_{trab}) gemessen am 4 % Messort der Tibia der Verum- und der Placebogruppe initial, sowie nach sechs und 12 Monaten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p = 0,370$; Veränderung im Studienverlauf: $p = 0,279$

4.9.2.3 Kortikale Knochenmasse (BMC_{kort}) des Radius

Die BMC_{kort} des Radius am 65 % Messort ist in Abbildung 4.17 abgebildet. Die ANOVA (repeated measure design) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen im Zeitverlauf ($p = 0,508$; Greenhouse-Geisser angepasst). Es konnten jedoch signifikante Veränderungen der BMC_{kort} des Radius im Zeitverlauf der beiden Gruppen erfasst werden ($p = 0,003$; Greenhouse-Geisser angepasst). Dabei zeigte die Nachtestung (gepaarter t-Test mit Bonferroni-Adjustierung) eine signifikante Abnahme BMC_{kort} des Radius aller Probandinnen zwischen der initialen Messung und der Messung nach sechs Monaten ($p = 0,002$) sowie zwischen der initialen Messung und der Messung nach 12 Monaten ($p = 0,023$).

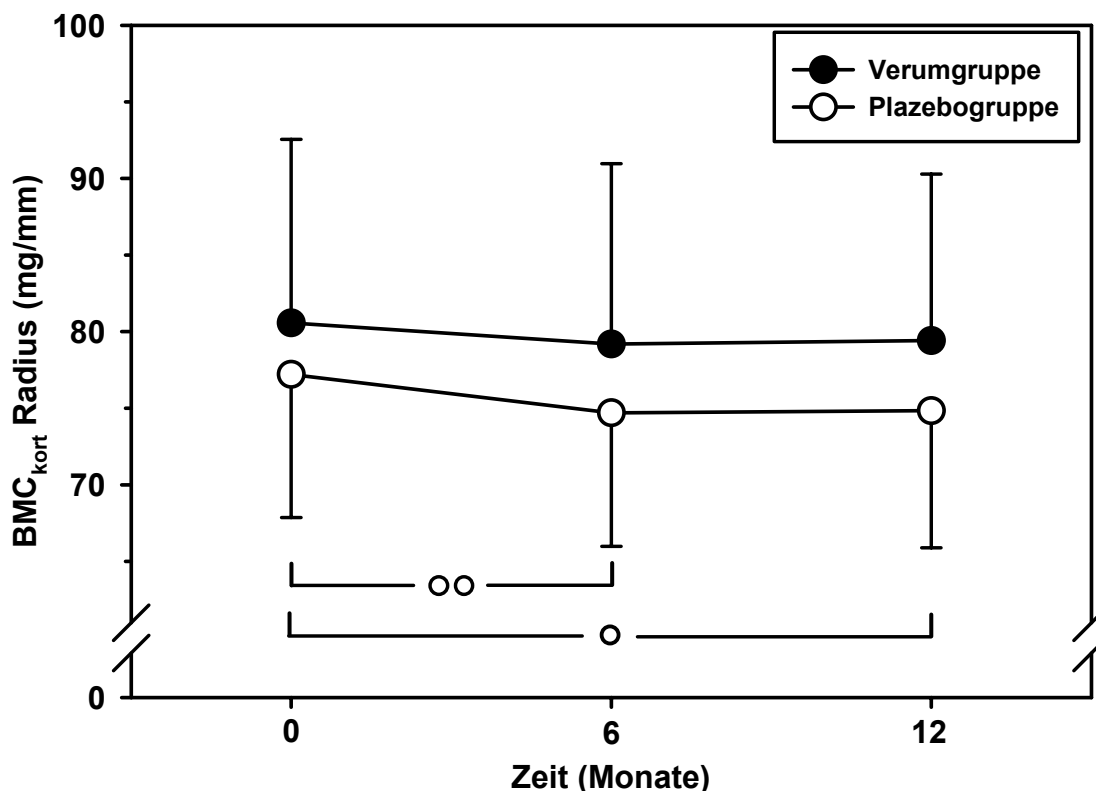


Abbildung 4.17: Kortikale Knochenmasse (BMC_{kort}) des Radius (65 % Messort) der beiden untersuchten Gruppen initial, sowie nach sechs und 12 Monaten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p = 0,508$; Veränderung im Studienverlauf: $p = 0,003$ (Nachtestung: $^{\circ\circ}p = 0,002$; $^{\circ}p = 0,023$)

4.9.2.4 Kortikale Knochenmasse (BMC_{kort}) der Tibia

In Abbildung 4.18 ist die BMC_{kort} der Tibia der Verum- und der Plazebogruppe im Studienverlauf dargestellt. Mittels ANOVA (repeated measure design) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen im Zeitverlauf ($p = 0,752$; Greenhouse-Geisser angepasst) ermittelt werden.

Jedoch konnte hier eine statistisch signifikante zeitliche Veränderung der BMC_{kort} der Tibia des gesamten Studienkollektivs festgestellt werden ($p = 0,011$; Greenhouse-Geisser angepasst). Der t-Test (Bonferroni-adjustiert) ergab dabei eine signifikante Abnahme ($p = 0,019$) der BMC_{kort} der Tibia über die Beobachtungsdauer von einem Jahr.

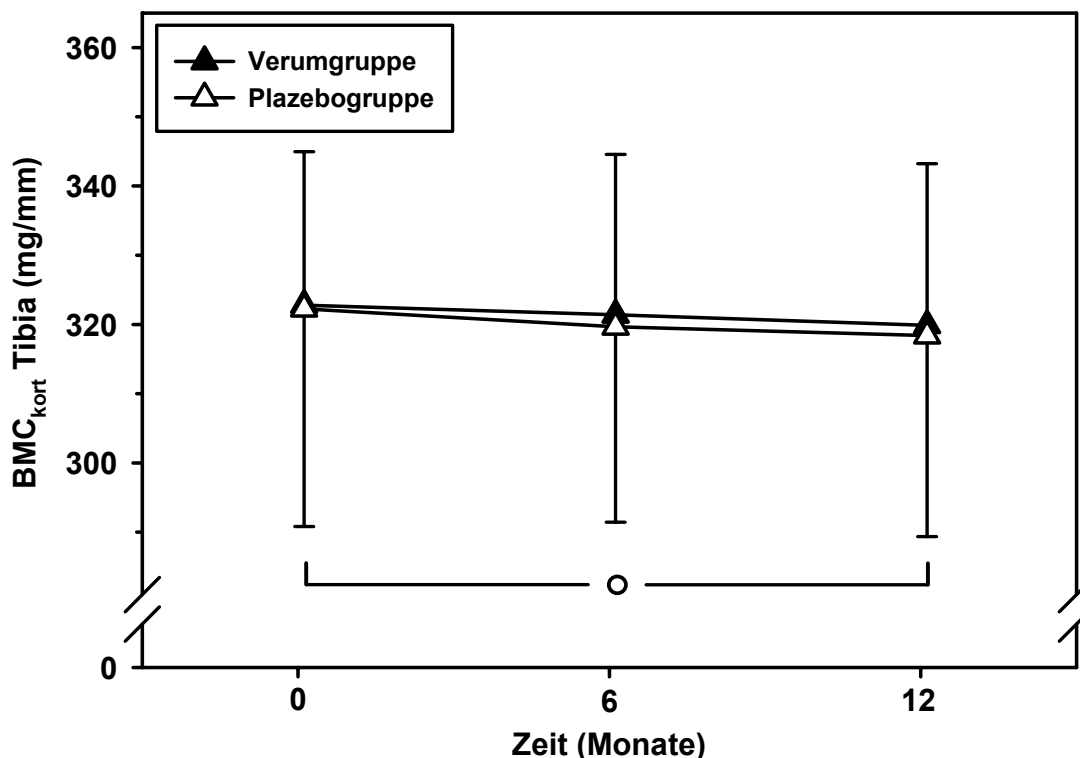


Abbildung 4.18: Kortikale Knochenmasse (BMC_{kort}) der Tibia (38 % Messort) der beiden untersuchten Gruppen initial, sowie nach sechs und 12 Monaten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p = 0,752$; Veränderung im Studienverlauf: $p = 0,011$ (Nachtestung: $^{\circ}p = 0,019$)

4.9.3 Messung der Knochengeometrie

4.9.3.1 Gesamte Knochenquerschnittsfläche (CSA_{tot}) von Radius und Tibia

Tabelle 4.5 zeigt die CSA_{tot} von Radius und Tibia der Verum- und der Placebogruppen. Der statistische Vergleich mittels ANOVA (repeated measure design) zeigte keine signifikanten Unterschiede der CSA_{tot} gemessen am Radius zwischen den beiden Gruppen im Zeitverlauf ($p = 0,862$; Greenhouse-Geisser angepasst). Ebenso zeigt die statistische Untersuchung hier keine signifikanten Veränderungen im zeitlichen Verlauf der beiden Gruppen ($p = 0,536$ Greenhouse-Geisser angepasst).

Auch bei der CSA_{tot} der Tibia konnte weder ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Verum- und der Placebogruppe ($p = 0,532$;

Greenhouse-Geisser angepasst) noch eine Veränderung im Studienverlauf ($p = 0,255$; Greenhouse-Geisser angepasst) ermittelt werden.

Tabelle 4.5: Gesamte Knochenquerschnittsfläche (CSA_{tot}) der beiden untersuchten Gruppen gemessen im kortikalen Knochenbereich des Radius und der Tibia initial, sowie nach sechs und 12 Monaten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD.

Zeit in Monaten	CSA_{tot} (mm^2) des Radius		p	CSA_{tot} (mm^2) der Tibia		p
	Verumgruppe	Plazebogruppe		Verumgruppe	Plazebogruppe	
0	115,2 \pm 19,4	110,7 \pm 19,4	ns	391,0 \pm 39,7	381,2 \pm 28,8	ns
6	114,0 \pm 18,6	109,5 \pm 19,5		389,7 \pm 40,6	374,6 \pm 42,3	
12	112,2 \pm 17,5	109,1 \pm 16,2		392,0 \pm 43,3	381,6 \pm 27,6	

p = Unterschied zwischen den Gruppen

ns = nicht signifikant

4.9.3.2 Kortikale Knochenquerschnittsfläche (CA) des Radius

Die CA des Radius gemessen initial, sowie nach sechs und 12 Monaten ist in Abbildung 4.19 dargestellt. Die CA des Radius zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p = 0,308$; ANOVA, repeated measure design; Greenhouse-Geisser angepasst) im Zeitverlauf zwischen den beiden untersuchten Gruppen.

Eine statistisch signifikante zeitliche Veränderung der CA des Radius im Studienverlauf konnte ebenfalls nicht ermittelt werden ($p = 0,116$; ANOVA, repeated measure design; Greenhouse-Geisser angepasst).

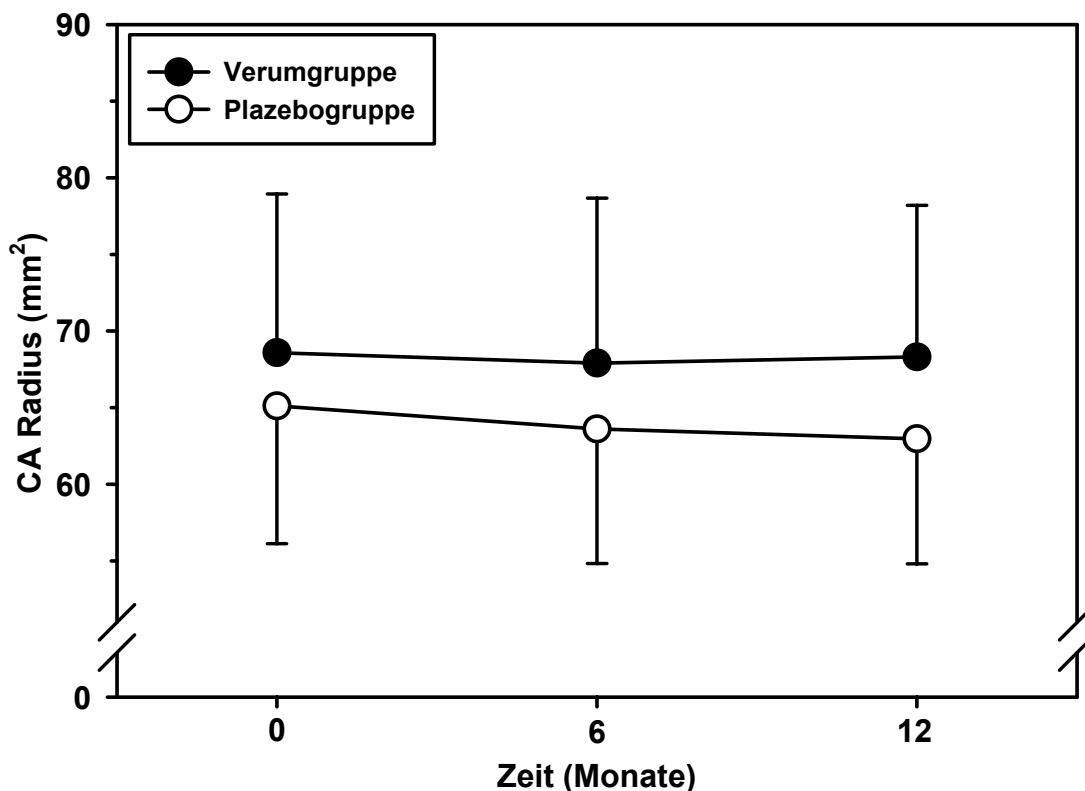


Abbildung 4.19: Kortikale Knochenquerschnittsfläche (CA) des Radius (Mittelwerte \pm SD) der Verum- und Plazebogruppe initial, sowie nach sechs und 12 Monaten. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p = 0,308$; Veränderung im Studienverlauf: $p = 0,116$

4.9.3.3 Kortikale Knochenquerschnittsfläche (CA) der Tibia

Die Messung der CA der Tibia (Abbildung 4.20) wies keine signifikanten Unterschiede (ANOVA, repeated measure design) zwischen der Verum- und der Plazebogruppe auf ($p = 0,586$; Greenhouse-Geisser angepasst). Auch konnten keine Veränderungen der CA der Tibia im Verlauf der Studie ermittelt werden ($p = 0,066$; Greenhouse-Geisser angepasst).

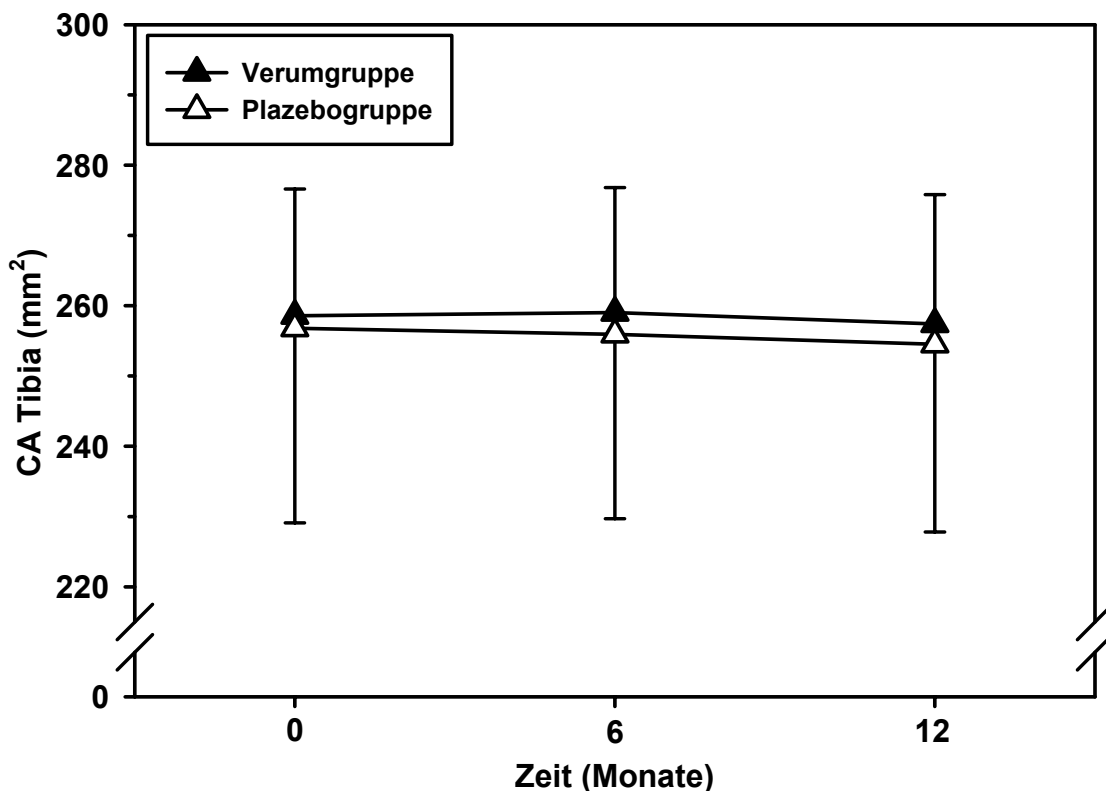


Abbildung 4.20: Kortikale Knochenquerschnittsfläche (CA) der Tibia der beiden untersuchten Gruppen als Mittelwerte \pm SD. Gemessen wurde initial, sowie nach sechs und 12 Monaten. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p = 0,586$; Veränderung im Studienverlauf: $p = 0,066$

4.9.3.4 Kortikalisdicke des Radius

Abbildung 4.21 zeigt die Messergebnisse der Kortikalisdicke des Radius der Verum- und der Plazebogruppe im Zeitverlauf. Die statistische Auswertung (ANOVA, repeated measure design) der Messungen der Kortikalisdicke am Radius zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p = 0,034$; Greenhouse-Geisser angepasst). Bei der Nachtestung (ungepaarter t-Test mit Bonferroni-Adjustierung) ließ sich eine signifikante höhere Kortikalisdicke des Radius in der Verumgruppe im Vergleich zur Plazebogruppe zum Messzeitpunkt nach 12 Monaten feststellen ($p = 0,024$).

