

Untersuchungen zu biochemischen Markern des Knochen- und Energiestoffwechsels am Osteoporose-induzierten Schafmodell

Judith Esther Langenstein



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin
Klinische Pathophysiologie und Klinische Laboratoriumsdiagnostik
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuerin: PD Dr. Natali Bettina Bauer

Untersuchungen zu biochemischen Markern des Knochen- und Energiestoffwechsels am Osteoporose-induzierten Schafmodell

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Judith Esther Langenstein

Tierärztin aus Geldern

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Berichterstatter: PD Dr. Natali Bauer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Sabine Wenisch

Tag der Disputation: 15.04.2016

Meinen Eltern

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Judith Langenstein

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 Physiologie des Knochenstoffwechsels	3
2.2 Osteoporose	20
2.2.1 Definition	20
2.2.2 Klinisch und sozial-ökonomische Bedeutung der Osteoporose	21
2.2.3 Risikofaktoren	22
2.2.4 Epidemiologie	24
2.2.5 Formen der Osteoporose	25
2.2.5.1 Typ-I-Osteoporose oder postmenopausale Osteoporose	26
2.2.5.2 Typ-II-Osteoporose oder senile Osteoporose	29
2.2.5.3 Idiopathische Osteoporose	30
2.2.5.4 Sekundäre Osteoporose	32
2.2.5.4.1 Glukokortikoid-induzierte Osteoporose	33
2.3 Interaktion zwischen Knochen- und Energiestoffwechsel	37
2.4 Diagnostik	41
2.4.1 Knochendichtemessung (Osteodensitometrie)	42
2.4.2 Basislabor	44
2.4.2.1 Elektrolyte	44
2.4.2.2 Calcium- und Phosphatbestimmung im Urin	46
2.4.2.3 Hormone	46
2.4.2.4 Marker des Knochenstoffwechsels	47
2.4.2.4.1 Marker der Knochenformation	51
2.4.2.4.2 Marker der Knochenresorption	54
2.4.2.4.3 Sonstige	58
2.4.2.5 Marker des Energiestoffwechsels	60
2.4.2.6 Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)	64
2.5 Das Schaf als Osteoporosemodell	66
3 MATERIAL UND METHODEN	72
3.1 Studiendesign	72
3.2 Induktion der Osteoporose:	76
3.2.1 Ovariectomie	76

Inhaltsverzeichnis

3.2.2	Fütterung	79
3.2.3	Glukokortikoidgabe	80
3.3	Knochendichtebestimmung (DXA).....	81
3.4	Probenentnahme für Laboruntersuchungen	83
3.5	Euthanasie	83
3.6	Laboruntersuchungen.....	84
3.6.1	Elektrolyte und Hormone	84
3.6.1.1	Calcium, Magnesium und Phosphat	84
3.6.1.2	fraktionierte Elektrolytausscheidung von Phosphat (FEP).....	85
3.6.1.3	Vitamin D (25-OH-Vitamin D)	87
3.6.1.4	Parathormon (PTH intakt).....	90
3.6.2	Marker der Knochenformation	93
3.6.2.1	Knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP)	93
3.6.2.2	Osteocalcin (intakt).....	95
3.6.3	Marker der Knochenresorption	97
3.6.3.1	N-terminales Telopeptid des Kollagen Typ I (NTX)	97
3.6.3.2	Cathepsin K.....	99
3.6.3.3	Dickkopf-1 (DKK-1).....	101
3.6.4	Marker des Energiestoffwechsels.....	103
3.6.4.1	Fructosamine.....	103
3.6.4.2	Insulin	104
3.6.4.3	Unveresterte Fettsäuren (NEFA).....	106
3.6.5	Wachstumshormone.....	107
3.6.5.1	Insulin-like growth factor (IGF-1, IGFBF-blockiert)	107
3.7	Präzisionsmessungen	109
3.8	Referenzbereiche	109
3.9	Statistische Auswertung	110
4	ERGEBNISSE	111
4.1	Schafe	111
4.1.1	Körpergewicht	111
4.2	Knochendichtebestimmung (DXA).....	112
4.3	Laboruntersuchungen 0, 3 und 8 Monate.....	116
4.3.1	Präzisionsmessungen	116
4.3.2	Referenzbereiche	117
4.3.3	Elektrolyte und fraktionierte Urinausscheidung Phosphat	120
4.3.4	Marker des Knochenstoffwechsels	122

Inhaltsverzeichnis

4.3.5	Marker des Energiestoffwechsels und IGF-1.....	126
5	DISKUSSION	129
5.1	Orientierende Referenzbereiche	129
5.2	Auswertung der DXA-Daten 0, 3, 8 Monate	130
5.3	Elektrolyte, Hormone und FEP 0, 3, 8 Monate	133
5.4	Marker des Knochenstoffwechsel 0, 3 und 8 Monate.....	136
5.5	Marker des Energiestoffwechsel 0, 3 und 8 Monate.....	139
5.6	Limitationen der Studie.....	143
5.7	Schlussfolgerung.....	147
6	ZUSAMMENFASSUNG	149
7	SUMMARY	153
8	LITERATURVERZEICHNIS	157
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	189
10	TABELLENVERZEICHNIS	190
11	ANHANG.....	191
12	DANKSAGUNG	196

Abkürzungsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
μ CT	Mikro-Computer Tomographie
μ l	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
ALS	Acid labile subunit (Säurelabile Untereinheit)
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
AP	Alkalische Phosphatase
BAP	Bone alkaline phosphatase (knochenspezifische alkalische Phosphatase)
BCE	Knochenkollagenäquivalent
BGP	Bone Gla-Protein
BMC	Bone mineral content (Knochendichte)
BMD	Bone mineral density (Knochenmineraldichte)
BMP	Bone morphogenic proteins
BMU	Basic multicellular unit
BSP	Bone Sialoprotein
Ca	Calcium
CaSr	Calcium sensing receptor (Calciumsensitiver Rezeptor)
CoA	Coenzym A
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
CRP	C-reaktives Protein
CTX	Carboxy-terminales Telopeptid von Typ I Kollagen
DKK	Dickkopf

Abkürzungsverzeichnis

DPD	Desoxypyridinoline
DVO	Dachverband Osteologie
DXA	Dual-energy x-ray absorptiometry
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzyme Immunoassay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Östrogenrezeptor
FDA	Food and Drug Administration
FEP	Fraktionierte Phosphat-Ausscheidung im Urin
FGF	Fibroblast growth factor (Fibroblastenwachstumsfaktor)
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
Fzd	Frizzled-Rezeptor Protein
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GH	Growth hormone
GHRH	Growth hormone releasing hormone
Gla	γ -Carboxyglutaminsäuren
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
h	Stunde
HbA _{1c}	Hämoglobin A _{1c}
HEDTA	N-(2-Hydroxyethyl) ethylendiamintetraacetat
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IBD	Inflammatory bowel disease
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär

Abkürzungsverzeichnis

InsR	Insulinrezeptor
Int1	Int1-Gen (durch Intergration eines Tumovirus aktiviertes Gen)
ISCD	International Society for Clinical Densitometry
kDa	kilo Dalton
L1- L4	1. – 4. Lendenwirbel
LDL	Low density lipoprotein
LRP	Lipoprotein receptor related protein
LWS	Lendenwirbelsäule
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
M	Molar
MAk	monoklonaler Antikörper
MMP	Matrix-Metalloproteasen
Mrd	Milliarden
N	Normale Lösung
NEFA	Non esterified fatty acids (unveresterte Fettsäuren)
NF- κ B	Nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer” of activated B cells
nM BCE	Nanomoles of bone collagen equivalent (Äquivalent für Knochenresorption)
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NTX	N-terminales Telopeptid von Typ I Kollagen
OC	Osteocalcin
ON	Osteonectin
OPG	Osteoprotegerin
PAk	polyklonaler Antikörper
PICP	C-terminales Propeptid des Typ I Prokollagen