Die ANOVA (repeated measure design) zeigte jedoch keine statistisch signifikante Veränderung des zeitlichen Verlaufs der Kortikalisdicke des Radius des gesamten Studienkollektivs ($p = 0,822$; Greenhouse-Geisser angepasst).

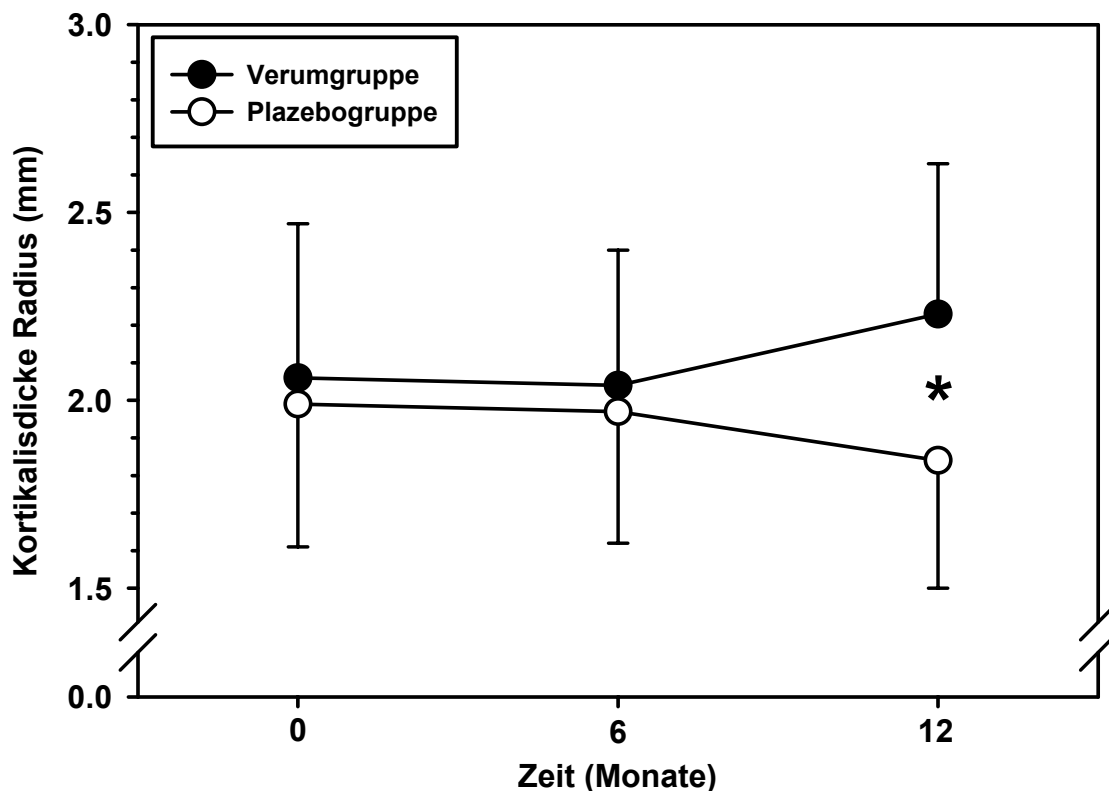


Abbildung 4.21: Kortikalisdicke des Radius der Verum- und der Placebogruppe zu Beginn der Studie sowie nach sechs und 12 Monaten dargestellt als Mittelwerte \pm SD. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p = 0,034$ zwischen den Gruppen (Nachtestung: $*p = 0,024$ zwischen der Messung nach sechs und nach 12 Monaten); Veränderung im Studienverlauf: $p = 0,822$

4.9.3.5 Kortikalisdicke der Tibia

In Abbildung 4.22 ist die Kortikalisdicke der Tibia beider untersuchter Gruppen im Zeitverlauf dargestellt. Die Messungen zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen (ANOVA, repeated measure design) im Vergleich der beiden Gruppen ($p = 0,807$; Greenhouse-Geisser angepasst).

Jedoch zeigt sich hier eine signifikante Veränderung der Kortikalisdicke der Tibia im Studienverlauf des gesamten Probandenkollektivs ($p = 0,003$; Greenhouse-Geisser angepasst). Die Nachtestung (gepaarter t-Test mit Bonferroni-Adjustierung) wies dabei eine signifikante Abnahme der Kortikalisdicke der Tibia zwischen der initialen Messung und der Messung nach 12 Monaten ($p = 0,013$)

sowie zwischen der Messung nach sechs Monaten und der Messung nach 12 Monaten ($p = 0,034$) nach.

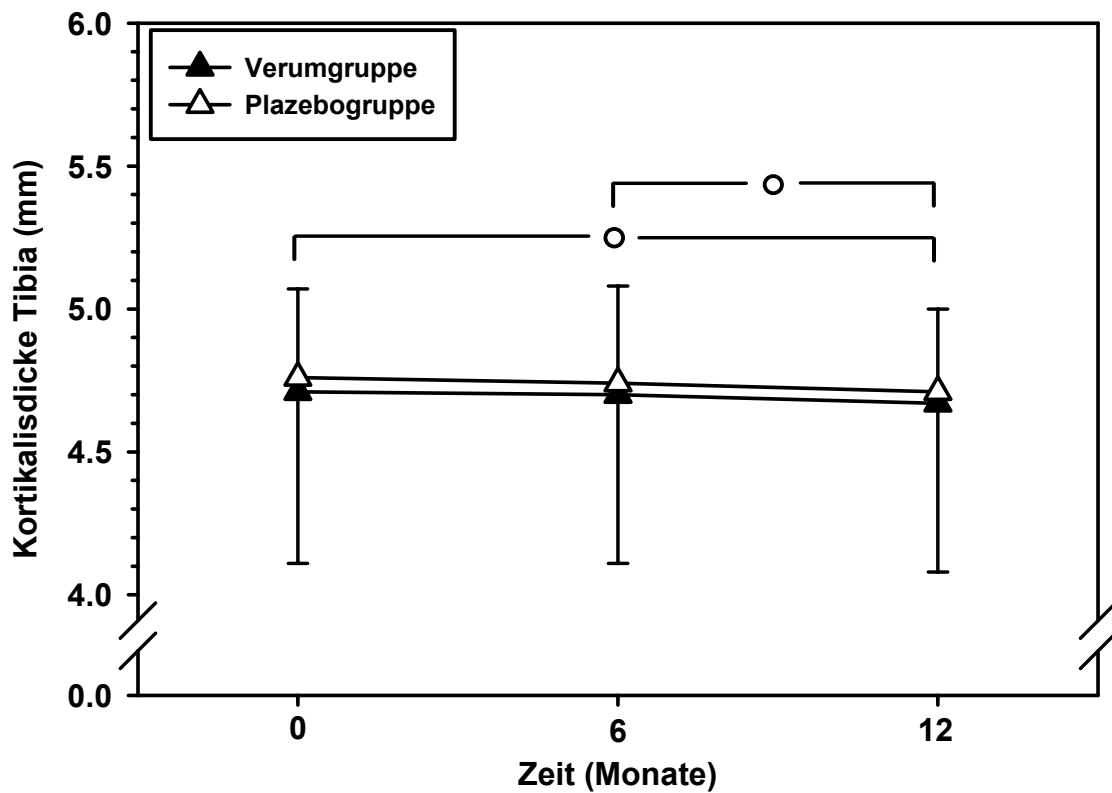


Abbildung 4.22: Die Kortikalisdicke der Tibia beider untersuchter Gruppen dargestellt als Mittelwerte \pm SD initial, sowie nach sechs und 12 Monaten. ANOVA: Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p = 0,807$; Veränderung im Studienverlauf: $p = 0,003$ (Nachtestung: $^{\circ}p < 0,05$)

5 Diskussion

In dem vorliegenden Experiment wurde erstmals die Auswirkung einer sechsmonatigen oralen Supplementation der physiologischen Stickstoffmonoxid-Vorläufersubstanz L-Arginin in Form von L-Argininhydrochlorid auf den Knochenstoffwechsel gesunder postmenopausaler Frauen in einer Plazebo-kontrollierten Studie untersucht. Dabei zeigten die Biomarker des Knochenstoffwechsels als Maß für die kurzzeitigen Veränderungen von Knochenformation und Knochenresorption keine signifikanten Veränderungen infolge der vorgenommenen Intervention. Die periphere quantitative Computertomographie, die zu Anfang und Ende der Interventionsphase und nach insgesamt einem Jahr durchgeführt wurde, wies bei der Messung der Kortikalisdicke des Radius eine signifikante Erhöhung in der Verumgruppe im Vergleich zur Plazebogruppe nach einem Jahr auf.

In diesem Experiment konnte zudem nachgewiesen werden, dass eine Supplementation von 18 g L-Argininhydrochlorid über ein halbes Jahr, entgegen den Ergebnissen von Hurson et al. (1995) sowie Blum et al. (2000a), zu keiner langfristigen Erhöhung der IGF 1-Konzentration führt und somit keinen IGF 1 vermittelten Einfluss auf den Knochenstoffwechsel postmenopausaler Frauen ausübt.

Da die Studie ambulant durchgeführt wurde, war es insbesondere wichtig, Faktoren, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen oder Veränderungen in der Konzentration der Biomarker des Knochenstoffwechsels bewirken, während des Experiments konstant zu halten und zu kontrollieren. Bei der Auswahl der Probandinnen wurden daher ausschließlich Frauen in der frühen Postmenopause gewählt, die keine Medikamente oder Hormone einnahmen, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen könnten. Zudem ist die Gewährleistung einer Konstanz in der sportlichen Betätigung im Beobachtungszeitraum wichtig, da diese einen wesentlichen Einfluss auf die Knochenzusammensetzung ausübt. So wird in der

Literatur eine Adaptation der Knochenstruktur und -geometrie durch sportliche Aktivität beschrieben, die insbesondere das kortikale Knochenkompartiment betrifft (Frost, 1997a; Martin, 1991; Spadaro *et al.*, 1994). Die Probandinnen dokumentierten daher die Art und Dauer der sportlichen Aktivität während der Studie in Aktivitätsprotokollen. Die Auswertung der Protokolle (Tab 4.3) ergab keine Veränderung der sportlichen Aktivität im Studienverlauf, so dass dieser Einflussfaktor in der vorliegenden Studie keine Auswirkung auf den Knochenstoffwechsel ausübte.

Es ist bekannt, dass Vitamin D die intestinale Calciumabsorptionsrate erhöht. Somit kann eine verminderte Vitamin D-Bildung über die Haut den Knochenstoffwechsel negativ beeinflussen. Zittermann *et al.* (1998) stellten jedoch in einer Untersuchung an premenopausalen Frauen fest, dass eine jahreszeitlich bedingte unterschiedliche Vitamin D-Bildung über die Haut durch eine ausreichende Calciumzufuhr kompensiert werden kann, solange kein akuter Vitamin D-Mangel vorliegt. In der vorliegenden Studie wurde daher die Calciumzufuhr anhand von Ernährungsprotokollen (Tab. 4.2) erfasst. Diese lag im Normbereich für postmenopausale Frauen, so dass eine möglicherweise unterschiedliche Sonnenbestrahlung und damit eine unterschiedliche Vitamin D-Bildung über die Haut ausgeglichen werden konnte. Das Ernährungsprotokoll erlaubte ebenso eine Erfassung der Energiezufuhr durch Berechnung der Zufuhr an Hauptnährstoffen. Da eine defizitäre Energiezufuhr eine Auswirkung auf den Knochenstoffwechsel ausübt (Ricci *et al.*, 2001; Talbott *et al.*, 1998) wurde die Nährstoffzufuhr und damit die Energiezufuhr während der Studie über Ernährungsfragebögen kontrolliert. Die Auswertung der Fragebögen wies eine ausreichende Energiezufuhr beider Gruppen während der gesamten Experimentdauer auf. Somit ist auch ein ernährungsbedingter Einfluss auf den Knochenstoffwechsel durch defizitäre Energiezufuhr auszuschließen.

Der Umbau des Knochens weist eine zirkadiane Rhythmik auf. So ist die Aktivität der Osteoklasten in der Nacht höher als bei Tag (Blumsohn *et al.*, 1994). Auch die Osteoblastenaktivität weist eine, wenn auch nicht so ausgeprägte, Rhythmik auf (Greenspan *et al.*, 1997). Zur Elimination einer Auswirkung dieser zirkadianen Rhythmik wurde zur Bestimmung der Biomarker des Knochenstoffwechsels bei

allen Probandinnen stets zur gleichen Zeit morgens in nüchternem Zustand Blut abgenommen.

Wie beschrieben, wurden die exogenen (Aktivität, Jahreszeit, Medikamente, Ernährung) und endogenen (zirkadiane Rhythmik der Biomarker, Menopausenstatus) Einflussfaktoren in der vorliegenden Studie eng kontrolliert. Auftretende Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen sind daher auf die L-Argininhydrochlorid-Supplementation zurückzuführen.

Unter standardisierter Nitratzufuhr wird die Nitratexkretion im Urin als gebräuchliche Methode zur Bestimmung der Stickstoffaktivität angenommen (Suzuki *et al.*, 1992). Da die Nitratzufuhr in dem vorliegenden Experiment jedoch nicht standardisiert wurde, erfolgte die Kontrolle der Einnahme des L-Argininhydrochlorid durch die Bestimmung der Gesamtstickstoff-Konzentration im Urin (Abb. 4.1). Der Annahme, dass eine erhöhte Zufuhr an Nitrat oder Nitrit über die Nahrung für die Veränderungen der Gesamtstickstoffexkretion verantwortlich gewesen sei, kann entgegengehalten werden, dass die Gesamtstickstoffexkretion der nicht-substituierten Frauen während des Untersuchungszeitraums unverändert blieb. Die signifikante Erhöhung der Stickstoff-Konzentration in der Verumgruppe zeigt daher, dass L-Arginin tatsächlich eingenommen und verstoffwechselt wurde. Es ist bekannt, dass die Stickstoffexkretion jedoch ebenso durch den Abbau von Muskelproteinen oder durch Erhöhung der Proteinzufuhr mit der Nahrung gesteigert werden kann. Da hier aber weder eine Veränderung des Körpergewichts der Probandinnen noch der Proteinaufnahme oder der sportlichen Aktivität über den Studienzeitraum zu verzeichnen war, lässt sich der Anstieg der Stickstoffexkretion auf die Supplementation zurückführen und wurde somit als „Compliance“-Parameter herangezogen.