Abkürzungsverzeichnis

PINP	N-terminales Propeptid des Typ I Prokollagen
pmol	Picomol
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormon-related protein
PYD	Pyridinoline
RANK	Receptor activator of NF- κ B
RANKL	Receptor activator of NF- κ B ligand
ROI	Region of Interest (Bereich von Interesse)
Sec	Sekunde
SERM	Selektive Östrogen Rezeptor Modulatoren
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAP	Tatrate resistant acid phosphatase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
UV	Ultraviolett
VDR	Calcitriol activated receptor (Vitamin D Rezeptor)
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
Wnt	Signaltransduktionsweg, zusammengesetzter Begriff aus „wingless- Gen“ und „Int-1 Gen“

1 EINLEITUNG

Die Osteoporose zählt zu den häufigsten Volkskrankheiten der Welt und betrifft vor allem ältere Menschen. Es handelt sich hierbei um eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine verminderte Knochendichte und veränderte Mikroarchitektur charakterisiert ist (WHO TECHNICAL REPORT SERIES 1994; DACHVERBAND OSTEOLOGIE e.V. 2014). Aus der daraus resultierenden Instabilität der Knochen ergibt sich eine erhöhte Frakturneigung, die neben einer starken Einschränkung der Lebensqualität der Betroffenen zu hohen wirtschaftlichen Kosten führt. Eine Problemstellung in der Behandlung von osteoporotischen Frakturen ist die eingeschränkte Heilungsfähigkeit des metabolisch erkrankten Knochens, so dass besondere Ansprüche an die verwendeten Materialien der Frakturversorgung gestellt werden. Für die Erforschung neuartiger Implantatmaterialien mit guter Biokompatibilität dienen im Vorfeld Tiermodelle, die den Verhältnissen beim Menschen weitgehend entsprechen müssen. Somit sind für die Etablierung und Qualitätssicherung eines Tiermodells vorerst Kenntnisse über Stoffwechselläufe und pathophysiologische Abläufe zu erwerben.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit biochemischen Markern des Knochen- und Energiestoffwechsels am Osteoporose-induzierten Schafmodell. „Knochenmarker“ sind biochemisch messbare Analyten (Enzyme, Proteine, Metaboliten), die während der Knochenformation- und resorption gebildet und freigesetzt werden oder andere Stoffwechselprozesse widerspiegeln (OBERMAYER-PIETSCH 2013). Infolgedessen können sie bezüglich Frakturprädiktion und Therapiemonitoring bei beispielweise antiresorptiven Therapien eingesetzt werden. Auch Marker des Energiemetabolismus sind ein weitverbreitetes diagnostisches Mittel beispielsweise zur Beurteilung von diabetogenen Stoffwechsellagen und dienen zudem der Therapiekontrolle.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Knochenstoffwechsellage am Osteoporose-induzierten Schafmodell durch biochemische Marker zu evaluieren und gleichzeitig einen möglichen Effekt auf den Energiestoffwechsel beim Schaf zu erfassen. Neben der Bestimmung von Serum- und Urinparametern liegt ein weiterer Schwerpunkt darin, die verwendeten Induktionsprotokolle bezüglich der Eignung für orthopädische Fragestellungen zu vergleichen. Als Goldstandardmethode zur Überprüfung einer

Einleitung

erfolgreichen Induktion der Osteoporose dient eine Knochendichtemessung mittels DXA (*dual-energy x-ray absorptiometry*).

Die Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit erfolgten im Rahmen des Sonderforschungsbereichs/Transregio 79 „Werkstoffe für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen“ Teilprojekt T1: Etablierung und Qualitätssicherung osteoporotischer Tiermodelle (2010 - 2014). Es handelt sich hierbei somit um eine präklinische Studie, die der weiteren Erforschung im Einsatz von Materialien am erkrankten Knochen dienen soll und ein geeignetes Schafmodell zu etablieren, welches eine essentielle Hilfestellung für die Entwicklung humaner Therapiemöglichkeiten darstellt. Zudem ist nach Kenntnis der Autoren die Interaktion zwischen Knochen- und Energiestoffwechsel beim Schaf weitgehend unbekannt.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Physiologie des Knochenstoffwechsels

Das Skelettsystem der Säugetiere ist ein hochspezialisiertes Binde- und Stützgewebe mit zahlreichen Aufgaben. Es dient der Bewegung, schützt innere Organe und beinhaltet das Knochenmark für die Hämatopoese. Ebenso agiert es als Reservoir für Wachstumsfaktoren und ist Hauptspeicher für lebenswichtige Elektrolyte wie Calcium und Phosphat. Neben diesem ist es gleichzeitig ein Regulator des Elektrolyt- und Energiehaushaltes sowie in Teilen des Säure- Basenhaushalts (KINI und NANDEESH 2012).

Grundsätzlich lässt sich der Knochen anhand seines makroskopischen Erscheinungsbildes in eine *Substantia compacta* und *Substantia spongiosa* unterteilen. Die *Substantia compacta* besteht aus drei Anteilen: dem äußeren Periost, der Grundeinheit, dem Osteon und dem inneren Endost. Das Periost überzieht Knochen und Gelenke und enthält Blutgefäße, Nervenfasern sowie spezialisierte Zellen wie Osteoblasten und Osteoklasten. Es ist wichtig für die Blutversorgung, das Wachstum, die Frakturheilung sowie für die muskuläre Kraftübertragung. Die innere Membran bezeichnet man als Endost. Es steht im engen Kontakt mit dem Knochenmark und dem trabekulären Knochen (*Substantia spongiosa*) (KÖNIG und LIEBICH 2014). Ihm wird eine höhere Umbauaktivität im Vergleich zum Periost zugerechnet, da es höheren biomechanischen Belastungen und höheren Zytokinexpositionen durch das in der Nähe gelegene Knochenmark ausgesetzt ist (CLARKE 2008). Auch diese Membran enthält Zellen wie Osteoklasten und Osteoblasten. Die Grundeinheit der *Substantia compacta* bilden kompakte Lamellen aus mineralisierten Fasern die jeweils um ein zentrales Gefäß angeordnet sind. Diese Einheit wird als Osteon oder auch als Havers-System bezeichnet. Die *Substantia spongiosa* ist dagegen als trabekuläres Netzwerk organisiert, welches ständig umgebaut und an die wechselnden Belastungen angepasst wird. Es durchzieht mit seinen netzartig angeordneten Lamellen auch Kompartimente des Knochenmarks.

Ein kortikaler Knochen zeigt in der Regel eine geringere metabolische Aktivität als ein trabekulärer Knochen. Dies ist jedoch speziesabhängig (CLARKE 2008). Das

Literaturübersicht

Verhältnis von kortikalem Knochen und trabekulärem Knochen ist je nach Knochentyp und Lokalisation unterschiedlich. So weisen beispielweise vertebrale Knochen ein Verhältnis kortikal zu trabekulär von 25:75 auf. Im Gegensatz dazu zeigt die Diaphyse des Radius beim Menschen ein Verhältnis von 95:5. Dies ist abhängig von den Druckverhältnissen, die auf den Knochen einwirken (CLARKE 2008).

Der Knochen selbst ist aus ca. 70% anorganischer Matrix (Mineralphase), ca. 25% organischer Matrix sowie ca. 5% Wasser zusammengesetzt. Hauptbestandteil der anorganischen Matrix ist bis zu ca. 99% das kristalline Hydroxylapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Es ist maßgeblich verantwortlich für die Stabilität und Festigkeit der Knochen. Somit ist der Knochen Hauptlager für die Elektrolyte Calcium und Phosphat. Geringe Mengen an Magnesium, Kalium und Carbonaten sind ebenfalls in die Matrix eingelagert (HALL und GUYTON 2010).

Die organische Komponente setzt sich dominierend aus Kollagenfasern Typ I (ca. 90%) zusammen. Diese verleihen dem Knochen die Zugfestigkeit. Kollagen Typ I ist ein Heterodimer aus drei Polypeptidketten (Tripelhelix) und wird von Osteoblasten gebildet. Man unterscheidet hier zwei identische $\alpha 1$ -Ketten sowie eine $\alpha 2$ -Kette aus unterschiedlicher Aminosäuresequenz, die zusammengefasst eine Fibrille bilden und das Grundgerüst für die organische Matrix darstellen (BRODSKY und PERSIKOV 2005). Weitere Bestandteile der organischen Matrix sind nicht-kollagene Proteine wie Osteocalcin, Proteoglykane und Gla-Proteine. Diese werden ebenfalls von Zellen wie Osteoblasten sezerniert und in die organische Matrix abgegeben.