In den ersten Jahren nach der Menopause ist der Verlust an trabekulärer aber auch an kortikaler Knochensubstanz stark erhöht (Gatti *et al.*, 1996). Dieser erhöhte Knochenumsatz nimmt in der späten Postmenopause wieder ab. Es

erscheint daher sinnvoll, die Wirkung und Effektivität neuer therapeutischer Maßnahmen gerade während dieser Zeit des erhöhten Knochenumbaus zu prüfen (Delmas, 2000; Bjarnason *et al.*, 2000). Daher bestand das in der Studie gewählte Probandenkollektiv aus Frauen in der frühen Postmenopause. Nach De Leo *et al.* (2000) bieten biochemische Marker des Knochenstoffwechsels dabei die Möglichkeit, frühzeitig die Auswirkungen einer Therapie beobachten zu können. Zudem korrelieren sie signifikant mit den zeitlich versetzt sichtbaren Veränderungen der Knochenstruktur und Knochendichte (Garnero *et al.*, 1994; Delmas, 2000). Bei Betrachtung der Biomarker des Knochenstoffwechsels konnte jedoch kein Einfluss der L-Argininhydrochlorid-Supplementation auf die Knochenresorption, gemessen durch den Resorptionsmarker CTX als zuverlässigen Marker der Osteoklastenaktivität (Barthlen *et al.*, 2000; Rosen *et al.*, 2000; Hannon *et al.*, 2000), ermittelt werden (Abb. 4.5). Im gesamten Studienkollektiv ist eine Zunahme der CTX-Konzentration zwischen der basalen Messung und der Messung nach vier Monaten zu erkennen, die wahrscheinlich auf den natürlichen Anstieg der Knochenresorption in der Menopause zurückgeführt werden kann (Garnero und Delmas, 1997). Dem entgegen zeigten Wimalawansa *et al.* (2000a) bei transdermaler NO-Donoren-Applikation im Humanexperiment eine Reduktion der Knochenresorption, gemessen durch das N-terminale Crosslink Telozeptid (NTX), einem weiteren Biomarker der Knochenresorption. Dabei wurde die Wirkung des NO-Donors Nitroglycerin auf die Marker des Knochenstoffwechsels bei ovariectomierten Frauen untersucht. Den Probandinnen wurde über ein Jahr Nitroglycerin (0,2 mg/kg Körpergewicht) transdermal appliziert, während die Vergleichsgruppe ein Östrogenpräparat erhielt. In der Gruppe mit Nitroglycerin-Applikation sank die Konzentration des Knochenresorptionsmarker NTX um 30 % ab, während die Osteocalcin-Konzentration um 53 % und die bAP-Konzentration um 27 % anstieg. Basierend auf diesen Ergebnissen diskutieren Wimalawansa *et al.* (2000a) einen möglichen Aufbau des Knochens durch eine erhöhte Knochenformation auf Grund der Nitroglycerin-Gabe und damit nicht nur eine Suppression des Knochenumsatzes, sondern sogar eine anabole Therapiemöglichkeit, da trotz Anstieg der Konzentration der Formationsmarker die Konzentration der Resorptionsmarker

absinkt. In der Vergleichsgruppe mit Östrogengabe hingegen nahm sowohl die NTX Konzentration als auch die Konzentration der Formationsmarker wie erwartet ab, da die Therapie mit Östrogenen, wie bekannt (Rosen *et al.*, 1997; Bonde *et al.*, 1995), zu einer rasch einsetzenden Suppression des Knochenumsatzes, also der Resorption und der Formation, führt. Mit Bezug auf diese Ergebnisse wäre in der vorliegenden Studie eine Reduktion der Knochenresorption und damit eine Erniedrigung der CTX-Konzentration in der Verumgruppe zu erwarten gewesen. Somit hatte die L-Argininhydrochlorid-Supplementation von 18 g nicht den einer Nitroglycerin-Applikation vergleichbaren Effekt auf die Knochenresorption.

Im Zell- und im Tierexperiment wurde bisher ein positiver Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Osteoblastenaktivität und damit auf die Knochenformation festgestellt (Armour *et al.*, 2001; Aguirre *et al.*, 2001). Auch beim Menschen wies die exogene Stimulation der NO-Synthese über die Gabe von NO-Donoren (Wimalawansa, 2000a), wie bereits beschrieben, neben der Reduktion der Knochenresorption eine erhöhte Konzentration der Knochenformationsmarker auf. Entgegen den daraus resultierenden Erwartungen konnte in der vorliegenden Studie bei Supplementation mit dem Stickstoffmonoxid-Vorläufer L-Arginin in Form von L-Argininhydrochlorid keine Erhöhung der Knochenformation, gemessen durch die Formationsmarker PICP (Abb. 4.6), bAP (Abb. 4.7) und Osteocalcin (Abb. 4.8), festgestellt werden. Der Formationsmarker PICP wies einen signifikanten Unterschied im Vergleich der Verum- mit der Plazebogruppe auf, dabei ist ein leichter Anstieg des Formationsmarkers in der Verumgruppe im Vergleich zu einer leichten Abnahme der PICP-Konzentration in der Plazebogruppe nach sechs Monaten zu erkennen. Anzumerken sei jedoch, dass bAP und Osteocalcin auf Grund ihrer Sensitivität und Spezifität als bevorzugte Biomarker der Knochenformation, vor allem zur Beurteilung der Effektivität von Therapien, herangezogen werden (Eyre, 1997). PICP wird in der Wissenschaft eher kritisch betrachtet (Gundberg, 2000). Obwohl einige Arbeiten eine gute Korrelation zwischen Knochenaufbau und PICP Konzentration feststellten (De Leo *et al.*, 2000; Christenson, 1997) bemerken Eyre *et al.* (1997), dass PICP zwar die Aktivität der Kollagensynthese widerspiegelt, hierzu aber nicht

nur die Typ I Kollagensynthese des Knochens in der Knochenformation sondern auch die Typ I Kollagensynthese anderer Gewebe, wie z. B. der Haut zählt. Auch Hassager et al. (1991) und Parfitt et al. (1987) konnten nur eine geringe Korrelation zwischen PICP und Knochenaufbau feststellen. Betrachtet man diesen Überlegungen folgend die Veränderungen der sensitiven Formationsmarker bAP und Osteocalcin, so lassen die Ergebnisse keinen Einfluss der L-Argininhydrochlorid-Supplementation erkennen. Die Ergebnisse zeigen in beiden untersuchten Gruppen einen signifikanten Anstieg der bAP-Konzentration im Studienverlauf. Dies ist vermutlich, ebenso wie der Anstieg der CTX-Konzentration, altersbedingt auf den natürlichen Anstieg der Knochenumbaurate in der frühen Postmenopause zurückzuführen (De Leo *et al.*, 2000; Garnero und Delmas, 1997).

Die Messung der Knochendichte, -struktur und -geometrie erfolgte an Radius und Tibia, den klinisch anerkannten Messorten zur Bestimmung von Veränderungen innerhalb der Knochenkompartimente (Cummings *et al.*, 1993). Dabei wurden Messungen zu Beginn der Studie sowie nach sechs und 12 Monaten durchgeführt. Grund für die Messung sechs Monate nach Ende der Supplementationsphase ist der langsame Remodellierungszyklus, der Veränderungen innerhalb der Knochenkompartimente erst langsam sichtbar werden lässt (de Vernejoul, 1996). Im Gegensatz zu den Biomarkern des Knochenstoffwechsels, die die aktuellen Resorptions- und Formationsvorgänge im Knochen widerspiegeln, sind die daraus resultierenden Veränderungen der Knochendichte, -masse und -struktur erst dann sichtbar, wenn der Umbauzyklus abgeschlossen ist (Seibel *et al.*, 2002). Eriksen et al. (1984; 1986) untersuchten den Remodellierungszyklus des trabekulären Knochens und fanden heraus, dass der Resorptionsvorgang zwar in sehr kurzer Zeit durchgeführt wird (2 bis 3 Wochen), die Formation des Knochens jedoch erheblich länger andauert (132 bis 172 Tage). So konnten Brockstedt et al. (1993) auch im kortikalen Knochenkompartiment in der Postmenopause einen Remodellierungszyklus von durchschnittlich 28 Tagen zur Knochenresorption mit einer anschließenden Dauer von 51 bis 127 Tagen zur Knochenformation feststellen. Demzufolge lassen sich Veränderungen durch Interventionsmaß-

nahmen in den einzelnen Knochenkompartimenten erst zeitversetzt erfassen. Die Ergebnisse verschiedener Studien haben gezeigt, dass eine signifikante Korrelation zwischen frühen Veränderungen der Knochenmarker (nach drei bis sechs Monaten) und späten Veränderungen der Knochendichte und -masse (nach ein bis zwei Jahren) bei Therapie mit Östrogenen oder Bisphosphonaten besteht (Delmas, 2000; Chesnut, III. *et al.*, 1997; Garnero *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1993). Um in der vorliegenden Studie zeitversetzte Veränderungen durch die L-Argininhydrochlorid-Supplementation mittels bildgebender Verfahren messen zu können, wurde daher eine zusätzliche Messung sechs Monate nach Ende der Supplementationsphase durchgeführt.

Entgegen den Untersuchungsergebnissen von Jamal *et al.* (1998) sowie Wimalawansa *et al.* (2000a), die einen positiven Effekt einer NO-Donoren-Einnahme auf die Knochendichte bei postmenopausalen (Jamal *et al.*, 1998) und bei ovariectomierten Frauen (Wimalawansa, 2000a) nachweisen konnten, zeigte die Auswertung der pQCT-Messung der vorliegenden Studie keinen Einfluss der Supplementation mit L-Argininhydrochlorid auf die Knochendichte, die Knochenmasse oder die Geometrie des Knochens. Eine Ausnahme bildet die Kortikalisdicke des Radius, da hier eine signifikant dickere Kortikalis der Verumgruppe nach 12 Monaten im Vergleich zur Plazebogruppe gemessen werden konnte. Hier stellt sich die Frage, warum die Supplementation einen Einfluss auf die Kortikalisdicke des Radius hat, die Kortikalisdicke der Tibia jedoch nicht beeinflusst wird? Ein Erklärungsansatz wäre eine unterschiedliche Wirkung der L-Argininhydrochlorid-Supplementation auf unterschiedliche Skelettregionen. So beobachteten Uusi-Rasi *et al.* (2002) einen signifikanten Effekt einer Calcium-Supplementation auf die mittels pQCT gemessene Knochendichte des Radius, während keine Veränderungen der Knochendichte der Tibia infolge der Calcium-Supplementation zu erkennen waren. Diese unterschiedliche Reaktion verschiedener Skelettregionen auf eine Calciumgabe wird auch von Prince *et al.* (1995) beschrieben. Zudem stellten Kerr *et al.* (1996) sowie Adami *et al.* (1999) fest, dass auch durch körperliche Aktivität nicht alle Skelettregionen gleichermaßen beeinflusst werden. Uusi-Rasi *et al.* (2002) stellten die Vermutung auf, dass sportliche Aktivität auf die gewichtstragenden Knochen der Tibia einen stärkeren

Einfluss ausübt als auf die nicht gewichtstragenden Knochen des Radius. Der Radius scheint durch andere Einflussfaktoren, wie z. B. die Nährstoffversorgung, stärker beeinflusst zu werden. Möglicherweise lässt sich dadurch erklären, dass auch in der vorliegenden Studie die L-Argininhydrochlorid-Supplementation, ebenso wie eine Calcium-Supplementation, einen positiven Effekt auf den Radius ausübt ohne den gleichen Effekt auf die Tibia auszuüben.

Im Gegensatz zu der unterschiedlichen Kortikalisdicke des Radius zwischen der Verumgruppe und der Plazebogruppe zeigen die zeitlichen Veränderungen eine Abnahme der kortikalen Knochenmasse und der Kortikalisfläche des Radius in beiden Gruppen zwischen der initialen Messung und der Messung nach 12 Monaten an. Jedoch zeigt die kortikale Knochenmasse des Radius der Verumgruppe zwischen der Messung nach sechs Monaten und der Messung nach 12 Monaten keine Veränderung an. Die kortikale Knochenquerschnittsfläche des Radius zeigt in der Verumgruppe zwischen der Messung nach sechs Monaten und der Messung nach 12 Monaten sogar eher eine ansteigende Tendenz. Diese Beobachtungen sind nicht signifikant, zeigen aber Tendenzen, die die Messergebnisse der Kortikalisdicke des Radius in der Verumgruppe unterstützen.

Wie ist zu erklären, dass die Knochenformations- und Knochenresorptionsmarker den Unterschied in der Kortikalisdicke des Radius zwischen den beiden Gruppen nicht widerspiegeln? Durch die Biomarker des Knochenstoffwechsels können ausschließlich die Formations- und Resorptionsvorgänge des gesamten skeletalen Umbaus erfasst werden („overall“-Effekt) (Seibel *et al.*, 2002). Da in der vorliegenden Studie ausschließlich ein Unterschied der Kortikalisdicke des Radius durch die Supplementation auftrat, könnte dieser Effekt durch die Formations- und Resorptionsvorgänge der übrigen Skelettbereiche überlagert worden sein. Vermutlich sind daher die Veränderungen durch die Supplementation zu gering, um signifikant durch die Biomarker erfasst werden zu können. Bei genauer Betrachtung der Konzentrationsverläufe der Biomarker sind jedoch Hinweise auf die Veränderung zu erkennen. So nimmt die CTX-Konzentration in der Verumgruppe zwischen dem vierten und sechsten Monat tendenziell eher ab und liegt auf einem niedrigeren Niveau als die CTX-Konzentration der Plazebogruppe. Zudem zeigt die bAP-Konzentration nach sechs Monaten, ebenso wie die P1CP-

Konzentration, eine höhere Konzentration in der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe. Möglicherweise sind dies Indizien für die Veränderungen, die nach 12 Monaten anhand der Kortikalisdicke zu sehen sind.

Die pQCT-Messungen der Tibia zeigten in beiden Gruppen eher die Tendenz einer Reduktion des Knochens. Dabei wurde in beiden Gruppen ausschließlich im kortikalen Knochenbereich der Tibia eine Abnahme im Studienverlauf gemessen. Veränderungen im kortikalen Knochenkompartiment können durch Veränderungen des kortikalen Volumens durch periostale Expansion, endokortikale Resorption oder durch Veränderung des „Remodeling“ im kortikalen Kompartiment hervorgerufen werden (Frost, 1990). In der Postmenopause ist eine periostale Expansion ohne gleichzeitige endokortikale Resorption weitgehend ausgeschlossen, wobei dann die Resorption der Expansion überwiegt (Adami *et al.*, 1996). Die Veränderungen im kortikalen Knochenkompartiment können in der vorliegenden Studie daher entweder durch endokortikale oder periostale Resorption oder durch erhöhtes „Remodeling“ in der Kortikalis hervorgerufen worden sein. Da sich die kortikale Knochenquerschnittsfläche und das trabekuläre Kompartiment der Tibia beider Gruppen jedoch nicht ändert, liegt die Vermutung nahe, dass ein erhöhtes „Remodeling“ innerhalb des kortikalen Knochenkompartiments der Tibia stattgefunden hat. Diese Annahme stimmt mit den Ergebnissen der Biomarker überein, da die Erhöhung der CTX- und bAP-Konzentration ebenfalls für ein erhöhtes „Remodeling“ spricht (Garnero und Delmas, 1997). Diese Veränderungen traten in beiden untersuchten Gruppen auf und zeigen, dass der Knochenabbau im kortikalen Bereich der Tibia durch die L-Argininhydrochlorid-Supplementation nicht aufgehalten werden konnte.