Der Knochen besitzt neben der anorganischen und organischen Matrix hochspezialisierte Zellen: Osteoblasten für die Knochenformation und Osteoklasten für die Knochenresorption. Diese stellen im Knochen die Schlüsselrolle für die stetig ablaufenden Umbauprozesse dar.

Osteoblasten

Osteoblasten stammen von multipotenten mesenchymalen Stammzellen (Osteoprogenitorzellen) des Knochenmarks ab. Diese Stammzellen gelten auch als Vorläufer für Chondrozyten, Adipozyten und Myozyten (CAPLAN 1991; GIMBLE und NUTTALL 2012). Sie besitzen die Fähigkeit sich durch bestimmte Einflussfaktoren zu Pro-Osteoblasten zu entwickeln. Pro-Osteoblasten stellen die Vorläuferzellen von Osteoblasten dar. Eine wichtige Schlüsselrolle für die Differenzierung spielt hier der sogenannte Wnt/ β -Catenin Signalweg. Hierbei handelt es sich um eine Signaltransduktionskaskade verschiedener Lipid-modifizierter Glykoproteine zur Stimulation von Pro-Osteoblasten, Induktion der Osteoblastengnese sowie Inhibition von Osteoklasten und Osteozytenapoptose. Dieser Signalweg leistet einen wesentlichen Beitrag zur Steigerung der Knochendichte und ist somit wichtiger Gegenstand der Forschung in Bezug auf Erkrankungen, die mit einer Reduktion der Knochendichte einhergehen, v.a. der Osteoporose (GONCIULEA und BEUR 2015). Der Wnt/ β -Catenin Signalweg gehört zu den kanonischen Signalwegen. Hier initiiert die Bindung des Wnt- Liganden an einen Rezeptorkomplex bestehend aus *Frizzled*-Rezeptor Protein (Fzd) und *low density lipoprotein (LDL) receptor related protein 5/6* (LRP 5/6) eine Kaskade intrazellulärer Mechanismen, die in einer Transkriptionsaktivierung resultieren und somit zu einer Steigerung der Knochenformation führen (CLEVERS 2006; VORONKOV und KRAUSS 2013). Hauptantagonisten, die mit dem Wnt-Rezeptor interagieren, sind die Proteine Dickkopf-1 (DKK-1) und Sklerostin (MAO et al. 2002). Diese sind insbesondere aufgrund neuer Therapiestrategien in der Osteoporosetherapie hier kurz aufgeführt. DKK-1 ist ein löslicher Inhibitor. Er reguliert den Wnt/ β -Catenin Signalweg durch Bindung an den Korezeptor LRP 5. Sklerostin ist ein monomeres Glykoprotein und wird von Osteozyten exprimiert (van Bezooijen, Rutger L et al. 2004). Es bindet ebenfalls an den LRP 5/6 Rezeptor und verhindert wie DKK-1 die Osteoblasten-Differenzierung, - Proliferation und - Reifung.

Osteoblasten sind mononukleäre Zellen mit variierender Zellmorphologie (kubisch bis flach), die sich im Monolayer gelegen an der periostalen und endostalen Oberfläche befinden. Die Morphologie ist abhängig von Aktivität und Reifungsgrad der Zellen. So

Literaturübersicht

weisen beispielweise aktivierte Osteoblasten in der Formationsphase eine kubische Gestalt auf. Ihre primäre Aufgabe ist die Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen Typ I, aber auch Proteoglykane, Glykoproteine und γ -carboxylierten (Gla) Proteinen. Somit sind sie maßgeblich für die Entwicklung der Knochenmatrix (Formation) verantwortlich (BILEZIKIAN et al. 2002). Glykoproteine, die von Osteoblasten sezerniert werden sind unter anderem: Osteonectin (Synonym: SPARC = secreted protein acidic and rich in cystine), Tenascin-C, Fibronectin und Teile der Thrombospondin Familie. Sie regulieren die Knochenzell-Adhäsion, Migration, Proliferation und/oder Differenzierung. Osteopontin und Knochen Sialoproteine (bone Sialoproteine) sind Zelladhäsionsproteine mit hoher Affinität zu Hydroxylapatit. Osteopontin spielt eine Rolle in der Quervernetzung zwischen Hydroxylapatit, Calciumionen und Kollagen, wogegen Sialoproteine wichtig für die Adhäsion von nicht zellulären und zellulären Komponenten des Knochens wie Osteoblasten und Osteoklasten sind. Die Sialoproteine schließen die Matrix Gla-Proteine und das Osteocalcin mit ein.

Osteocalcin wird auch als *bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein* oder bone Gla-Protein (BGP) bezeichnet (PRICE et al. 1980). Es wird mit Hilfe des fettlöslichen Vitamin K auf Glutaminsäurereste carboxyliert. Vitamin K spielt somit neben der Blutgerinnung eine weitere wichtige Rolle im Knochenaufbau. Eine verminderte Vitamin K-Zufuhr kann zu Knochenmasseverlust führen (VERMEER et al. 1995; KOSHIHARA und HOSHI 1997). Ein kleiner Anteil des Osteocalcins gelangt in die Zirkulation und wird rasch proteolytisch abgebaut. Carboxyliertes Osteocalcin gewährleistet, dass der schwerlösliche Calcium-Phosphat Komplex im Knochen und nicht an anderen Stellen im Körper ausfällt und sorgt somit für die Mineralisation. Es gilt überwiegend als Marker der Knochenformation (BIEGLMAYER et al. 2012). Neben dieser Funktion ist eine weitere bekannt: Eine Form des Osteocalcins, das untercarboxylierte Osteocalcin wirkt auch als metabolisches Hormon, das Einfluss auf den Energiestoffwechsel zeigt (GONCIULEA und BEUR 2015). Näheres dazu im Kapitel 2.3.

Eine indirekte Aufgabe der Osteoblasten stellt die Mineralisierung der Knochenmatrix (Osteoid) durch Initialisierung der Hydroxylapatit-Formation dar. Hierfür sind

Literaturübersicht

bestimmte Enzyme, die die Phosphoprotein–Phosphorylation regulieren verantwortlich. Dazu gehört beispielweise die Alkalische Phosphatase (AP), die einen membrangebundenen Marker der Osteoblastendifferenzierung darstellt (MACKIE 2003). Diese wird auch als knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP) bezeichnet und macht etwa die Hälfte der im Serum (Humanmedizin) messbaren AP aus. Sie gilt ebenfalls als wichtiger Marker der Knochenformation (THOMAS 2012).

Osteoblasten exprimieren eine Vielzahl von Rezeptoren, an denen Parathormon (PTH), Parathormon-related peptide (PTHrP), Vitamin D Metaboliten und Sexualhormone ansetzen und somit in den Knochenstoffwechsel eingreifen können (KINI und NANDEESH 2012).

Die durchschnittliche Lebensspanne eines humanen Osteoblasten beträgt zwischen 1-10 Wochen. Am Ende dieser Zeit folgt die Apoptose oder die Differenzierung in Osteozyten oder „*bone lining cells*“ (BILEZIKIAN et al. 2002). Somit stellen Osteozyten den terminalen Differenzierungsgrad eines Osteoblasten dar. Diese werden in die Matrix eingelagert und zeigen keine Osteoidproduktion mehr. Über porenbildende Proteinkomplexe, den *gap junctions*, stehen die Zellen eng miteinander in Verbindung. Hauptverantwortlich ist hier vor allem das integrale Membranprotein Connexin (PLOTKIN et al. 2002; RODRÍGUEZ-SINOVAS et al. 2007). Osteozyten fungieren als Mechanorezeptoren und sind mit verantwortlich für die Regulation von Knochenformation und Resorption (CAETANO-LOPES et al. 2007). Kommt es durch Knochenalterung oder anderer Einflüsse (z.B. Östrogenmangel, Glukokortikoidtherapie) zum Lösen dieser *gap junctions*, führt dies unweigerlich zur Apoptose der Osteozyten und letztendlich zur Knocheninstabilität (PLOTKIN et al. 2005).