Wimalawansa *et al.* (2000a) zeigten, dass eine Gabe von NO-Donoren ebenso effektiv wie eine Östrogen-Therapie ist und eventuell sogar eine anabole Wirkung auf den Knochenstoffwechsel besitzt. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung ausschließlich bei der Messung der Kortikalisdicke einen signifikanten Effekt der L-Argininhydrochlorid-Supplementation. Die NO-

Synthese über NO-Donoren scheint also weitaus effektiver als die Supplementation mit L-Argininhydrochlorid. Wie ist dies zu erklären? Ein Grund dafür könnte die Bioverfügbarkeit von L-Arginin sein. Vermutlich ist die Bioverfügbarkeit von 68 % (Bode-Boger *et al.*, 1998) zu gering, um genügend Stickstoffmonoxid aus Arginin zu bilden. Zudem beschreiben Tangphao *et al.* (1999) eine große Varianz der Bioverfügbarkeit von L-Arginin zwischen verschiedenen Probanden. Ein Grund für diese Variabilität ist nicht bekannt. Eine weitere Ursache könnte in einem Mangel der Coenzyme bei der Synthese des NO aus L-Arginin liegen. Die NOS benötigt verschiedene Coenzyme (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), Flavinadenindinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN) und Tetrahydrobiopterin (BH₄)) zur vollen enzymatischen Aktivität. BH₄ ist ein allosterischer Effektor, der die Oxidase- und Reduktase-Domänen der NO-Synthase verbindet (Kaufman, 1993). Bei Abwesenheit von BH₄ kommt es zur Entkopplung des L-Arginin-NO Syntheseweges und zur Formation von Superoxiden (Heinzel *et al.*, 1992). Higashi *et al.* (2002) beschreiben eine Gefäßerweiterung des Unterarmes durch Erhöhung der NO-Synthese über die eNOS nach BH₄ Infusion bei Bluthochdruckpatienten. Im Tierversuch konnten Hong *et al.* (2001) einen niedrigeren Blutspiegel an BH₄ bei Ratten mit Bluthochdruck im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Diese und andere Studien zeigen, dass bei Mangel an BH₄ die NO-Produktion herabgesetzt ist und eine Gabe von BH₄ zu einer gesteigerten Produktion von NO führt (Higashi *et al.*, 2002, Hong *et al.*, 2001; Setoguchi *et al.*, 2002; Fukuda *et al.*, 2002). Die Menopause ist assoziiert mit einem niedrigen Serum-Level an NO und damit einer geringen Synthese (Cicinelli, *et al.*, 1997; Rosselli *et al.*, 1995). Möglicherweise ist eine geringe NO-Synthese durch einen Mangel an BH₄ ein Grund dafür. Die Bestimmung von BH₄ im Plasma postmenopausaler Frauen wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben, könnte hier aber weiterführende Hinweise geben. Weiterhin zeigten Fiore *et al.* (2000) im Tierversuch einen Anstieg der Knochendichte nach L-Arginin-Supplementation, wenn NO, durch vorherige Gabe des NO-Synthese hemmenden Medikamentes Cyclosporin A, im Mangel vorlag. Zusätzlich stellten Khartinov *et al.* (1995) die Vermutung auf, dass ein signifikanter Effekt einer L-Arginin-Supplementation nur dann zu messen sei, wenn durch die

Supplementation ein Mangel ausgeglichen wird. Folglich wäre ein Anstieg der NO-Synthese durch L-Arginin-Supplementation nur dann möglich, wenn die Synthese zuvor unzureichend war. Zudem zeigte sich im Tierexperiment, dass der positive Effekt der NO-Donoren-Gabe von der Häufigkeit der Applikation abhängig ist (Wimalawansa *et al.*, 2000). Dabei zeigte eine intermittierende Frequenz der NO-Donoren-Applikation den wirksamsten Effekt auf die Knochendichte. Dies konnte auch von Jamal *et al.* (1998) beobachtet werden, der die effektivste Wirkung durch eine intermittierende Gabe von Nitraten (Nitroglycerin, Isosorbiddinitrate und Isosorbidmononitrate) auf den Knochenstoffwechsel feststellte. In der vorliegenden Studie wurde ausschließlich die Effektivität einer kontinuierlichen L-Arginin-Supplementation beobachtet. Ob die NO-Synthese über L-Arginin ebenso wie die NO-Freisetzung über die NO-Donoren bei intermittierender Supplementation eine effektivere Wirkung als eine kontinuierliche Gabe auf den Knochenstoffwechsel ausüben kann, wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben und bedarf weiterer Untersuchungen.

Im Gegensatz zu der gleichbleibenden sportlichen Aktivität wiesen die Ergebnisse der pQCT-Messung eine signifikante Zunahme der Muskelquerschnittsfläche des Unterschenkels in beiden Gruppen auf (Abb. 4.3). Dabei wird die Muskelquerschnittsfläche als aussagekräftiger Parameter zur Erfassung der Muskelkraft beschrieben (Schoenau *et al.*, 2002). Warum nimmt aber in der vorliegenden Studie die Muskelquerschnittsfläche des Unterschenkels, und damit die Muskelkraft zu, wenn sich die sportliche Aktivität der Probandinnen im Zeitverlauf nicht verändert? Ist also die Muskelquerschnittsfläche in dieser Studie tatsächlich ein geeigneter Parameter zur Beschreibung der Muskelkraft? Die Bestimmung der Muskelquerschnittsfläche wird als Methode zur Beurteilung der Muskelkraft als vorteilhaft beschrieben, da sie die Motivation, den Gemütszustand und die Gewöhnung an das Gerät unbeachtet lässt (Schoenau *et al.*, 2002). Sie ist jedoch, anders als die computertomographische Messung des Knochens, zusätzlich von verschiedenen Faktoren abhängig. So muss die Messung des Unterschenkels unter Ruhebedingungen stattfinden, da Flüssigkeitsverschiebungen, z. B. durch körperliche Betätigung (Nygren *et al.*, 2002) aber auch alleine

schon durch den Wechsel zwischen aufrechter und liegender oder sitzender Position kurz vor der Messung (Berg *et al.*, 1993), die Messergebnisse verfälschen können. Auch die Fußstellung, das heißt ob der Fuß gestreckt oder angezogen wird, kann einen Einfluss haben, da die Muskellänge und damit die Form des Muskelbauchs verändert wird. Da die Messung möglichst standardisiert durchgeführt wurde, konnte die Fußstellung als Einflussfaktor durch Einlegen des Fußes in eine feste Fußschale weitgehend eliminiert werden. Dennoch konnten durch die ambulante Durchführung der Studie nicht alle exogenen Faktoren, die einen Einfluss auf die Flüssigkeitsverschiebungen haben könnten, eliminiert werden. Diese Einflussgrößen scheinen daher die Messung der Muskelquerschnittsfläche des Unterschenkels in dieser ambulant durchgeführten Studie zu einem nur bedingt verwendbaren Parameter zu machen. Zudem würde eine Zunahme der Muskelquerschnittsfläche ausgelöst durch eine Zunahme der Muskelkraft laut Literatur eine Veränderung des kortikalen Knochenkompartiments bewirken (Baumgartner *et al.*, 1999). So fanden Adami *et al.* (Adami *et al.*, 1999) heraus, dass eine maximale Belastung des Knochens zu einer Expansion der kortikalen Knochenfläche zu Lasten der trabekulären Knochenfläche durch Anbau von kortikalem Knochen an der endostalen Oberfläche bei postmenopausalen Frauen führt. Diese Veränderungen der Tibia konnten jedoch in der vorliegenden Studie bei beiden Gruppen nicht festgestellt werden. In beiden untersuchten Gruppen ist im Gegenteil eher der Trend zum Knochenabbau der Tibia erkennbar. Ferner korreliert der Strength-Strain Index, als Maß für die mechanische Festigkeit des Knochens, signifikant mit der Muskelkraft (Augat *et al.*, 1998b; Ferretti *et al.*, 1996) und hätte bei steigender Muskelquerschnittsfläche aufgrund erhöhter Muskelkraft ebenfalls ansteigen müssen. Der SSI der Tibia blieb jedoch in beiden Gruppen unverändert (Tab. 4.4). Insofern scheinen die bereits genannten exogenen Einflussfaktoren die Ergebnisse derart zu beeinflussen, dass die Bestimmung der Muskelquerschnittsfläche des Unterschenkels in der vorliegenden Studie nicht als aussagekräftiger Parameter zur Beurteilung der Muskelkraft herangezogen werden kann. Die Einhaltung einer gewissen Vorlaufzeit, um die Messungen unter Ruhebedingungen durchführen zu können, sollte daher in zukünftigen Studien unbedingt stattfinden.

Entgegen dem Anstieg der Muskelquerschnittsfläche des Unterschenkels ist innerhalb der ersten sechs Monate eine signifikante Abnahme der Muskelquerschnittsfläche des Unterarmes in den beiden untersuchten Gruppen zu erkennen (Abb. 4.2). Diese Ergebnisse stimmen nicht mit den Messungen des Handdynamometers (Abb. 4.4) überein, das ebenfalls zur Bestimmung der Muskelkraft des Unterarms dient. Hier wurde keine Veränderung der Muskelkraft im Zeitverlauf gemessen. Diese widersprüchlichen Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass die Beurteilung der Muskelkraft durch die oben genannten Messmethoden in einer Feldstudie nur schwer möglich zu sein scheint.

Die Art, Dauer und Intensität der sportlichen Aktivität, die einen positiven Einfluss auf den Knochenstoffwechsel ausübt, ist bisher noch nicht vollständig erforscht. Dennoch ist bekannt, dass Sportarten mit großem Kraftaufwand, wie zum Beispiel Gewichtheben, effektive Stimuli des Knochenaufbaus sind (Frost, 1997b; Heinonen *et al.*, 2001; Taaffe *et al.*, 1997). Wie die Auswertung der Aktivitätsprotokolle in der vorliegenden Studie zeigte, wurden Kraftsport- und Kampfsportarten in beiden Gruppen nur sehr selten oder gar nicht betrieben. Die Probandinnen haben folglich keine Sportarten betrieben bei der die Muskelkraft und sportliche Beanspruchung einen signifikanten Einfluss auf den Knochenstoffwechsels gehabt hätte. Seit langem wird versucht den Mechanismus der mechanischen Reizleitung (Mechanotransduktion) auf den Knochen zu finden, der fähig ist, Architektur und Masse des Knochens zu ändern. Einige Wissenschaftler propagieren dabei die Signalfunktion von NO zur mechanischen Umsetzung der Aktivität auf den Knochenstoffwechsel (Jungersten *et al.*, 1997; Fox *et al.*, 1996; Maxwell *et al.*, 2001). Jungersten *et al.* (1997) zeigten, dass bei Messung der Plasma Nitratwerte von Athleten und Nichtathleten die Konzentrationen im Blut der Athleten um 22 % im Gegensatz zu den Nichtathleten erhöht waren. Fox *et al.* (1996) fanden im Tierversuch heraus, dass eine rasche NO-Freisetzung über die eNOS als Antwort auf mechanische Belastung des Knochens erfolgt und nach Inhibition des Arginin-NO Syntheseweges eine Erhöhung der Knochenformation bei mechanischer Belastung ausbleibt. Zudem konnte Maxwell *et al.* (2001) am Rattenmodell einen Anstieg der NO-Konzentration nach L-Arginingabe bei

gleichzeitiger sportlicher Aktivität feststellen. So weisen Ralston et al. (1997) darauf hin, dass eine durch mechanische Stimulation induzierte NO-Produktion positiv auf den Knochenaufbau wirken kann. Fraglich ist, ob es möglich ist, durch L-Arginin-Supplementation in Kombination mit kraftintensiver sportlicher Aktivität den Knochenstoffwechsel zu beeinflussen. Weitere Untersuchungen zur Klärung dieses Zusammenhangs sind daher erforderlich.

Dass die L-Argininhydrochlorid-Supplementation zu keiner Erhöhung der IGF 1-Konzentration führte (Abb. 4.10), war unerwartet. Bekanntlich erfolgt nach L-Arginin-Gabe eine erhöhte Freisetzung des Wachstumshormons, wobei der Mechanismus noch nicht erforscht ist (Koppeschaar *et al.*, 1992). So wird der L-Arginin-Infusionstest standardmäßig angewandt um einen Wachstumshormon-Mangel zu diagnostizieren. Auch bei oraler L-Arginin-Supplementation konnten Hurson et al. (1995) bereits nach zwei Wochen L-Argininaspartat-Supplementation von 30 g (17 g L-Arginin) bei älteren Menschen (30 Männer und Frauen, 67 bis 82 Jahre) eine signifikante Erhöhung der IGF 1-Konzentration um 44 % gegenüber der Kontrollgruppe feststellen. Hier wurde die Supplementation wie in der vorliegenden Studie auf drei Einnahmezeiten über den Tag verteilt. Zudem stellten Blum et al. (2000a) bei einer einmonatigen L-Arginin-Supplementation (9 g L-Arginin reinst.) bei postmenopausalen Frauen (n = 10) eine Erhöhung (p = 0,02) der Konzentration des Wachstumshormons im Vergleich zur Kontrollgruppe fest. Warum konnte also in der vorliegenden Studie bei Supplementation mit 18 g L-Argininhydrochlorid (14,8 g L-Arginin) keine Erhöhung der IGF 1-Konzentration beobachtet werden? Bei den bisher durchgeführten Studien mit einer L-Arginin-Supplementation wurde die IGF 1-Konzentration nach einem Zeitraum von zwei Wochen (Hurson *et al.*, 1995) oder einem Monat (Blum *et al.*, 2000a) gemessen. In dem vorliegenden Experiment betrug der Zeitraum bis zur ersten Messung jedoch zwei Monate. Möglicherweise spielt die Dauer der L-Arginin-Supplementation zur Erhöhung der IGF 1-Konzentration eine Rolle. Eine Adaptation an das hohe Substratangebot durch die Supplementation wäre daher ein Erklärungsansatz. Isgaard et al. (1988) weisen darauf hin, dass die IGF 1 Produktion im Skelettsystem stark von einer pulsierenden Sekretion des

Wachstumshormons abhängig ist. Eine weitere Erklärung wäre daher, dass diese pulsierende Sekretion des Wachstumshormons durch ein Überangebot an L-Arginin beeinflusst wird und folglich zu keiner vermehrten Freisetzung an IGF 1 führt. Hurson et al. (1995) verwendeten L-Argininaspartat zur Supplementation, während in dem vorliegenden Experiment L-Argininhydrochlorid supplementiert wurde. So könnte auch die Substratverbindung von L-Arginin und Hydrochlorid eine entscheidende Rolle spielen. Visser et al. (1994) fordern einen Vergleich verschiedener L-Arginin Supplemente zur Erfassung der wirksamsten Verbindung. So sollte in einer Studie der Vergleich einer Supplementation mit L-Arginin in Reinform, L-Argininhydrochlorid, L-Argininaspartat und einer Kombination von L-Arginin und L-Lysine untersucht werden.

Auch stellt sich die Frage, ob die Supplementationsmenge an L-Arginin ausreichend war. Nach Barbul et al. (1986) wäre eine L-Arginin-Supplementation von 30 g pro Tag tolerabel. Auch Blum et al. (2000b) sehen eine orale Supplementation von 12 bis 21 g pro Tag als unbedenklich an und beschrieben keine klinischen Nebenwirkungen. Dem entgegen halten Chin-Dusting et al. (1996) 20 g pro Tag für die maximal tolerable Dosis, da vermehrt Diarrhoe, Unwohlsein und Bauchkrämpfe auftreten. Hurson et al. (1995) wählten bei Probanden im Alter von 67 bis 82 Jahren eine Supplementationsmenge von 17 g L-Arginin. Hier traten keine unerwünschten Nebenwirkungen auf. In der vorliegenden Untersuchung wurde daher in Anlehnung an diese Studie eine Supplementationsmenge von 18 g Argininhydrochlorid und damit 14,8 g L-Arginin, einer gut verträglichen Supplementationsmenge, gewählt. Eine Erhöhung der Supplementationsmenge ist zudem schwierig, da L-Arginin sehr bitter schmeckt und die Akzeptanz dadurch stark abnimmt. Das Lösen der Aminosäure in Sirup oder süßen Säften, wie es häufig in Studien mit L-Arginin-Supplementation durchgeführt wurde (Clarkson *et al.*, 1996; Hurson *et al.*, 1995; Luiking *et al.*, 1998; De Aloysio *et al.*, 1982), mildert zwar den bitteren Geschmack, bleibt jedoch bei täglicher Einnahme unangenehm. Auch in der vorliegenden Studie war nach Aussagen der Probandinnen die angewandte Menge noch tolerabel, eine höhere Dosis wäre jedoch kritisch gewesen und hätte somit Einfluss auf die Compliance

der Probandinnen genommen. Eine Umsetzung einer höheren L-Arginin-Supplementation birgt dadurch gewisse Probleme.

Im menschlichen Organismus ist im Durchschnitt mehr als ein Kilogramm Calcium gespeichert, wovon sich 99 % in Form von Hydroxyapatit im Knochen und den Zähnen befinden. Bei unzureichender Zufuhr oder vermehrter Ausscheidung von Calcium wird die Calciumhomöostase des Blutes durch Freisetzung von Calcium aus dem Skelett aufrecht erhalten. In der Literatur wird beschrieben (Kerstetter *et al.*, 2001; Zittermann, 1997; Heaney, 1994), dass eine Erhöhung der Proteinzufuhr eine Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate bewirkt und dadurch die renale Calciumausscheidung steigert. Verantwortlich werden insbesondere die schwefelhaltigen Aminosäuren auf Grund der durch Oxidation entstehenden Sulfate für den Anstieg der renalen Calciumausscheidung bei erhöhter Proteinzufuhr gemacht (Heaney *et al.*, 1982). Ob die Gabe der basischen Aminosäure L-Arginin einen Einfluss hat, sollte durch die Bestimmung von PTH erfasst werden. Eine Erhöhung der PTH Konzentration ist ein Anzeichen einer vermehrten Freisetzung von Calcium aus dem Knochen, da PTH direkt auf die Freisetzung von Calcium aus dem Knochen und die Calcium Reabsorption der Niere wirkt. PTH (Abb. 4.9) zeigt in der vorliegenden Untersuchung jedoch keine Veränderungen in Folge der L-Argininhydrochlorid Supplementation. Somit wurde der Calciumstoffwechsel durch die L-Argininhydrochlorid Supplementation nicht beeinflusst.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass eine orale Supplementation mit L-Argininhydrochlorid nicht den einer NO-Donoren-Applikation vergleichbaren Effekt auf den Knochenstoffwechsel postmenopausaler Frauen ausübt. Die Erfolge, die durch die Intervention erzielt werden konnten, sind auf die kortikale Struktur des Radius beschränkt und somit nicht auf das gesamte Skelettsystem übertragbar. Demnach sollten mögliche Faktoren, die zu dieser reduzierten Wirkung geführt haben könnten, in Folgestudien untersucht werden, um die

Wirkung der Aminosäure auf den Knochenstoffwechsel durch Erhöhung der Stickstoffmonoxid-Synthese oder Steigerung der IGF 1-Produktion im Organismus des Menschen zu verbessern.

6 Zusammenfassung

Einleitung: Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen eine positive Wirkung des freien Radikals Stickstoffmonoxid auf den Knochenstoffwechsel. Der Stickstoffmonoxidbestand des Organismus kann durch Gabe pharmakologischer NO-Donoren erhöht werden. Erste Humanexperimente bestätigen einen positiven Einfluss einer NO-Donoren-Applikation auf den Knochenstoffwechsel. Andererseits kann eine orale Supplementation des Stickstoffmonoxid-Vorläufers L-Arginin ebenfalls zu einer Erhöhung der NO-Produktion führen und scheint zudem, im Gegensatz zu den NO-Donoren, in Mengen bis 30 g frei von unerwünschten Wirkungen zu sein. Zudem führt eine orale Supplementation von L-Arginin zu einer signifikanten Steigerung der IGF 1 Konzentration, was ebenfalls einen positiven Einfluss auf den Knochenstoffwechsel ausübt.

Ziel: In der vorliegenden Studie wurde daher die Auswirkung einer sechsmonatigen Supplementation von 18 g L-Argininhydrochlorid auf den Knochenstoffwechsel postmenopausaler gesunder Frauen in einer ambulant durchgeführten Studie untersucht.

Methode: 30 gesunde postmenopausale Frauen, aufgeteilt auf zwei Gruppen à 15 Probandinnen, nahmen an der Untersuchung teil. Die Verumgruppe (54,5 ± 4,1 Jahre, 66,3 ± 10,5 kg) erhielt über sechs Monate eine tägliche Supplementation mit 18 g L-Argininhydrochlorid (14,8 g freies L-Arginin), die Placebogruppe (55,3 ± 4,4 Jahre, 64,2 ± 9,1 kg) erhielt 18 g Dextrose. Um exogene Einflussfaktoren auszuschließen wurden die Probandinnen gebeten ihre Essgewohnheiten und die sportliche Aktivität während des Studienzeitraumes nicht zu verändern. Zur Überprüfung wurden die Ernährungsgewohnheiten und die sportliche Aktivität innerhalb des Studienzeitraumes dokumentiert. Zur Kontrolle der L-Arginin-Einnahme wurde als „Compliance“-Parameter die Gesamtstickstoffexkretion zweier aufeinanderfolgender 24 Stunden-Urine zu Beginn sowie nach zwei, vier und sechs Monaten bestimmt. Zur Analyse von IGF 1, den Knochenformationsmarkern PICP, bAP und Osteocalcin, dem Knochenresorptionsmarker

CTX, sowie Parathormon und Serum-Calcium wurden ebenfalls zu Beginn der Studie sowie nach zwei, vier und sechs Monaten Blutproben entnommen. Zudem wurde zu Beginn und zum Ende der Supplementation sowie nach insgesamt einem Jahr das trabekuläre und kortikale Knochenkompartiment von Radius und Tibia mittels peripherer quantitativer Computertomographie gemessen. Desweiteren wurden Parameter zur Beurteilung der Muskelkraft erfasst.

Ergebnisse: Die Probandinnen änderten weder ihre Essgewohnheiten noch traten Veränderungen der sportlichen Aktivität über den Studienzeitraum auf. Wie erwartet stieg die Gesamtstickstoff-Exkretion der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe signifikant an. Anhand der Biomarker des Knochenstoffwechsels konnten in diesem Experiment keine Veränderungen durch die L-Argininhydrochlorid-Supplementation beobachtet werden. Die Ergebnisse der pQCT-Messung zeigten ausschließlich bei der Messung der Kortikalisdicke des Radius eine supplementationsbedingte Erhöhung in der Verumgruppe. Zudem wurde keine Erhöhung der IGF 1-Konzentration durch die L-Argininhydrochlorid-Supplementation ermittelt.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse zeigen, dass eine Supplementation mit L-Argininhydrochlorid nicht den einer NO-Donoren-Applikation vergleichbaren Effekt auf den Knochenstoffwechsel postmenopausaler Frauen ausübt. Einzig die Kortikalisdicke des Radius zeigte eine supplementationsbedingte Erhöhung in der Verumgruppe. Da kein Anstieg der IGF 1-Konzentration aufgrund der L-Argininhydrochlorid-Supplementation gemessen wurde, konnte zudem kein IGF 1-vermittelter Effekt auf den Knochenstoffwechsel erfolgen. Daher sollten mögliche Faktoren, die zu dieser reduzierten Wirkung geführt haben könnten, in Folgestudien untersucht werden um die Wirkung der Aminosäure auf den Knochenstoffwechsel durch Erhöhung der Stickstoffmonoxid-Synthese oder durch Steigerung der IGF 1-Produktion im Organismus des Menschen zu verbessern.

7 Literaturverzeichnis

- Adami, S., Gatti, D., Braga, V., Bianchini, D., and Rossini, M. (1999). Site-specific effects of strength training on bone structure and geometry of ultradistal radius in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* 14, 120-124.
- Adami, S., Zamberlan, N., Gatti, D., Zanfisi, C., Braga, V., Brogгинi, M., and Rossini, M. (1996). Computed radiographic absorptiometry and morphometry in the assessment of postmenopausal bone loss. *Osteoporos. Int.* 6, 8-13.
- Aguirre, J., Buttery, L., O'Shaughnessy, M., Afzal, F., Fernandez, D. M., Hukkanen, M., Huang, P., MacIntyre, I., and Polak, J. (2001). Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity. *Am. J. Pathol.* 158, 247-257.
- Akesson, K. (1995). Biochemical markers of bone turnover. A review. *Acta Orthop. Scand.* 66, 376-386.
- Albina, J. E., Mills, C. D., Henry, W. L. Jr., and Caldwell, M. D. (1990). Temporal expression of different pathways of 1-arginine metabolism in healing wounds. *J. Immunol.* 144, 3877-3880.
- Aloia, J. F. (1994). The gain and loss of bone in the human life cycle. *Adv. Nutr. Res.* 9, 1-33.
- Armour, K. E., Armour, K. J., Gallagher, M. E., Godecke, A., Helfrich, M. H., Reid, D. M., and Ralston, S. H. (2001). Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology* 142, 760-766.
- Armour, K. E., and Ralston, S. H. (1998). Estrogen upregulates endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human osteoblast-like cells. *Endocrinology* 139, 799-802.
- Augat, P., Fuerst, T., and Genant, H. K. (1998a). Quantitative bone mineral assessment at the forearm: a review. *Osteoporos. Int.* 8, 299-310.
- Augat, P., Iida, H., Jiang, Y., Diao, E., and Genant, H. K. (1998b). Distal radius fractures: mechanisms of injury and strength prediction by bone mineral assessment. *J. Orthop. Res.* 16, 629-635.
- Barbul, A. (1986). Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *JPEN. J. Parenter. Enteral. Nutr.* 10, 227-238.

- Barthlen, W., Klemens, C., Rogenhofer, S., Stadler, J., Unbehaun, N., Holzmann, B. (2000). Critical role of nitric oxide for proliferation and apoptosis of bone-marrow cells under septic conditions. *Ann. Hematol.* 79, 249-254.
- Baumgartner, R. N., Waters, D. L., Gallagher, D., Morley, J. E., and Garry, P. J. (1999). Predictors of skeletal muscle mass in elderly men and women. *Mech. Ageing Dev.* 107, 123-136.
- Beaumier, L., Castillo, L., Yu, Y. M., Ajami, A. M., and Young, V. R. (1996). Arginine: new and exciting developments for an "old" amino acid. *Biomed. Environ. Sci.* 9, 296-315.
- Berg, H. E., Tedner, B., and Tesch, P. A. (1993). Changes in lower limb muscle cross-sectional area and tissue fluid volume after transition from standing to supine. *Acta Physiol. Scand.* 148, 379-385.
- Bjarnason, N. H., and Christiansen, C. (2000). Early response in biochemical markers predicts long-term response in bone mass during hormone replacement therapy in early postmenopausal women. *Bone* 26, 561-569.
- Blum, A., Cannon, R. O., III, Costello, R., Schenke, W. H., and Csako, G. (2000a). Endocrine and lipid effects of oral L-arginine treatment in healthy postmenopausal women. *J. Lab. Clin. Med.* 135, 231-237.
- Blum, A., Hathaway, L., Mincemoyer, R., Schenke, W. H., Kirby, M., Csako, G., Waclawiw, M. A., Panza, J. A., and Cannon, R. O., III (2000b). Oral L-arginine in patients with coronary artery disease on medical management. *Circulation* 101, 2160-2164.
- Blumsohn, A., Colwell, A., Naylor, K., and Eastell, R. (1995). Effect of light and gamma-irradiation on pyridinolines and telopeptides of type I collagen in urine. *Clin. Chem.* 41, 1195-1197.
- Blumsohn, A., Herrington, K., Hannon, R. A., Shao, P., Eyre, D. R., and Eastell, R. (1994). The effect of calcium supplementation on the circadian rhythm of bone resorption. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 79, 730-735.
- Bode-Boger, S. M., Boger, R. H., Galland, A., Tsikas, D., and Frolich, J. C. (1998). L-arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 46, 489-497.
- Bode-Boger, S. M., Boger, R. H., Alfke, H., Heinzl, D., Tsikas, D., Creutzig, A., Alexander, K., and Frolich, J. C. (1996). L-arginine induces nitric oxide-dependent vasodilation in patients with critical limb ischemia. A randomized, controlled study. *Circulation* 93, 85-90.
- Bode-Boger, S. M., Boger, R. H., Creutzig, A., Tsikas, D., Gutzki, F. M., Alexander, K., and Frolich, J. C. (1994a). L-arginine infusion decreases

- peripheral arterial resistance and inhibits platelet aggregation in healthy subjects. *Clin. Sci. (Lond.)* 87, 303-310.
- Bode-Boger, S. M., Boger, R. H., Schroder, E. P., and Frolich, J. C. (1994b). Exercise increases systemic nitric oxide production in men. *J. Cardiovasc. Risk* 1, 173-178.
- Boger, R. H., Bode-Boger, S. M., Tsao, P. S., Lin, P. S., Chan, J. R., Cooke, J. P. (2000). An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36, 2287-2295.
- Bonde, M., Qvist, P., Fledelius, C., Riis, B. J., and Christiansen, C. (1995). Applications of an enzyme immunoassay for a new marker of bone resorption (CrossLaps): follow-up on hormone replacement therapy and osteoporosis risk assessment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 864-868.
- Brandi, M. L., Hukkanen, M., Umeda, T., Moradi-Bidhendi, N., Bianchi, S., Gross, S. S., Polak, J. M., and MacIntyre, I. (1995). Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 2954-2958.
- Brockstedt, H., Kassem, M., Eriksen, E. F., Mosekilde, L., and Melsen, F. (1993). Age- and sex-related changes in iliac cortical bone mass and remodeling. *Bone* 14, 681-691.
- Buchman, A. L., O'Brien, W., Ou, C. N., Rognerud, C., Alvarez, M., Dennis, K., and Ahn, C. (1999). The effect of arginine or glycine supplementation on gastrointestinal function, muscle injury, serum amino acid concentrations and performance during a marathon run. *Int. J. Sports Med.* 20, 315-321.
- Cantatore, F. P., and Pipitone, V. (1999). Markers of bone turnover: consideration on their clinical application in osteoporosis. *Panminerva Med.* 41, 247-251.
- Castillo, L., de Rojas, T. C., Chapman, T. E., Vogt, J., Burke, J. F., Tannenbaum, S. R., Young, V. R. (1993). Splanchnic metabolism of dietary arginine in relation to nitric oxide synthesis in normal adult man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 193-197.
- Chesnut, C. H., III, Bell, N. H., Clark, G. S., Drinkwater, B. L., English, S. C., Johnson, C. C., Jr., Notelovitz, M., Rosen, C., Cain, D. F., Flessland, K. A., and Mallinak, N. J. (1997). Hormone replacement therapy in postmenopausal women: urinary N- telopeptide of type I collagen monitors therapeutic effect and predicts response of bone mineral density. *Am. J. Med.* 102, 29-37.
- Chevalley, T., Rizzoli, R., Manen, D., Caverzasio, J., and Bonjour, J. P. (1998). Arginine increases insulin-like growth factor-I production and collagen synthesis in osteoblast-like cells. *Bone* 23, 103-109.

- Chin-Dusting, J. P., Kaye, D. M., Lefkovits, J., Wong, J., Bergin, P., and Jennings, G. L. (1996). Dietary supplementation with L-arginine fails to restore endothelial function in forearm resistance arteries of patients with severe heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 27, 1207-1213.
- Christenson, R. H. (1997). Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin. Biochem.* 30, 573-593.
- Christiansen, C., Riis, B. J., and Rodbro, P. (1990). Screening procedure for women at risk of developing postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos. Int.* 1, 35-40.
- Cicinelli, E., Ignarro, L. J., Lograno, M., Matteo, G., Falco, N., and Schonauer, L. M. (1997). Acute effects of transdermal estradiol administration on plasma levels of nitric oxide in postmenopausal women. *Fertil. Steril.* 67, 63-66.
- Clarkson, P., Adams, M. R., Powe, A. J., Donald, A. E., McCredie, R., Robinson, J., McCarthy, S. N., Keech, A., Celermajer, D. S., and Deanfield, J. E. (1996). Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults. *J. Clin. Invest.* 97, 1989-1994.
- Clementi, G., Fiore, C. E., Mangano, N. G., Cutuli, V. M., Pennisi, P., Caruso, A., Prato, A., Matera, M., and Amico-Roxas, M. (2001). Role of soy diet and L-arginine in cyclosporin-A-induced osteopenia in rats. *Pharmacol. Toxicol.* 88, 16-19.
- Colletti, L. A., Edwards, J., Gordon, L., Shary, J., and Bell, N. H. (1989). The effects of muscle-building exercise on bone mineral density of the radius, spine, and hip in young men. *Calcif. Tissue Int.* 45, 12-14.
- Consensus development conference (1993): diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am. J. Med.* 94, 646-650.
- Cormier, C. (1995). Markers of bone metabolism. *Curr. Opin. Rheumatol.* 7, 243-248.
- Cowin, S. C., Moss-Salentijn, L., and Moss, M. L. (1991). Candidates for the mechanosensory system in bone. *J. Biomech. Eng.* 113, 191-197.
- Cummings, S. R., Black, D. M., Nevitt, M. C., Browner, W., Cauley, J., Ensrud, K., Genant, H. K., Palermo, L., Scott, J., and Vogt, T. M. (1993). Bone density at various sites for prediction of hip fractures. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet* 341, 72-75.
- Daly, J. M., Reynolds, J., Thom, A., Kinsley, L., Dietrick-Gallagher, M., Shou, J., and Ruggieri, B. (1988). Immune and metabolic effects of arginine in the surgical patient. *Ann. Surg.* 208, 512-523.