Die Oberfläche von im Ruhezustand gelegenen Knochen bilden sogenannte „*bone lining cells*“. Diese finden sich auf der endostalen Seite. Morphologisch sind sie im Gegensatz zu aktivierten Osteoblasten flach und grenzen zusammen mit dem Endoost die Knochenmatrix vom umliegenden Gewebe ab. Sie verhindern im Ruhezustand die Anlagerung von Osteoklasten an unmineralisierten Kollagenfasern, die die Knochenoberfläche überziehen (MANOLAGAS 2000a). *Bone lining cells* stehen mit

Osteozyten in Kontakt und sind wichtig für die Induktion der Umbauprozesse (PARFITT et al. 1996).

Eine weitere Aufgabe der Osteoblasten ist die Regulation der Knochenresorption durch Beeinflussung der Osteoklastendifferenzierung. Osteoblasten sind somit in der Lage indirekt die Calciumhomöostase zu regulieren (MACKIE 2003).

Osteoklasten

Osteoklasten spielen die Hauptrolle in der Knochenresorption. Es handelt sich hierbei um mehrkernige Zellen, die aus der Fusion von mononukleären hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks entstehen (BOYLE et al. 2003). Sie gehören somit zu der Monozyten/Makrophagenlinie (UDAGAWA et al. 1990). Im Gegensatz zu Osteoblasten sind Osteoklasten ausdifferenzierte Zellen. Für die Osteoklastengnese sind zwei Zytokine von entscheidender Bedeutung: *receptor activator of NF- κ B ligand* (RANKL) und *makrophage colony-stimulating factor* (M-CSF). Diese werden von Stromazellen des Knochenmarks sowie von Osteoblasten exprimiert und liegen membrangebunden oder gelöst vor (TEITELBAUM et al. 1995). Pro-Osteoklasten und reife Osteoklasten besitzen auf ihrer Oberfläche einen sogenannten *receptor activator of NF- κ B* (RANK). Dieser führt bei Interaktion mit dem RANK Liganden (RANKL) der Osteoblasten zur weiteren Osteoklastendifferenzierung. M-CSF ist essentiell für die Proliferation, das Überleben und die Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen, ebenso wie für das Überleben bereits reifer Osteoklasten (KHOSLA 2001).

Ein weiterer Regulator, der als Gegenspieler fungiert, ist das basische Glykoprotein Osteoprotegerin (OPG) (UDAGAWA et al. 2000). OPG wird von Pro-Osteoblasten/Stromazellen sezerniert und gehört wie RANKL zur Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor Familie. Es wird auch als „Decoy“ (Lockvogel) Rezeptor bezeichnet, da es in der Lage ist, RANKL zu binden und somit die RANKL-Ligand Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten blockiert. Somit verhindert OPG die Differenzierung der Osteoklastenvorläuferzellen in reife Osteoklasten. Östrogene haben einen positiven Effekt auf die Expression von OPG und verhindern somit die Osteoklastenaktivität (HOFBAUER et al. 1999).

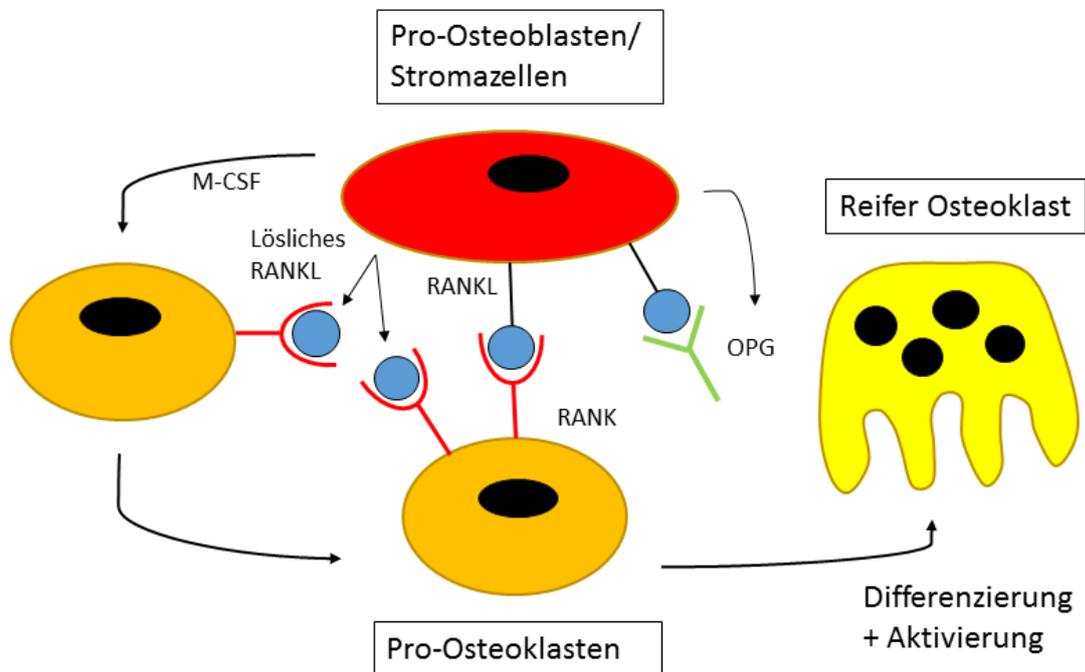


Abbildung 1: Osteoklastengnese modifiziert nach Koshla (2001). Die Abbildung zeigt die Regulation der Osteoklastengnese durch das OPG/RANKL/RANK-System. Abkürzungen: M-CSF: makrophage colony-stimulating factor; RANKL: receptor activator of NF- κ B ligand (blau: frei und gebunden) RANK: receptor activator of NF- κ B (roter Rezeptor); OPG: Osteoprotegerin (grün).

Das Zusammenspiel aller drei Faktoren für die Osteoklastengnese (Hemmung und Aktivierung) wird als OPG/RANKL/RANK-System zusammengefasst (KHOSLA 2001). Die Kenntnis über das OPG/RANKL/RANK-System dient der Erforschung verschiedener metabolischer Knochenerkrankungen und ihrer Therapien.

Um ihre resorptiven Eigenschaften ausführen zu können, müssen Osteoklasten an die Knochenmatrix binden. Dies geschieht mit Hilfe von Integrin- Rezeptoren in der Osteoklastenmembran. Hier binden beispielweise Integrinrezeptoren der β 1 Familie an Fibronectin und Kollagene. Andere Integrine wie Integrin α ν β 3 binden an Osteopontin und bone Sialoproteine (ROSS und TEITELBAUM 2005; CLARKE 2008).

Literaturübersicht

Die Osteoklasten erhalten ihre resorptiven Eigenschaften durch die Produktion verschiedener Enzyme wie Cathepsin K, tartratesistente saure Phosphatase (*tartrate-resistant acid phosphatase*, TRAP) und Wasserstoff-(H⁺)-Ionen. Cathepsin K gehört zu den Cystein-Proteasen (SAFTIG et al. 2000). TRAP dagegen zählt zu den Metallomatrix-Proteinen (MMP), das erst durch Proteasen (in dem Fall Cathepsin K) in die aktive Form überführt werden muss. Beide Proteine gelten als Marker der Knochenresorption (BALLANTI et al. 1997) und werden in intrazellulären Vakuolen der Osteoklasten gespeichert. RANKL führt neben der Aktivierung der Osteoklasten auch zur vermehrten Expression dieser Enzyme (BOYLE et al. 2003). Nach Adhäsion der Osteoklasten an die Zellmembran werden die Enzyme und Kationen via Exozytose in die darunterliegende Resorptionslakune (auch *Howship's Lakune* bezeichnet) sezerniert. Hierbei sorgen die Wasserstoffionen sowie die Enzyme Cathepsin K und TRAP zur Auflösung der anorganischen und organischen Matrix. Frei werdende Kollagenfragmente sowie freilösliches Calcium und Phosphat gelangen in den Kreislauf.