- Damoulis, P. D., and Hauschka, P. V. (1997). Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 12, 412-422.
- De Aloysio, D., Mantuano, R., Mauloni, M., and Nicoletti, G. (1982). The clinical use of arginine aspartate in male infertility. *Acta Eur. Fertil.* 13, 133-167.
- De Leo, V., Ditto, A., la Marca, A., Lanzetta, D., Massafra, C., and Morgante, G. (2000). Bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in peri- and postmenopausal women. *Calcif. Tissue Int.* 66, 263-267.
- de Vernejoul, M. C. (1996). Dynamics of bone remodelling: biochemical and pathophysiological basis. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 34, 729-734.
- Delling, G. (2001). Morphologie der Osteoporose. In: *Osteoporose - Krankheitsbild und therapeutische Möglichkeiten* (W. Schulz, and H. J. Deuber, Eds.), pp. 1-12. Dustri Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen.
- Delmas, P. D. (2000). Markers of bone turnover for monitoring treatment of osteoporosis with antiresorptive drugs. *Osteoporos. Int.* 11 (Suppl 6), S66-S76.
- Delmas, P. D., Stenner, D., Wahner, H. W., Mann, K. G., and Riggs, B. L. (1983). Increase in serum bone gamma-carboxyglutamic acid protein with aging in women. Implications for the mechanism of age-related bone loss. *J. Clin. Invest.* 71, 1316-1321.
- Deutsche Gesellschaft fuer Ernaehrung (DGE) (2000). Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 1. Auflage, UMSCHAU/Brause GmbH Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main.
- Dodds, R. A., Emery, R. J., Klenerman, L., Chayen, J., and Bitensky, L. (1989). Comparative metabolic enzymatic activity in trabecular as against cortical osteoblasts. *Bone* 10, 251-254.
- Donaldson, C. L., Hulley, S. B., Vogel, J. M., Hattner, R. S., Bayers, J. H., and McMillan, D. E. (1970). Effect of prolonged bed rest on bone mineral. *Metabolism* 19, 1071-1084.
- Du, B. D., and Du Bois, E. F. (1989). A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. 1916. *Nutrition* 5, 303-311.
- Ebeling, P. R., Jones, J. D., O'Fallon, W. M., Janes, C. H., and Riggs, B. L. (1993). Short-term effects of recombinant human insulin-like growth factor I on bone turnover in normal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 1384-1387.
- Epstein, S., Poser, J., McClintock, R., Johnston, C. C., Jr., Bryce, G., and Hui, S. (1984). Differences in serum bone GLA protein with age and sex. *Lancet* 1, 307-310.

- Erhardt, J. (1999). EBIS Pro für Windows 95/98 und NT. Computer Programm. Universität Hohenheim.
- Eriksen, E. F., Brixen, K., and Charles, P. (1995). New markers of bone metabolism: clinical use in metabolic bone disease. *Eur. J. Endocrinol.* 132, 251-263.
- Eriksen, E. F., Gundersen, H. J., Melsen, F., and Mosekilde, L. (1984). Reconstruction of the formative site in iliac trabecular bone in 20 normal individuals employing a kinetic model for matrix and mineral apposition. *Metab. Bone Dis. Relat. Res.* 5, 243-252.
- Eriksen, E. F., Mosekilde, L., and Melsen, F. (1986). Kinetics of trabecular bone resorption and formation in hypothyroidism: evidence for a positive balance per remodeling cycle. *Bone* 7, 101-108.
- Eyre, D. R. (1997). Bone biomarkers as tools in osteoporosis management. *Spine* 22, 17S-24S.
- Feelisch, M. (1991). The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: Appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparations and handling of aqueous NO solutions. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17 (Suppl 3), S25-S33.
- Feelisch, M., and Noack, E. A. (1987). Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* 139, 19-30.
- Ferretti, J. L., Capozza, R. F., and Zanchetta, J. R. (1996). Mechanical validation of a tomographic (pQCT) index for noninvasive estimation of rat femur bending strength. *Bone* 18, 97-102.
- Fiore, C. E., Pennisi, P., Cutuli, V. M., Prato, A., Messina, R., and Clementi, G. (2000). L-arginine prevents bone loss and bone collagen breakdown in cyclosporin A-treated rats. *Eur. J. Pharmacol.* 408, 323-326.
- Forstermann, U., Boissel, J. P., and Kleinert, H. (1998). Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.* 12, 773-790.
- Fox, S. W., Chambers, T. J., and Chow, J. W. (1996). Nitric oxide is an early mediator of the increase in bone formation by mechanical stimulation. *Am. J. Physiol.* 270, E955-E960.
- Fox, S. W., and Chow, J. W. (1998). Nitric oxide synthase expression in bone cells. *Bone* 23, 1-6.

- Fryburg, D. A. (1993). NG-monomethyl-L-arginine inhibits the blood flow but not the insulin-like response of forearm muscle to IGF 1: possible role of nitric oxide in muscle protein synthesis. *J. Clin. Invest.* 97, 1319-1328.
- Froesch, E. R., Schmid, C., Schwander, J., and Zapf, J. (1985). Actions of insulin-like growth factors. *Annu. Rev. Physiol.* 47, 443-467.
- Frost, H. M. (1985). The pathomechanics of osteoporoses. *Clin. Orthop.* 198-225.
- Frost, H. M. (1987). Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *Anat. Rec.* 219, 1-9.
- Frost, H. M. (1990). Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 1. Redefining Wolff's law: the bone modeling problem. *Anat. Rec.* 226, 403-413.
- Frost, H. M. (1997a). On our age-related bone loss: insights from a new paradigm. *J. Bone Miner. Res.* 12, 1539-1546.
- Frost, H. M. (1997b). Why do marathon runners have less bone than weight lifters? A vital- biomechanical view and explanation. *Bone* 20, 183-189.
- Fukuda, Y., Teragawa, H., Matsuda, K., Yamagata, T., Matsuura, H., and Chayama, K. (2002). Tetrahydrobiopterin restores endothelial function of coronary arteries in patients with hypercholesterolaemia. *Heart* 87, 264-269.
- Fung, H. L. (1993). Clinical pharmacology of organic nitrates. *Am. J. Cardiol.* 72, 9C-13C.
- Garnero, P., and Delmas, P. D. (1997). Bone markers. *Baillieres. Clin. Rheumatol.* 11, 517-537.
- Garnero, P., Shih, W. J., Gineyts, E., Karpf, D. B., and Delmas, P. D. (1994). Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 1693-1700.
- Garnero, P., Tsouderos, Y., Marton, I., Pelissier, C., Varin, C., and Delmas, P. D. (1999). Effects of intranasal 17beta-estradiol on bone turnover and serum insulin-like growth factor I in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 2390-2397.
- Garton, M., Martin, J., New, S., Lee, S., Loveridge, N., Milne, J., Reid, D., Reid, I., and Robins, S. (1996). Bone mass and metabolism in women aged 45-55. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 44, 563-570.
- Gatti, D., Rossini, M., Zamberlan, N., Braga, V., Fracassi, E., and Adami, S. (1996). Effect of aging on trabecular and compact bone components of proximal and ultradistal radius. *Osteoporos. Int.* 6, 355-360.

- Genant, H. K., Engelke, K., Fuerst, T., Gluer, C. C., Grampp, S., Harris, S. T., Jergas, M., Lang, T., Lu, Y., Majumdar, S., Mathur, A., and Takada, M. (1996). Noninvasive assessment of bone mineral and structure: state of the art. *J. Bone Miner. Res.* 11, 707-730.
- Ghigo, E., Miola, C., Aimaretti, G., Valente, F., Procopio, M., Arvat, E., Yin Zhang, W., Camanni, F. (1992). Arginine abolishes the inhibitory effect of glucose on the growth hormone response to growth hormone-releasing hormone in man. *Metabolism* 41, 1000-1003
- Ghiron, L. J., Thompson, J. L., Holloway, L., Hintz, R. L., Butterfield, G. E., Hoffman, A. R., and Marcus, R. (1995). Effects of recombinant insulin-like growth factor-I and growth hormone on bone turnover in elderly women. *J. Bone Miner. Res.* 10, 1844-1852.
- Gotte, S. und Dittmar, K. (2001). Epidemiologie und Kosten der Osteoporose. *Orthopäde* 30, 402-404.
- Greenspan, S. L., Dresner-Pollak, R., Parker, R. A., London, D., and Ferguson, L. (1997). Diurnal variation of bone mineral turnover in elderly men and women. *Calcif. Tissue Int.* 60, 419-423.
- Groll, O., Lochmuller, E. M., Bachmeier, M., Willnecker, J., and Eckstein, F. (1999). Precision and intersite correlation of bone densitometry at the radius, tibia and femur with peripheral quantitative CT. *Skeletal Radiol.* 28, 696-702.
- Gundberg, C. M. (2000). Biochemical markers of bone formation. *Clin. Lab. Med.* 20, 489-501.
- Hanley, D. A., and Josse, R. G. (1996). Prevention and management of osteoporosis: consensus statements from the Scientific Advisory Board of the Osteoporosis Society of Canada. 1. Introduction. *CMAJ.* 155, 921-923.
- Hannon, R., and Eastell, R. (2000). Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos. Int.* 11 (Suppl. 6), S30-S44.
- Harper, A. E., and Yoshimura, N. N. (1993). Protein quality, amino acid balance, utilization, and evaluation of diets containing amino acids as therapeutic agents. *Nutrition* 9, 460-469.
- Harris, S. T., Gertz, B. J., Genant, H. K., Eyre, D. R., Survill, T. T., Ventura, J. N., DeBrock, J., Ricerca, E., and Chesnut, C. H., III (1993). The effect of short term treatment with alendronate on vertebral density and biochemical markers of bone remodeling in early postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76, 1399-1406.

- Hassager, C., Jensen, L. T., Johansen, J. S., Riis, B. J., Melkko, J., Podenphant, J., Risteli, L., Christiansen, C., and Risteli, J. (1991). The carboxy-terminal propeptide of type I procollagen in serum as a marker of bone formation: the effect of nandrolone decanoate and female sex hormones. *Metabolism* 40, 205-208.
- Hassager, C., Risteli, J., Risteli, L., and Christiansen, C. (1994). Effect of the menopause and hormone replacement therapy on the carboxy-terminal pyridinoline cross-linked telopeptide of type I collagen. *Osteoporos. Int.* 4, 349-352.
- Heaney, R. P., Abrams, S., Dawson-Hughes, B., Looker, A., Marcus, R., Matkovic, V., and Weaver, C. (2000). Peak bone mass. *Osteoporos. Int.* 11, 985-1009.
- Heaney, R. P., and Recker, R. R. (1982). Effects of nitrogen, phosphorus, and caffeine on calcium balance in women. *J. Lab. Clin. Med.* 99, 46-55.
- Heaney, R. R. (1994). Nutrient interactions and the calcium requirement [editorial]. *J. Lab. Clin. Med.* 124, 15-16.
- Heer, M., Kamps, N., Biener, C., Korr, C., Boerger, A., Zittermann, A., Stehle, P., and Drummer, C. (1999). Calcium metabolism in microgravity. *Eur. J. Med. Res.* 4, 357-360.
- Heinonen, A., Sievanen, H., Kyrolainen, H., Perttunen, J., and Kannus, P. (2001). Mineral mass, size, and estimated mechanical strength of triple jumpers' lower limb. *Bone* 29, 279-285.
- Heinrich, C. H., Going, S. B., Pamentier, R. W., Perry, C. D., Boyden, T. W., and Lohman, T. G. (1990). Bone mineral content of cyclically menstruating female resistance and endurance trained athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* 22, 558-563.
- Heinzel, B., John, M., Klatt, P., Bohme, E., and Mayer, B. (1992). Ca^{2+} /calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem. J.* 281 (Pt 3), 627-630.
- Helfrich, M. H., Evans, D. E., Grabowski, P. S., Pollock, J. S., Ohshima, H., and Ralston, S. H. (1997). Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *J. Bone Miner. Res.* 12, 1108-1115.
- Higashi, Y., Sasaki, S., Nakagawa, K., Fukuda, Y., Matsuura, H., Oshima, T., and Chayama, K. (2002). Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals. *Am. J. Hypertens.* 15, 326-332.

- Hodsman, A. B., Hanley, D. A., Watson, P. H., and Fraher, L. J. (2002). Parathyroid Hormone. In: Principles of Bone Biology (Bilezikian J. P. , Raisz L. G., and Rodan G. A.) pp. 1305-1324. Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo.
- Hong, H. J., Hsiao, G., Cheng, T. H., and Yen, M. H. (2001). Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 38, 1044-1048.
- Honicka, M., and Gerzer, R. (1997). Lösliche Guanylylzyklasen - Schlüsselenzyme zum therapeutischen Einsatz des Prinzips NO. *Internist (Berl.)* 38, 427-437.
- Hurson, M., Regan, M., Kirk, S., Wasserkrug, H., and Barbul, A. (1995). Metabolic effects of arginine in a healthy elderly population. *JPEN. J. Parenter. Enteral. Nutr.* 19, 227-230.
- Isgaard, J., Carlsson, L., Isaksson, O. G., and Jansson, J. O. (1988). Pulsatile intravenous growth hormone (GH) infusion to hypophysectomized rats increases insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid in skeletal tissues more effectively than continuous GH infusion. *Endocrinology* 123, 2605-2610.
- Isidori, A., Lo, M. A., and Cappa, M. (1981). A study of growth hormone release in man after oral administration of amino acids. *Curr. Med. Res. Opin.* 7, 475-481.
- Ito, M., Tsurusaki, K., and Hayashi, K. (1997). Peripheral QCT for the diagnosis of osteoporosis. *Osteoporos. Int.* 7 (Suppl. 3), S120-S127.
- Jamal, S. A., Browner, W. S., Bauer, D. C., and Cummings, S. R. (1998). Intermittent use of nitrates increases bone mineral density: the study of osteoporotic fractures. *J. Bone Miner. Res.* 13, 1755-1759.
- Jungersten, L., Ambring, A., Wall, B., and Wennmalm, A. (1997). Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. *J. Appl. Physiol.* 82, 760-764.
- Kamps, N., Mika, C., Boese, A., and Heer, M. (2001). 24 hours of immobilization increases bone resorption as shown by bone resorption markers. *J. Bone Miner. Res.* 16 (Suppl. 1), S483.
- Kaufman, S. (1993). New tetrahydrobiopterin-dependent systems. *Annu. Rev. Nutr.* 13, 261-286.
- Kerr, D., Morton, A., Dick, I., and Prince, R. (1996). Exercise effects on bone mass in postmenopausal women are site-specific and load-dependent. *J. Bone Miner. Res.* 11, 218-225.

- Kerstetter, J. E., O'Brien, K., and Insogna, K. (2001). Dietary protein and intestinal calcium absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 990-992.
- Kharitonov, S. A., Lubec, G., Lubec, B., Hjelm, M., and Barnes, P. J. (1995). L-arginine increases exhaled nitric oxide in normal human subjects. *Clin. Sci. (Colch.)* 88, 135-139.
- Kim, J. G., Shin, C. S., Choi, Y. M., Moon, S. Y., Kim, S. Y., and Lee, J. Y. (1999). The relationship among circulating insulin-like growth factor components, biochemical markers of bone turnover and bone mineral density in postmenopausal women under the age of 60. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 51, 301-307.
- Kirk, S. J., Hurson, M., Regan, M. C., Holt, D. R., Wasserkrug, H. L., and Barbul, A. (1993). Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings. *Surgery* 114, 155-159.
- Klein-Nulend, J., Helfrich, M. H., Sterck, J. G., MacPherson, H., Joldersma, M., Ralston, S. H., Semeins, C. M., and Burger, E. H. (1998). Nitric oxide response to shear stress by human bone cell cultures is endothelial nitric oxide synthase dependent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 108-114.
- Klein-Nulend, J., van der Plas, A., Semeins, C. M., Ajubi, N. E., Frangos, J. A., Nijweide, P. J., and Burger, E. H. (1995). Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB J.* 9, 441-445.
- Koppeschaar, H. P., ten Horn, C. D., Thijssen, J. H., Page, M. D., Dieguez, C., and Scanlon, M. F. (1992). Differential effects of arginine on growth hormone releasing hormone and insulin induced growth hormone secretion. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 36, 487-490.
- Laidlaw, S. A., and Kopple, J. D. (1987). Newer concepts of the indispensable amino acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 46, 593-605.
- Lau, E. M., and Woo, J. (1998). Nutrition and osteoporosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 10, 368-372.
- Lee, A. J., Hodges, S., and Eastell, R. (2000). Measurement of osteocalcin. *Ann. Clin. Biochem.* 37 (Pt 4), 432-446.
- Lowe, D. T. (1998). Comment on recent symposium overview: does excess dietary protein adversely affect bone. *J. Nutr.* 128, 2529.
- Lowik, C. W., Nibbering, P. H., van de Ruit, M., and Papapoulos, S. E. (1994). Inducible production of nitric oxide in osteoblast-like cells and in fetal mouse bone explants is associated with suppression of osteoclastic bone resorption. *J. Clin. Invest.* 93, 1465-1472.

- Luiking, Y. C., Weusten, B. L., Portincasa, P., Van der Meer, R., Smout, A. J., and Akkermans, L. M. (1998). Effects of long-term oral L-arginine on esophageal motility and gallbladder dynamics in healthy humans. *Am. J. Physiol.* 274, G984-G991.
- Marcus, R. (1997). Skeletal effects of growth hormone and IGF-I in adults. *Horm. Res.* 48 (Suppl 5), 60-64.
- Marks, S. C., and Odgren, P. R. (2002). Structure and Development of the Skeleton. In *Principles of Bone Biologie* (J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, and G. A. Rodan), pp. 3-15. Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo.
- Martin, R. B. (1991). Determinants of the mechanical properties of bones. *J. Biomech.* 24 Suppl 1, 79-88.
- Maxwell, A. J., Ho, H. V., Le, C. Q., Lin, P. S., Bernstein, D., and Cooke, J. P. (2001). L-arginine enhances aerobic exercise capacity in association with augmented nitric oxide production. *J. Appl. Physiol.* 90, 933-938.
- Merimee, T. J., Lillicrap, D. A., and Rabinowitz, D. (1965). Effect of arginine on serum-levels of human growth-hormone. *Lancet* 2, 668-670.
- Mocchegiani, E., Cacciatore, L., Talarico, M., Lingetti, M., and Fabris, N. (1990). Recovery of low thymic hormone levels in cancer patients by lysine- arginine combination. *Int. J. Immunopharmacol.* 12, 365-371.
- Moncada, S., and Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329, 2002-2012.
- Munoz-Torres, M., Mezquita-Raya, P., Lopez-Rodriguez, F., Torres-Vela, E., de Dios, L. J., and Escobar-Jimenez, F. (2001). The contribution of IGF-I to skeletal integrity in postmenopausal women. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 55, 759-766.
- Nijweide, P. J., Burger, E. H., and Klein-Nulend, J. (2002). The Osteocyte. In *Principles of Bone Biology* (Bilezikian J.P., Raisz L.G., and Rodan G.A.), pp. 93-107. Academic Press, San Diego, San Fransisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo.
- Nygren, A. T., and Kaijser, L. (2002). Water exchange induced by unilateral exercise in active and inactive skeletal muscles. *J. Appl. Physiol.* 93, 1716-1722.
- Otsuka, E., Hirano, K., Matsushita, S., Inoue, A., Hirose, S., Yamaguchi, A., and Hagiwara, H. (1998). Effects of nitric oxide from exogenous nitric oxide donors on osteoblastic metabolism. *Eur. J. Pharmacol.* 349, 345-350.

- Palmer, R. M., Ashton, D. S., and Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664-666.
- Parfitt, A. M., Simon, L. S., Villanueva, A. R., and Krane, S. M. (1987). Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with Iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J. Bone Miner. Res.* 2, 427-436.
- Parker, J. O. (1993). Nitrates and angina pectoris. *Am. J. Cardiol.* 72, 3C-6C.
- Payne, R. B., Carver, M. E., and Morgan, D. B. (1979). Interpretation of serum total calcium: effects of adjustment for albumin concentration on frequency of abnormal values and on detection of change in the individual. *J. Clin. Pathol.* 32, 56-60.
- Peters, H., Border, W. A., Noble, N. A. (1999). From rats to man: a perspective on dietary L-arginine supplementation in human renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 14, 1640-1650.
- Pitsillides, A. A., Rawlinson, S. C., Suswillo, R. F., Bourrin, S., Zaman, G., and Lanyon, L. E. (1995). Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re)modeling? *FASEB J.* 9, 1614-1622.
- Poiraudreau, S., Roux, C., De Ceuninck, F., Tsagris, L., Borderie, D., Cherruau, B., Dumontier, M. F., and Corvol, M. (1997). Circulating insulin-like growth factor system changes in women with acute estrogen deficiency induced by GnRH agonist. *Osteoporos. Int.* 7, 463-470.
- Pollaehne, W., and Minne, H. W. (2001). Epidemiologie, Diagnostik und klinisches Bild der Osteoporose. *Bundesgesundheitsblatt* 44, 32-36.
- Preli, R. B., Klein, K. P., and Herrington, D. M. (2002). Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. *Atherosclerosis* 162, 1-15.
- Prince, R., Devine, A., Dick, I., Criddle, A., Kerr, D., Kent, N., Price, R., and Randell, A. (1995). The effects of calcium supplementation (milk powder or tablets) and exercise on bone density in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* 10, 1068-1075.
- Ralston, S. H. (1997). The Michael Mason Prize Essay 1997. Nitric oxide and bone: what a gas! *Br. J. Rheumatol.* 36, 831-838.
- Ralston, S. H., Ho, L. P., Helfrich, M. H., Grabowski, P. S., Johnston, P. W., and Benjamin, N. (1995). Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* 10, 1040-1049.

- Ravn, P., Overgaard, K., Spencer, E. M., and Christiansen, C. (1995). Insulin-like growth factors I and II in healthy women with and without established osteoporosis. *Eur. J. Endocrinol.* 132, 313-319.
- Rees, D. D., Palmer, R. M., Schulz, R., Hodson, H. F., Moncada, S. (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br.J. Pharmacol.* 101, 746-752.
- Ricci, T. A., Heymsfield, S. B., Pierson, R. N., Jr., Stahl, T., Chowdhury, H. A., and Shapses, S. A. (2001). Moderate energy restriction increases bone resorption in obese postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 347-352.
- Rizzoli, R., and Bonjour, J. P. (1999). Determinants of peak bone mass and mechanisms of bone loss. *Osteoporos. Int.* 9 (Suppl 2), S17-S23.
- Rizzoli, R., Bonjour, J. P., and Ferrari, S. L. (2001). Osteoporosis, genetics and hormones. *J. Mol. Endocrinol.* 26, 79-94.
- Robbins, R. A., Springall, D. R., Warren, J. B., Kwon, O. J., Buttery, L. D., Wilson, A. J., Adcock, I. M., Riveros-Moreno, V., Moncada, S., Polak, J. (1994). Inducible nitric oxide synthase is increased in murine lung epithelial cells by cytokine stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 835-843.
- Rosen, C. J., Chesnut, C. H., III, and Mallinak, N. J. (1997). The predictive value of biochemical markers of bone turnover for bone mineral density in early postmenopausal women treated with hormone replacement or calcium supplementation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 1904-1910.
- Rosen, H. N., Moses, A. C., Garber, J., Iloputaife, I. D., Ross, D. S., Lee, S. L., and Greenspan, S. L. (2000). Serum CTX: a new marker of bone resorption that shows treatment effect more often than other markers because of low coefficient of variability and large changes with bisphosphonate therapy. *Calcif. Tissue Int.* 66, 100-103.
- Rosselli, M., Imthurn, B., Keller, P. J., Jackson, E. K., and Dubey, R. K. (1995). Circulating nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 beta-estradiol and norethisterone acetate. A two-year follow-up study. *Hypertension* 25, 848-853.
- Schacht, E. (2000). Osteoporosis in rheumatoid arthritis--significance of alfacalcidol in prevention and therapy. *Z. Rheumatol.* 59 (Suppl 1), 10-20.
- Scheld, K., Zittermann, A., Heer, M., Herzog, B., Mika, C., Drummer, C., and Stehle, P. (2001). Nitrogen metabolism and bone metabolism markers in healthy adults during 16 weeks of bed rest. *Clin. Chem.* 47, 1688-1695.
- Schiessl, H., Frost, H. M., and Jee, W. S. (1998). Estrogen and bone-muscle strength and mass relationships. *Bone* 22, 1-6.

- Schmolke, B. (2001). Labordiagnose der Osteoporose. *Orthopäde* 30, 425-436.
- Schoenau, E., Neu, C. M., Beck, B., Manz, F., and Rauch, F. (2002). Bone mineral content per muscle cross-sectional area as an index of the functional muscle-bone unit. *J. Bone Miner. Res.* 17, 1095-1101.
- Seibel, M. J., Eastell, R., Gundberg, C. M., Hannon, R., and Pols, H. A. (2002). Biochemical Markers of Bone Metabolism. In: *Principles of Bone Biology* (Bilezikian J.P., Raisz L.G., and Rodan G.A.), pp. 1543-1571. Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokio.
- Seibel, M. J., Woitge H.W., and Ziegler R. (1993). Chemische Marker des Knochenstoffwechsels: Grundlagen. *Klinisches Labor* 39, 717-727.
- Setoguchi, S., Hirooka, Y., Eshima, K., Shimokawa, H., and Takeshita, A. (2002). Tetrahydrobiopterin improves impaired endothelium-dependent forearm vasodilation in patients with heart failure. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 39, 363-368.
- Sievanen, H., Koskue, V., Rauhio, A., Kannus, P., Heinonen, A., and Vuori, I. (1998). Peripheral quantitative computed tomography in human long bones: evaluation of in vitro and in vivo precision. *J. Bone Miner. Res.* 13, 871-882.
- Spadaro, J. A., Werner, F. W., Brenner, R. A., Fortino, M. D., Fay, L. A., and Edwards, W. T. (1994). Cortical and trabecular bone contribute strength to the osteopenic distal radius. *J. Orthop. Res.* 12, 211-218.
- Stepan, J. J. (2000). Prediction of bone loss in postmenopausal women. *Osteoporos. Int.* 11 (Suppl 6), S45-S54.
- Stryer, L. (1996). Der Aminosäureabbau und der Harnstoffzyklus. In: *Biochemie*. 4. Auflage, pp. 663-686. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Sugimoto, T., Nakaoka, D., Nasu, M., Kanzawa, M., Sugishita, T., and Chihara, K. (1999). Effect of recombinant human growth hormone in elderly osteoporotic women. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 51, 715-724.
- Suzuki, H., Ikenaga, H., Hishikawa, K., Nakaki, T., Kato, R., and Saruta, T. (1992). Increases in NO₂-/NO₃- excretion in the urine as an indicator of the release of endothelium-derived relaxing factor during elevation of blood pressure. *Clin. Sci. (Lond)* 82, 631-634.
- SYSTAT 10. (2000). Computer Programm. Chicago, IL, SPSS Incorporation.
- Taaffe, D. R., Robinson, T. L., Snow, C. M., and Marcus, R. (1997). High-impact exercise promotes bone gain in well-trained female athletes. *J. Bone Miner. Res.* 12, 255-260.

- Talbott, S. M., and Shapses, S. A. (1998). Fasting and energy intake influence bone turnover in lightweight male rowers. *Int. J. Sport Nutr.* 8, 377-387.
- Tangphao, O., Grossmann, M., Chalon, S., Hoffman, B. B., and Blaschke, T. F. (1999). Pharmacokinetics of intravenous and oral L-arginine in normal volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 47, 261-266.
- Turner, C. H., Takano, Y., Owan, I., and Murrell, G. A. (1996). Nitric oxide inhibitor L-NAME suppresses mechanically induced bone formation in rats. *Am. J. Physiol.* 270, E634-E639.
- Uematsu, M., Ohara, Y., Navas, J. P., Nishida, K., Murphy, T. J., Alexander, R. W., Nerem, R. M., and Harrison, D. G. (1995). Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am. J. Physiol.* 269, C1371-C1378.
- Uusi-Rasi, K., Sievanen, H., Pasanen, M., Oja, P., and Vuori, I. (2002). Associations of calcium intake and physical activity with bone density and size in premenopausal and postmenopausal women: a peripheral quantitative computed tomography study. *J. Bone Miner. Res.* 17, 544-552.
- van't Hof, R. J., and Ralston, S. H. (2001). Nitric oxide and bone. *Immunology* 103, 255-261.
- Vestergaard, P., Hermann, A. P., Orskov, H., and Mosekilde, L. (1999). Effect of sex hormone replacement on the insulin-like growth factor system and bone mineral: a cross-sectional and longitudinal study in 595 perimenopausal women participating in the Danish Osteoporosis Prevention Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 2286-2290.
- Visek, W. J. (1985). Arginine and disease states. *J. Nutr.* 115, 532-541.
- Visek, W. J. (1986). Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation. *J. Nutr.* 116, 36-46.
- Visser, J. J., and Hoekman, K. (1994). Arginine supplementation in the prevention and treatment of osteoporosis. *Med. Hypotheses* 43, 339-342.
- Weiner, C. P., Lizasoain, I., Baylis, S. A., Knowles, R. G., Charles, I. G., and Moncada, S. (1994). Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5212-5216.
- Wheeler, M. A., Smith, S. D., Saito, N., Foster, H. E., Jr., and Weiss, R. M. (1997). Effect of long-term oral L-arginine on the nitric oxide synthase pathway in the urine from patients with interstitial cystitis. *J. Urol.* 158, 2045-2050.

- Wimalawansa, S., Chapa, T., Fang, L., Yallampalli, C., and Simmons, D. (2000). Frequency-dependent effect of nitric oxide donor nitroglycerin on bone. *J. Bone Miner. Res.* 15, 1119-1125.
- Wimalawansa, S. J. (2000a). Nitroglycerin therapy is as efficacious as standard estrogen replacement therapy (Premarin) in prevention of oophorectomy-induced bone loss: a human pilot clinical study. *J. Bone Miner. Res.* 15, 2240-2244.
- Wimalawansa, S. J. (2000b). Restoration of Ovariectomy-Induced Osteopenia by Nitroglycerin. *Calcif. Tissue Int.* 66, 56-60.
- Wimalawansa, S. J., De Marco, G., Gangula, P., and Yallampalli, C. (1996). Nitric oxide donor alleviates ovariectomy-induced bone loss. *Bone* 18, 301-304.
- Winkler A (1995). Kurzmethode zur Charakterisierung des Ernährungsmusters: Einsatz und Auswertung eines Food-Frequency-Fragebogens. *Ernährungs-Umschau* 42, 289-291.
- Woitge, H. W., Seibel, M. J., and Ziegler, R. (1996). Comparison of total and bone-specific alkaline phosphatase in patients with nonskeletal disorder or metabolic bone diseases. *Clin. Chem.* 42, 1796-1804.
- Wu, G., Meininger, C. J. (2000). Arginine nutrition and cardiovascular function. *J. Nutr.* 130, 2626-2629.
- Zaman, G., Pitsillides, A. A., Rawlinson, S. C., Suswillo, R. F., Mosley, J. R., Cheng, M. Z., Platts, L. A., Hukkanen, M., Polak, J. M., and Lanyon, L. E. (1999). Mechanical strain stimulates nitric oxide production by rapid activation of endothelial nitric oxide synthase in osteocytes. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1123-1131.
- Ziegler, R. (2001). Pathophysiologie der Osteoporose. In: *Osteoporose - Krankheitsbild und therapeutische Möglichkeiten* (W. Schulz, and H. J. Deuber), pp. 13-25. Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen.
- Zittermann, A. (1997). Pathogenese und Prävention der postmenopausalen Osteoporose. *Ernährungs-Umschau* 44, 10-13.
- Zittermann, A., Scheld, K., and Stehle, P. (1998). Seasonal variations in vitamin D status and calcium absorption do not influence bone turnover in young women. *Eur. J. Clin. Nutr.* 52, 501-506.