Die Entwicklung und Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten ist unter anderem abhängig von Wachstumsfaktoren, Hormonen, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen aus dem umliegenden Gewebe. Als Wachstumshormon ist hier vor allem Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) zu nennen. Bei IGF-1 handelt es sich um ein Polypeptid mit Sequenzhomologie zu Insulin (CANALIS et al. 1988). Es wird vor allem in der Leber unter Einfluss von Wachstumshormon (Growth Hormone, GH) gebildet, kommt aber auch in zahlreichen anderen Geweben wie dem Knochen vor. Hier wird IGF-1 von Osteoblasten sezerniert und hat autokrine sowie parakrine Wirkung auf das umliegende Gewebe (MCCARTHY et al. 1989; COHICK und CLEMMONS 1993). Die Synthese von IGF-1 in Osteoblasten wird vor allem durch PTH reguliert (GIUSTINA et al. 2008). IGF-1 spielt im Knochen eine fundamentale Rolle bezüglich Osteoblastengnese und Knochenformation. Es ist in der Lage, die Kollagensynthese zu stimulieren und sich durch Stabilisierung von β -Catenin, Mitglied des Wnt/ β -Catenin Signalwegs positiv auf die Osteoblastengnese auszuwirken (PLAYFORD et al. 2000). Die Wirkungen werden über IGF-1 Rezeptoren vermittelt. Ein Großteil des IGF-1 ist in der Knochenmatrix an IGF-bindende Proteine (IGFBP) fixiert. Diese werden bei resorptiven Prozessen freigesetzt und sorgen für die

Literaturübersicht

Anregung der Osteoblastenproduktion und somit einer beginnenden Formation. Nachgewiesenermaßen gilt IGF-1 nicht nur als Aktivator der Knochenformation, sondern greift auch in die Resorptionvorgänge durch Beeinflussung der Osteoklastenaktivität ein (HILL et al. 1995). Die Funktion von IGF-1 auf Osteoklasten ist noch nicht vollständig bekannt, dennoch ist mittlerweile bekannt, dass Osteoklasten IGF-1 Rezeptoren exprimieren. In vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass IGF-1 einen direkten Einfluss auf die Osteoklastengenese ausübt (MOCHIZUKI et al. 1992). Weiterhin können bestimmte Zytokine wie die Interleukine (IL) 1, 3, 6 und 11 sowie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) die Osteoklastengenese stimulieren und somit zu einer gesteigerten Knochenresorption führen (MANOLAGAS 1995). Andere Zytokine wie IL 4, IL 10, IL 18 sowie Interferon γ gelten als Inhibitoren der Osteoklastengenese. Desweiteren haben mechanische Faktoren Einflüsse auf die Entwicklung der beiden Zelltypen (MANOLAGAS 2000a).

Modeling und Remodeling

Der Knochen ist im juvenilen als auch am adulten Alter ständigen Auf- und Umbauprozessen unterlegen. Er stellt ein dynamisches Gewebe dar, das auf Gewebeschädigungen, Zellalterung und Imbalancen in der Calcium/Phosphat Homöostase reagieren muss (FERNANDEZ-TRESGUERRES HERNANDEZ-GIL et al. 2006). So werden jährlich 5% des kortikalen und 20% des trabekulären Knochens erneuert. In der Kindheit steht die Knochenformation im Vordergrund, was in einer Steigerung des Längenwachstums und in einer Veränderung der Knochengometrie und Größe resultiert. Dieser Prozess wird auch als „*Modeling*“ bezeichnet und verringert sich im erwachsenen Alter (KOBAYASHI et al. 2003). Das sogenannte „*Remodeling*“ beschreibt den stetigen Umbauvorgang im Knochen, der bereits im ersten Lebensjahr zum Ersatz des primären Knochens führt (PARFITT 1982). Es sorgt für die Erhaltung der Knochen-Masse, -Architektur und -Stabilität und ist neben physikalischen Reizen und mechanischen Belastungen die Antwort auf Einflussfaktoren wie Hormone, Zytokine oder Wachstumsfaktoren (MANOLAGAS 2000a).

Literaturübersicht

Beim Menschen ist bis zum ca. 30. Lebensjahr die Balance Richtung Knochenformation verschoben. Dies nimmt jedoch mit diesem Zeitpunkt ab und es stellt sich eine geringgradige, dominierend gesteigerte Knochenresorption ein. Die Aktivität der Umbauvorgänge unterscheidet sich auch von den bestehenden Knochenanteilen. So weist der trabekuläre Knochen eine höhere Umbaurate als der kortikale Knochen auf. Bedingt ist dies durch eine unterschiedliche Verteilung der zellulären Aktivität (DODDS et al. 1989) und verschiedener Oberflächen-Volumenverhältnisse.

Die verantwortlichen Zellen, wie Osteoblasten und Osteoklasten, die versorgenden Blutgefäße und das lokale Bindegewebe bilden im *Remodeling*-Prozess eine lokale Funktionseinheit, die als *basic multicellular unit* (BMU) bezeichnet wird (PARFITT 1994). Das humane Skelett besitzt ca. 35 Millionen BMUs, von denen 3-4 Millionen jedes Jahr aktiviert werden. Somit erfolgt alle 10 Jahre eine komplette Erneuerung des menschlichen Skelettes (FERNANDEZ-TRESGUERRES HERNANDEZ-GIL et al. 2006).

Das „*Remodeling*“ lässt sich in folgende Phasen unterteilen: Ruhephase, Aktivierung, Resorption, Formation und Mineralisation. Die Ruhephase stellt den inaktiven Knochen dar, der von *bone lining cells* überzogen ist. Die Aktivierungsphase beginnt beispielweise durch kleine Mikroläsionen oder wechselnden mechanischen Druckverhältnissen. Es kommt zu einer Retraktion der *bone lining cells*. Diese Retraktion ist wichtig, um die Anheftung von Osteoklasten an die Adhäsionsproteine der Knochenmatrix zu gewährleisten. Weiterhin schließt die Aktivierungsphase die Rekrutierung von Zellen des Monozyten/Makrophagen Systems, Differenzierungsvorgänge von Pro-Osteoklasten sowie der späteren Fusion zu Osteoklasten mit ein (ROODMAN 1999). Mit der Differenzierung der Pro-Osteoklasten zu Osteoklasten und der Anheftung an die endoostale Knochenmatrix beginnt die Resorptionsphase. Durch die Integrin-vermittelte Adhäsion der Osteoklasten und Knochenmatrix, kommt es zur Fusion der in Osteoklasten enthaltenen intrazellulären Vesikel mit der osteoklastären Plasmamembran. Diese faltet sich daraufhin zum sogenannten Bürstensaum (*ruffled border*). Es stellt die resorptive Einheit der Osteoklasten dar (VAANANEN und HORTON 1995). Die Osteoklasten sezernieren

Literaturübersicht

hierbei die bereits genannten Proteine und Ionen d.h. TRAP 5b, Cathepsin K und Wasserstoffionen zur Auflösung der organischen und anorganischen Knochenmatrix (DELAISSÉ et al. 2003). Unter den Osteoklasten bildet sich eine sogenannte *Howship's Lakune*. Die Resorptionsphase nimmt ca. 2-4 Wochen des gesamten Remoldingprozess in Anspruch (CLARKE 2008). Durch die Resorptionsvorgänge werden in der Knochenmatrix an Proteine gebundene Wachstumshormone wie IGF-1 freigesetzt, die zu einer vermehrten Osteoblastenproduktion und deren Differenzierung führen. Die Resorptionsphase wird durch die Apoptose der mehrkernigen Osteoklasten beendet (REDDY 2004). Die nun vorhandene Resorptionslakune beinhaltet einige mononukleäre Zellen wie Monozyten, Osteozyten aber auch Pro-Osteoblasten, die in die Formationsphase übergehen. Der genaue Mechanismus des Übergangs der Knochenresorptionphase zur Phase der Formation ist noch nicht genau bekannt. Es werden hier neben Wachstumshormonen wie IGF-1 bestimmte Matrixproteine, wie *Transforming growth factor-β* (TGF-β) angenommen, die die Knochenresorption durch Osteoklasten durch Inhibition der RANKL Produktion in Osteoblasten verringern (BONEWALD und MUNDY 1990). Die anschließende Knochenformationsphase dauert ca. 4 bis 6 Monate. Pro-Osteoblasten produzieren anfänglich *bone morphogenic proteins* (BMP). Spätere Osteoblasten synthetisieren neues Kollagen und füllen die Lakunen mit neuem Osteoid wieder auf. Die Mineralisation erfolgt erst 30 Tage nach Osteoideinlagerung (FERNANDEZ-TRESGUERRES HERNANDEZ-GIL et al. 2006). Ältere Osteoblasten gehen in Apoptose oder differenzieren sich zu *bone lining cells* oder Osteozyten, die mithilfe von *gap junctions* miteinander kommunizieren. Nach Ablauf der Mineralisationsphase und der Bildung von *bone lining cells*, die sich über das neue Osteoid legen, schließt die Ruhephase an. Der Remodeling-Prozess ist beendet.