8 Anhang

8.1 Fragebogen zur Erfassung der NO-Donoreinnahme bei Osteoporose-Patientinnen

Hatten/Haben Sie Probleme mit dem Herzen? (Bitte antworten Sie mit Ja, auch wenn die Erkrankung schon längere Zeit zurückliegt) Ja Nein

Nehmen/Nahmen Sie Herzmedikamente ein? Ja Nein

Befindet sich eines der im Folgenden genannten Medikamente darunter?

Nitroglycerin retard-ratiopharm	Ja	Nein
Nitrokapseln ratiopharm	Ja	Nein
Nitrolingual	Ja	Nein
Corangin	Ja	Nein
Elantan	Ja	Nein
IS-5-mono-ratiopharm	Ja	Nein
ISDN Stada retard	Ja	Nein
Ismo 20 retard	Ja	Nein
Isoket	Ja	Nein
Deponit	Ja	Nein
Nitroderm	Ja	Nein
Nitro-Pflaster-ratiopharm	Ja	Nein
Beta-isoket retard	Ja	Nein
Corvaton	Ja	Nein
Corangin	Ja	Nein

Wie lange nehmen Sie schon die oben aufgeführten Medikamente? (bzw. falls die Behandlung abgeschlossen ist: Wie lange nahmen Sie die Medikamente und wann wurde die Behandlung abgeschlossen?)

Nehmen Sie noch andere Medikamente ein? (Bitte führen Sie hier auch Medikamente auf, die nicht aufgrund einer Herzerkrankung eingenommen wurden)

8.2 Diätetischer Fragebogen

Ernährungsplan

Name: _____ Woche vom: _____ bis zum: _____

Geben Sie bitte in den untenstehenden Plan die Häufigkeit ein mit der Sie die aufgeführten Lebensmittel pro Woche verzehren. Wenn Sie z.B. 3 mal in der Woche zum Frühstück jeweils 2 Tassen Bohnenkaffee trinken einfach 6. Für Lebensmittel die nicht in den Mahlzeiten enthalten sein sollten, versuchen Sie bitte ähnliche Lebensmittel einzusetzen. Evtl. findet sich auch in einer anderen Mahlzeit das fehlende Lebensmittel.

Frühstück

	Anzahl		Anzahl
Bohnenkaffee (1 Tasse 150 ml)		Tee (1 Tasse 125 ml)	
Zucker (5 g , 1 Würfel)		Kondensmilch (15 g)	
Vollmilch, mind. 3,5% (1 Glas 150 ml),		Kakao (150 ml Milch + 2 TL Kakaopulver = 2 g)	
fettarme Milch, 1,5 % Fett (1 Glas 150 ml)		Orangensaft (1 Glas 200 ml)	
Vollkornbrot / Schwarzbrot (1 Scheibe, 50 g)		Graubrot/Mischbrot (1 Scheibe, 45 g)	
Toast/Weißbrot (1 Scheibe, 30 g)		Knäckebrot (1 Scheibe, 10 g)	
Tagesbrötchen (1 Brötchen, 45 g)		Zwieback (1 Scheibe, 10 g)	
Croissant (1 Stück)		Mehrkornbrötchen (1 Brötchen, 60 g)	
Margarine (20 g, ca. 1 EL)		Butter (20 g, ca. 1 EL)	
kalorienreduzierte Margarine (20 g, ca. 1 EL)			
Honig (20 g, ca. 1 EL), Marmelade		Wurstaufschnitt (30 g, 1 Scheibe)	
Nuß-Nougat-Creme (20 g, 1 EL)		Hartwurst, Salami (30 g, 1 Scheibe)	
		Streichwurst, Teewurst (30 g, 1 EL)	
Schnittkäse (30 g, 1 Scheibe)		Frischkäse (30 g, 1 EL)	
Weichkäse (z.B. Camembert) (30 g)		Hüttenkäse (30 g, 1 EL)	
Schmelzkäse (30 g, 1 EL)		Mozarella-Käse / Feta-Käse (150 g)	
Quark (30 g, 1 EL)		Frühstücksei (1 Ei, 60 g)	
Müsli (50 g)		Cornflakes (30 g) bei 1 EL=10 g	
Haferflocken (60 g)		Trockenfrüchte (25 g)	
Nüsse/Mandeln (10 g, 2 TL)		Buchweizen (60 g)	

Mittagessen

	Anzahl		Anzahl
Suppe			
Rindfleisch (150 g)		Hammel / Lamm (125 g)	
Schweinefleisch / Kassler (150 g)		Wild (150 g)	
Geflügel (150 g)		Bratwurst (150 g)	
Fleischkäse (125 g)		Würstchen/Brühwurst/Mettwurst (115 g)	
Leber (125 g)		Schellfisch, Scholle, Seehecht, Seezunge	
Kalbfleisch (150 g)		Barsch, Hecht, Karpfen (150 g)	
		Forelle, Bückling, Aal (150 g)	
		Hering, Makrele (150 g)	
Salzkartoffeln (200 g)		Reis (180 g)	
Pommes frites / Kroketten (150 g)		Eiernudeln, Spätzle (125 g)	
Kartoffelknödel / Semmelknödel (100g)		Kartoffelpüree (200g)	
Blattgemüse (z.B. Spinat) (150 g)		Blumenkohl / Broccoli (150 g)	
Blattkohl (Weißkohl, Rotkohl, Wirsing)(150 g)		Möhren, Paprika, Tomaten (150 g)	
Knollengemüse (Sellerie, Kohlrabi) (150 g)		Grünkohl (150 g)	
Hülsenfrüchte gegart (z.B.Erbesen) (150 g)		Lauch, Porree (100 g)	
Blattsalat, Feldsalat (50 g)		Speisemais (150 g)	
Fruchtgemüse (z.B. Gurke, Zucchini) (150 g)		Linsen (150 g)	
Rosenkohl (150 g)		Bratensosse (50 ml)	
Champignons/Pilze (100 g)		Bohnen (150 g)	
Bechamelsosse (200 ml)		Zubereitungsfett (20 g)	
Oel (Olivenoel, Disteloel...)		Sahne / Creme fraiche (1 EL=15 ml)	
Senf (1 TL)		Ketchup (1 EL)	
Putting (125 g)		Joghurt 3,5 % Fett (1 Becher, 150 g)	
Obstsalat (125 g)		Eis (1 Kugel = 30 g)	

Name: _____

Woche vom: _____ bis zum: _____

Abendessen

	Anzahl		Anzahl
Vollkornbrot/Schwarzbrot (50 g, 1 Scheibe)		Graubrot/Mischbrot (1 Scheibe, 45 g)	
Toast/Weißbrot (1 Scheibe, 30 g)		Knäckebrot (1 Scheibe, 10 g)	
Brötchen (1 Brötchen, 45 g)		Zwieback (1 Scheibe, 15 g)	
Mehrkornbrötchen (1 Brötchen, 60 g)			
Butter (20 g, ca. 1 EL)		Margarine (20 g, ca. 1 EL)	
kalorienreduzierte Margarine (20 g, ca. 1 EL)			
Honig (20 g, ca. 1 EL)		Wurstaufschnitt (30 g, 1 Scheibe)	
Marmelade (25 g)		Hartwurst Salami (30 g)	
Streichwurst (30 g, 1 EL)		Weichkäse (z.B. Camembert) (30 g)	
Emmentaler, Gouda, Gruyere (30 g, 1 Scheibe)		Friskkäse (30 g)	
Schmelzkäse (30 g)		Hüttenkäse (30 g)	
Quark (30 g, 1 EL)		Mozarella-Käse / Feta-Käse (30 g)	
Hühnerei (60 g)		Fischkonserve (150 g)	

Zwischendurch

	Anzahl		Anzahl
Bohnenkaffee (1 Tasse 150 ml)		Apfel-, Orangen-, Multivitaminsaft (200 ml)	
Schwarztee (125 ml)		Limonade/ Cola (200 ml)	
Tee (Früchte, Pfefferminz 125 ml)		Malzbier (250 ml)	
Kondensmilch (15 g)		alkoholfreies Bier (330 ml = halbe Flasche)	
Zucker (1 Würfel, 5 g)		Tomaten-, Möhren-, Gemüsesaft (150 ml)	
Trinkmilch 3,5 % (1 Glas 150 ml)		Weißwein, Rotwein (130 ml)	
Buttermilch (150 ml)		Schaumwein, Sekt (100 ml)	
Dickmilch (150 ml)		Bier (250 ml = halbe Flasche)	
Leitungswasser (200 ml)		Liköre, Branntwein, Cognac (20 ml)	
Mineralwasser (200 ml)		bitte geben Sie an, welches Mineralwasser Sie trinken.....	
Apfel (Stk.=125 g), Birne (Stk.=140 g)		Feigen, getrocknet (25 g)	
Banane (1 Stück = 100 g)		Kirschen (120 g, ca. 20 Kirschen)	
Orange, Mandarine, Zitrone (100 g)		Erdbeeren (250 g)	
Pflaumen (125 g)		Ananas (125 g) bei 1 EL= 25 g	
Weintrauben (125 g)		Kiwis (Stk.= 45 g)	
Mango (Stk.= 125 g)		Grapefruit (Stk.= 250 g)	
Pfirsich, Aprikosen (Stk. = 115 g)		Rosinen (25 g) bei 1 EL = 15 g	
Melone (Wasser-, Honigmelone) (1250 g)			
Joghurt 1,5 % (150 g)		Joghurt mit/ohne Fruchtgeschmack(150 g)	
Joghurt 3,5 % (150 g)		Quark mit/ohne Fruchtgeschmack (150 g)	
Obstkuchen (150 g, 1 Stk.)		Kartoffelchips (25 g)	
Torten (120 g, 1 Stk.)		Salzgebäck (25 g)	
Trockenkuchen (50 g)		Erdnüsse (100 g)	
Schokolade (20 g)		Cashewnuß (60 g)	
Weingummi, Gummibärchen (15 g)		Kleingebäck, Kekse (50 g)	
Lakritze (50 g)		Haselnuss, Walnuss, Paranuß (60 g)	
Eis (2 Kugeln = 75 g)		Mandel (60 g)	
Bonbons 5g			
Sonnenblumenkerne (1 EL, 20 g)		Sesam (1 EL, 20 g)	

besondere Bemerkungen: _____

8.3 Aktivitätsprotokoll

Proband:**Datum:****Dauer und Art der sportlichen Aktivität****Wie oft haben Sie die folgenden sportlichen Aktivitäten_in den letzten 2 Monaten ausgeübt?**• **Radfahren** (auch Heimrad)

<input type="checkbox"/> ₁ (fast) jeden Tag	}	⇒⇒	Gesamtzeit pro <u>Woche</u> etwa:	<input type="text"/> <input type="text"/> Stunden	<input type="text"/> <input type="text"/> Minuten
<input type="checkbox"/> ₂ mehrmals pro Woche					
<input type="checkbox"/> ₃ einmal pro Woche					
<input type="checkbox"/> ₄ 1-3 mal pro Monat					
<input type="checkbox"/> ₅ seltener oder nie					

• **Gymnastik, Turnen, Aerobics, Tanzen, Yoga**

<input type="checkbox"/> ₁ (fast) jeden Tag	}	⇒⇒	Gesamtzeit pro <u>Woche</u> etwa:	<input type="text"/> <input type="text"/> Stunden	<input type="text"/> <input type="text"/> Minuten
<input type="checkbox"/> ₂ mehrmals pro Woche					
<input type="checkbox"/> ₃ einmal pro Woche					
<input type="checkbox"/> ₄ 1-3 mal pro Monat					
<input type="checkbox"/> ₅ seltener oder nie					

• **Ausdauersport** (Schwimmen, Dauerlauf, Jogging, Rudern, Trimmen usw.)

<input type="checkbox"/> ₁ (fast) jeden Tag	}	⇒⇒	Gesamtzeit pro <u>Woche</u> etwa:	<input type="text"/> <input type="text"/> Stunden	<input type="text"/> <input type="text"/> Minuten
<input type="checkbox"/> ₂ mehrmals pro Woche					
<input type="checkbox"/> ₃ einmal pro Woche					
<input type="checkbox"/> ₄ 1-3 mal pro Monat					
<input type="checkbox"/> ₅ seltener oder nie					

• **Kraftsport** (Bodybuilding, Krafttraining, Gewichtheben usw.)

<input type="checkbox"/> ₁ (fast) jeden Tag	}	⇒⇒	Gesamtzeit pro <u>Woche</u> etwa:	<input type="text"/> <input type="text"/> Stunden	<input type="text"/> <input type="text"/> Minuten
<input type="checkbox"/> ₂ mehrmals pro Woche					
<input type="checkbox"/> ₃ einmal pro Woche					
<input type="checkbox"/> ₄ 1-3 mal pro Monat					
<input type="checkbox"/> ₅ seltener oder nie					

• **Kampfsport** (Karate, Judo, Tae Kwon Do, Aikido, Kendo, Kickboxen, Boxen usw.)

<input type="checkbox"/> ₁ (fast) jeden Tag	}	⇒⇒	Gesamtzeit pro <u>Woche</u> etwa:	<input type="text"/> <input type="text"/> Stunden	<input type="text"/> <input type="text"/> Minuten
<input type="checkbox"/> ₂ mehrmals pro Woche					
<input type="checkbox"/> ₃ einmal pro Woche					
<input type="checkbox"/> ₄ 1-3 mal pro Monat					
<input type="checkbox"/> ₅ seltener oder nie					

• **Spilsport** (Fußball, Volleyball, Tennis, Handball, Basketball, Squash, Federball usw.)

<input type="checkbox"/> ₁ (fast) jeden Tag	}	⇒⇒	Gesamtzeit pro <u>Woche</u> etwa:	<input type="text"/> <input type="text"/> Stunden	<input type="text"/> <input type="text"/> Minuten
<input type="checkbox"/> ₂ mehrmals pro Woche					
<input type="checkbox"/> ₃ einmal pro Woche					
<input type="checkbox"/> ₄ 1-3 mal pro Monat					
<input type="checkbox"/> ₅ seltener oder nie					

• **Wandern, Spazierengehen**

<input type="checkbox"/> ₁ (fast) jeden Tag	}	⇒⇒	Gesamtzeit pro <u>Woche</u> etwa:	<input type="text"/> <input type="text"/> Stunden	<input type="text"/> <input type="text"/> Minuten
<input type="checkbox"/> ₂ mehrmals pro Woche					
<input type="checkbox"/> ₃ einmal pro Woche					
<input type="checkbox"/> ₄ 1-3 mal pro Monat					
<input type="checkbox"/> ₅ seltener oder nie					

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, all denen meinen Dank auszusprechen, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Brigitte Schmitz für die Überlassung des Themas und die ständige Bereitschaft mich zu unterstützen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Rupert Gerzer, an dessen Institut ich die Arbeit anfertigen durfte, für seine Unterstützung und die Möglichkeit diese Studie durchzuführen.

Herrn PD Dr. Armin Zittermann möchte ich für die Durchsicht der Arbeit danken. Seine konstruktive Kritik war eine wertvolle Hilfe bei der Fertigstellung dieser wissenschaftlichen Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Martina Heer, die mir ihre Freude an der Wissenschaft weitervermitteln konnte, mir jederzeit tatkräftig zur Seite stand und sich Zeit für intensive, wissenschaftliche Diskussionen genommen hat.

Meinen Probandinnen danke ich für ihr großes Engagement und ihr Interesse an dieser Studie.

Bedanken möchte ich mich auch bei unserem Kooperationspartner Herrn Prof. Dr. Eckhard Schönau, Universitätsklinik Köln, für die Durchführung der pQCT-Messungen. Besonders sei an dieser Stelle Frau Bärbel Tutlewski für die tolle Zusammenarbeit gedankt.

Frau Nicole Heussen, Universität Aachen, danke ich für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Arbeit.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Ernährung und Knochenstoffwechsel“ und bei allen nicht namentlich erwähnten Institutsmitgliedern bedanke ich mich

herzlich für die freundschaftliche Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich Frau Gabriele Kraus und Frau Jette Müller für ihre Unterstützung im Labor und Herrn Guido Petrat für seine Hilfe bei allen computertechnischen Problemen.

Herzlichen Dank an Frau Iris Frings für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Der Graduiertenförderung des Landes Nordrhein-Westfalen und dem DLR danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinem Mann Marc und meinen Eltern, die mich während des gesamten Weges unterstützt haben. Ihr in mich gesetztes Vertrauen hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.