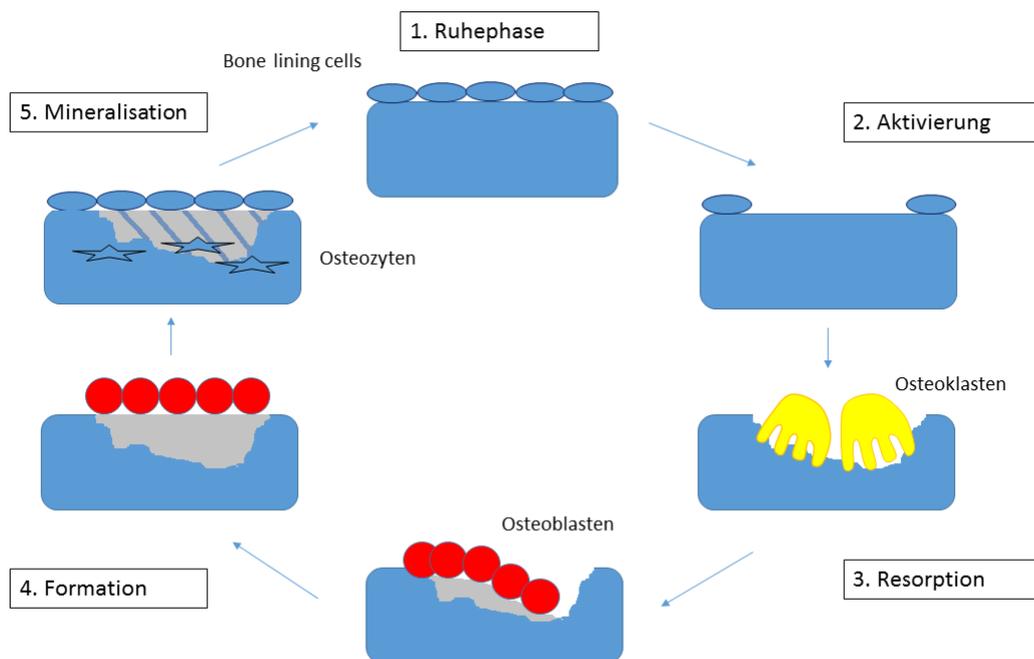


Abbildung 2: Remodeling-Zyklus modifiziert nach Fernández-Tresguerres Hernández-Gil et al. (2006): Schematische Darstellung.

Knochenresorption und Knochenformation stehen unter physiologischen Bedingungen im Gleichgewicht. Kommt es durch bestimmte Faktoren zu einer gesteigerten Osteoblastengenerierung oder einer verminderten Osteoklastenproduktion, führt dies zu einer gesteigerten Knochenmasse, die auch als Osteopetrose bezeichnet wird. Im Gegensatz dazu resultiert eine gesteigerte Osteoklastenaktivität oder eine verminderte Osteoblastenaktivität in einer Verringerung der Knochenmasse und kann letztlich zur Osteoporose mit erhöhter Frakturneigung führen (COHEN 2006).

Elektrolythaushalt und hormonelle Regulation

Calcium und Phosphat sind die Hauptbestandteile des Knochens und machen zusammen fast 65% des Knochengewichtes aus. 99% des Gesamtcalciums im Körper sind im Knochen in Form von Hydroxylapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ oder in Form anderer amorpher Salze (nicht kristallin) wie CaHPO_4 fixiert. Die restlichen 1% des Calciums bewegen sich im intra- und extrazellulären Raum, wobei dieses nochmal in drei

Literaturübersicht

verschiedene Formen unterteilt werden muss. Hiervon sind 50% ionisiertes Calcium, 9% bilden Calciumkomplexe (Ca-Citrat, Ca-Lactat, Ca-Bicarbonat) und 41% des Calciums sind an Plasmaproteine gebunden (HALL und GUYTON 2010). Nur das ionisierte Calcium steht dem Körper frei zur Verfügung und ist in zahlreichen Prozessen wie Muskelkontraktionen und der Blutgerinnung involviert. Phosphat wird dagegen im Knochen zu 85% gespeichert (HALL und GUYTON 2010). 14 - 15% des Phosphats befinden sich im Intrazellulärraum und nur 1% in der extrazellulären Flüssigkeit. Auch hier liegt Phosphat in zwei verschiedenen Formen vor: Orthophosphat und Pyrophosphat. Welches der beiden überwiegt, ist jeweils vom pH-Wert des Blutes abhängig. Für die Messungen aus dem Blut spielt dies jedoch keine Rolle, da sie als Gesamtphosphat bestimmt werden (HALL und GUYTON 2010). Neben den Elektrolyten Calcium und Phosphat ist Magnesium mit 67% im Knochen gespeichert. Es findet sich zu 1% im Extrazellulär- und zu 99% im Intrazellulärraum. Ebenso wie Calcium liegt Magnesium im extrazellulären Raum als ionisiertes Magnesium (55%), an Protein gebundenes Magnesium (20 - 30%) oder als Komplex (15 - 25%) vor (BATEMAN 2012).

Extrazelluläres Calcium und Phosphat werden durch Hormone wie Vitamin D, Parathormon (PTH) und *fibroblast growth factor 23* (FGF 23) streng reguliert (GONCIULEA und BEUR 2015). Parathormon (PTH) und Calcitriol (1,25-Dihydroxyvitamin D₃) sind die Hauptregulatoren in der Calciumhomöostase und sorgen für eine intestinale Reabsorption, renale Exkretion und Austausch zwischen extrazellulärem Raum und Knochen. PTH ist in der Lage, das freie ionisierte Calcium „Minute zu Minute“ zu kontrollieren wohingegen das Calcitriol dieses von „Tag zu Tag“ macht (KANEKO et al. 2008). PTH gehört zu den Peptidhormonen bestehend aus 84 Aminosäuren und wird in den Hauptzellen der Parathyroidea gebildet und sezerniert (HABENER und POTTS, JR 1978). Kommt es zum Abfall der Calciumkonzentration, wird dies von sogenannten *calcium sensing receptors* (CaSR) der Parathyroidea erfasst und regulatorisch daraufhin vermehrt PTH sezerniert (GRANT et al. 1990). Als ein Inhibitor der PTH Sekretion gilt das aktive Vitamin D₃ (Calcitriol). Durch die Bindung an den Vitamin D-Rezeptor (VDR) der Parathyroidzellen kommt es zur Hemmung der Transkription der Gene für PTH (SILVER et al. 2002). Somit wirkt Calcitriol über einen negativen Rückkopplungs- (Feedback)mechanismus auf die PTH-Sekretion, da PTH

Literaturübersicht

in der Niere zu einer verstärkten Calcitriolsynthese führt. Ein weiterer wichtiger Stimulator der PTH-Sekretion ist neben der Hypocalcämie eine Hyperphosphatämie, die allerdings häufig Folge einer niedrigen Calciumkonzentration ist. PTH hat direkten Einfluss auf den Knochen und die Niere sowie indirekt auf den Darmtrakt, um die Blutkonzentration von Calcium konstant zu halten. In der Niere führt es zu einer vermehrten tubulären Reabsorption mit verminderter renaler Calciumausscheidung (DIBARTOLA 2012). Genau umgekehrt verhält es sich hier mit dem Phosphat. Phosphat wird unter Parathormoneinfluss vermehrt renal ausgeschieden (GONCIULEA und BEUR 2015). Weiterhin steigert PTH in der Niere die Umsetzung von Vitamin D Metaboliten in das aktive 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol). Da der Knochen ein Hauptreservoir für Calcium und Phosphat darstellt, spielt die Wirkung von PTH auf den Knochen eine essentielle Rolle in der Mineralhomöostase. Die Wirkung von PTH auf den Knochen läuft biphasisch ab. Eine Steigerung der Plasmakonzentration von ionisiertem Calcium wird durch eine anfängliche „schnelle“ Phase und einer darauffolgenden „langsamen“ Phase herbeigeführt. Die erste Phase wird durch die Bindung von PTH an Rezeptoren der Osteoblasten eingeleitet. Hier wird durch die Rezeptor-Ligand Interaktion eine Calciumpumpenaktivierung von Osteoblasten/Osteozyten angenommen, die eine Verschiebung des Calciums aus der sogenannten Knochenflüssigkeit „*bone fluid*“ in den Extrazellulärraum gewährleistet (PARFITT 1986; HALL und GUYTON 2010). Der spätere „langsame“ Effekt von PTH beruht auf der Aktivierung der Osteoklasten, die eine vermehrte Knochenresorption induzieren und somit Calcium und Phosphat bereitstellen. Die Aktivierung der Osteoklasten erfolgt wie bereits vorher beschrieben durch das OPG/RANKL/RANK - System.

Literaturübersicht

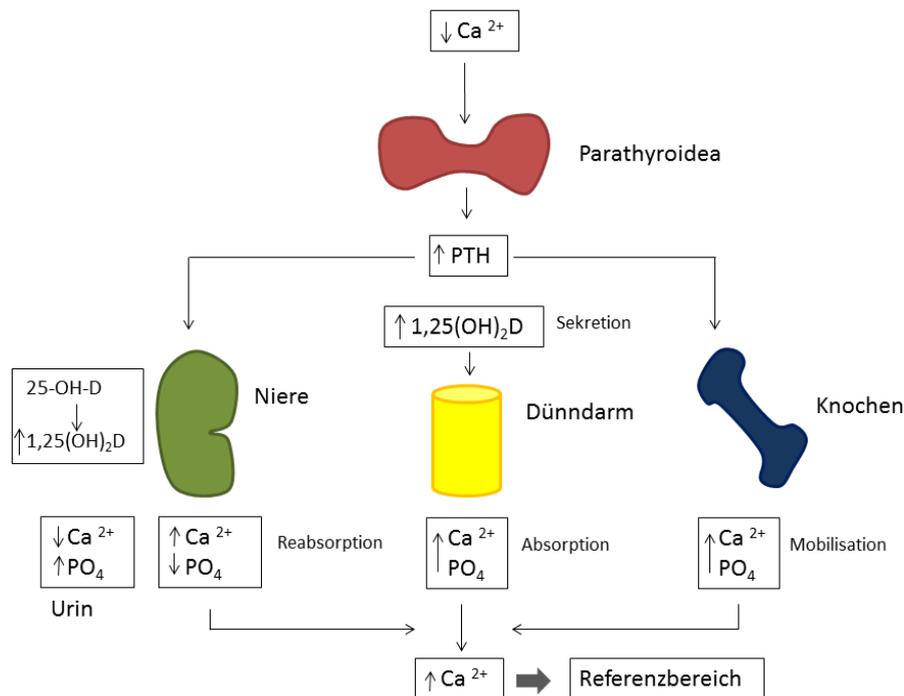


Abbildung 3: Modifiziert nach Quarles (2008): Regelkreis der PTH/ 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 -Achse zur Regulation der Calciumhomöostase

Abkürzungen: D = Vitamin D; PTH = Parathormon

Interessanterweise hat PTH nicht nur einen katabolen Effekt auf den Knochen, sondern je nach Dauer der Anwendung auch einen anabolen Effekt (FROLIK et al. 2003; DATTA und ABOU-SAMRA 2009). Somit wird PTH heutzutage sogar zur Osteoporosetherapie eingesetzt. Es wurde festgestellt, dass eine kontinuierliche Infusion von PTH zu Knochenverlust führt, im Gegensatz zu einem intermittierenden Einsatz von PTH, der eher in einer Steigerung der Knochendichte resultiert. Als Mechanismus des anabolen Effekts von PTH wird eine gesteigerte Osteoblastendifferenzierung und verminderte Osteoblastenapoptose vermutet (QIN et al. 2004).

Obwohl PTH auch einen Einfluss auf die Phosphat-Homöostase hat, gilt es nicht als Hauptregulator des Phosphat-Haushaltes. Diese Funktion wird dem Fibroblastenwachstumsfaktor 23 (*fibroblast growth factor 23*, FGF 23) zugeordnet. Es

Literaturübersicht

wird von Osteozyten als auch von Osteoblasten als Antwort auf eine erhöhte Phosphatkonzentration gebildet (SILVER und NAVEH-MANY 2009). Seine Funktion liegt in der Hemmung der renalen Phosphat-Reabsorption und der verminderten Bildung von aktivem Vitamin D. Desweiteren hat FGF 23 einen negativen Einfluss auf die PTH-Bildung in der Parathyroidea (QUARLES 2012).

Vitamin D

Ein weiterer wichtiger Regulator der Calciumhomöostase und des Knochenstoffwechsels ist das Vitamin D (Calciferol), genauer die aktive Form, das 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol oder 1,25-Dihydroxyvitamin D) (HALL und GUYTON 2010). Vitamin D wird zu den Steroidhormonen gezählt, da es einen Cholesterolring enthält. Es kann über die Nahrung in Form von Vitamin D₂ oder D₃ aufgenommen oder in der Haut zu Vitamin D₃ (Cholecalciferol) synthetisiert werden. Dieses geschieht durch die Exposition von Ultraviolett (UV)-B Strahlen auf 7-Dehydrocholesterol. Diese Synthese in der Haut gilt im Allgemeinen für die Humanmedizin sowie in der Veterinärmedizin für Omnivore und Herbivore. Eine Studie beim Schaf konnte die Vitamin D₃ Produktion in der Haut nach Lichtexposition beweisen (HIDIROGLOU und KARPINSKI 1989). Hunde und Katzen zeigen dagegen eine insuffiziente Vitamin D₃ Synthese in der Haut und müssen Vitamin D₃ allein übers Futter aufnehmen (HOW et al. 1994). Das aufgenommene oder synthetisierte Cholecalciferol (Vitamin D₃) muss weiter metabolisiert werden. Der erste Schritt ist die Konvertierung zu 25-Hydroxycholecalciferol (25-Hydroxyvitamin D, 25-OH-Vitamin D oder Calcidiol) in der Leber. 25-Hydroxyvitamin D selbst wirkt sich negativ auf diesen Konvertierungsschritt aus (negatives feedback), so dass es selbst die Konzentration im Plasma reguliert. 25-Hydroxyvitamin D ist das Hauptprodukt, welches im Plasma zu finden ist. Es besitzt eine Halbwertszeit von 15 Tagen (JONES 2008). Die aktive Form des Vitamin D wird aber erst in der Niere synthetisiert. Hier erfolgt eine Hydroxylierung im proximalen Tubulus von 25-Hydroxycholecalciferol zu 1,25-Dihydroxycholecalciferol. Dieser Schritt wird von PTH reguliert. Bei Nierenerkrankungen kommt es somit zur Verminderung der aktiven Form. Neben der Wirkung von PTH wird die 1,25-Dihydroxycholecalciferolsynthese von weiteren

Literaturübersicht

Faktoren wie Calcium, Phosphat, Calcitonin, *fibroblast growth factor 23* und auch von 1,25-Dihydroxycalciferol selbst reguliert (LEHMANN und MEURER 2010).

Calcitriol spielt durch den Einfluss auf den Darm und die Niere eine große Rolle in der Calcium- und Phosphathomöostase. Im Darm sorgt es für eine vermehrte Aufnahme von Calcium und Phosphat durch die Enterozyten. In der Niere kommt es durch Vitamin D zu einer gesteigerten Reabsorption von Calcium und Phosphat aus dem glomerulären Filtrat (KUMAR et al. 2012). Calcitriol sorgt zudem im Zusammenspiel mit PTH für eine gesteigerte Reabsorption von Calcium aus dem Urin. Im Zuge dessen ist Calcitriol in der Lage die Expression von PTH zu inhibieren.

Da Vitamin D eine solche Wirkung auf die Calcium- und Phosphathomöostase hat, besitzt es auch großen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel und somit die Knochenstabilität. Vitamin D ist wichtig für die physiologische Knochenentwicklung, da es die Produktion verschiedener Proteine stimuliert, die von Osteoblasten sezerniert werden, wie Osteocalcin, Osteopontin, alkalische Phosphatase und RANKL (LIAN et al. 1989; ANDERSON et al. 2010). Eine Studie konnte zeigen, dass Osteoblasten selbst in der Lage sind, 25-Hydroxyvitamin D (Calcidiol) zu 1,25-Dihydroxyvitamin D (Calcitriol) umzusetzen. Somit können Osteoblasten autokrin die Osteoblastendifferenzierung und ihre Funktion beeinflussen (ATKINS et al. 2007). Calcitriol sorgt unter anderem für die Differenzierung von Stromazellen zu Osteoklasten (Osteoklastengnese) (BALDOCK et al. 2006).

Ein Vitamin D-Mangel kann durch die verminderte Calciumabsorption aus dem Darm zu einem sekundären Hyperparathyreodismus und durch die dadurch sekundär bedingte verminderte Mineralisation des Knochen letztendlich zu einem Knochenmasseverlust und somit zur Osteoporose mit erhöhter Fraktur neigung führen (LIPS und VAN SCHOOR 2011a).

Neben den Einflüssen auf den Knochenstoffwechsel hat Vitamin D durch die Expression von Vitamin D-Rezeptoren auf anderen Organen zahlreiche weitere Funktionen. Beispielweise spielt Calcitriol eine Rolle in der Expression von Insulinrezeptoren (MAESTRO et al. 2003) oder hat immunmodulatorische Funktionen (HAYES et al. 2003).

2.2 Osteoporose

2.2.1 Definition

Die Osteoporose beschreibt eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und veränderte Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist. Die daraus resultierende Verschlechterung der Knochenstabilität führt zur erhöhten Frakturneigung und stellt eine der weltweit häufigsten Erkrankungen des älteren Menschen dar (WHO TECHNICAL REPORT SERIES 1994; DACHVERBAND OSTEOLOGIE e.V. 2014). Von einer manifesten Osteoporose spricht man, wenn bereits Frakturen als Folge der Osteoporose aufgetreten sind.

Neben dieser Definition findet sich eine weitere gültige Definition der Osteoporose von der Weltgesundheitsorganisation (WHO). Diese definiert sich über die Quantität auf Basis der durch *Dual-energy x-ray absorptiometry* (DXA) gemessenen Knochendichte der Lendenwirbelsäule und/oder des Femur. Als Bezugsgröße dient hier der sogenannte *T-Score*, der die Differenz des gemessenen Wertes zur mittleren Knochendichte junger, gesunder bis zu 30 Jahre alter Frauen oder Männer in Standardabweichungen angibt (WHO TECHNICAL REPORT SERIES 1994). Liegt der *T-Score* mehr als 2,5 Standardabweichungen unter dem statistischen Mittelwert der Knochendichte junger gesunder Menschen, ist dies als Osteoporose definiert. Laut den DVO- Leitlinien 2014 und der WHO ist diese Definition nur für postmenopausale Frauen sowie für Männer jenseits des 50. Lebensjahres gültig (DACHVERBAND OSTEOLOGIE e.V. 2014). Nach der International Society for Clinical Densitometry (ISCD, 2004) sollte die Beurteilung der Knochendichte für jüngere Frauen und Männer sowie für Kinder durch den sogenannten *Z-Score* ermittelt werden. Hierbei wird die gemessene Knochendichte mit Mittelwerten einer gleichen Altersgruppe und gleichen Geschlechts verglichen (WRITING GROUP FOR THE ISCD 2004).

Literaturübersicht

Normale Knochendichte	T-Score > -1
Osteopenie	T-Score < -1 und > -2,5
Osteoporose	T-Score < -2,5
Manifeste Osteoporose	T-Score < -2,5 und Fragilitätsfrakturen

Tabelle 1: Osteoporose-Definition anhand des T-Score in Standardabweichungen nach Weltgesundheitsorganisation (1994).

Die Definition einer Osteoporose mittels T-Score ist erst nach Ausschluss anderer Erkrankungen, die mit einer Knochenmineralgehaltsverminderung einhergehen gültig. Ein T-Score von < -3 ist definitionsgemäß keine Osteoporose, sondern eine Osteomalazie (DACHVERBAND OSTEOLOGIE e.V. 2014).

Die Diagnose kann somit nur im klinischen Kontext gestellt werden.

2.2.2 Klinisch und sozial-ökonomische Bedeutung der Osteoporose

Die klinische Bedeutung der Osteoporose liegt insbesondere im erhöhten Auftreten von Frakturen. Durch die spontan auftretenden Frakturen leiden die Betroffenen unter anderem an akuten, aber auch chronischen Schmerzen. Hinzu kommen häufig schlechte Heilungstendenzen des osteoporotischen Knochens.

Typischerweise treten osteoporotische Frakturen an Brust- und Lendenwirbel, Hüfte, proximaler Femur (Femurhals, Trochanter-Region), proximaler Humerus und distalen Radius auf (COOPER 2010). Insbesondere die Hüftfrakturen können mit ernsthaften Folgen und einer verminderten Lebensqualität einhergehen (COOPER 1997). Interessanterweise treten die nichtvertebralen Frakturen überwiegend sturzbedingt auf, wohingegen die Wirbelkörper schon durch Alltagstätigkeiten frakturieren können (COSTA et al. 2013).

Die funktionelle Einschränkung und Schmerzbelastung führt zu einer verminderten Lebensqualität der Patienten (LIPS und VAN SCHOOR 2005). Es lässt sich zudem

eine erhöhte Mortalität bei Patienten mit manifester Osteoporose nachweisen (JOHNELL et al. 2004; MORIN et al. 2011).

Neben den sozialen Einschränkungen spielt die Osteoporose auch ökonomisch eine große Rolle, da durch eine erhöhte Anzahl an Frakturversorgungen hohe Kosten für das Gesundheitssystem entstehen. Eine im Jahr 2007 publizierte Studie gab an, dass sich die jährlichen Gesamtkosten, die durch die Diagnose, Therapie und Langzeitversorgung der Osteoporose entstehen auf 5,4 Mrd. Euro belaufen. Mehr als die Hälfte davon (3,0 Mrd. Euro) sind alleine auf die stationäre Frakturversorgung zurückzuführen. Auch die anderen Kategorien wie Langzeitpflege und Medikamente nehmen einen beachtlichen Stellenwert mit jeweils jährlichen Kosten von 894 Millionen Euro bzw. 791 Millionen Euro ein (HÄUSSLER et al. 2007). Eine weitere Studie analysierte für das Jahr 2009 verschiedene Frakturtypen und die daraus resultierenden Kosten. Hier lagen die jährlichen Krankenhauskosten bei ca. 2,4 Mrd. Euro im stationären Bereich, wobei 860 Millionen Euro (36%) auf die Behandlung von Osteoporose zurückzuführen waren (BLEIBLER et al. 2014).

Eine Longitudinalstudie konnte bei Frauen mit diagnostizierter Osteoporose weitere Co- Erkrankungen nachweisen, die mit einem erhöhten Frakturrisiko einhergehen. Dazu zählten unter anderem Hypercholesterinämie, Hypertension und Krebserkrankungen. Eine statistisch hohe Assoziation zwischen der vorliegenden Grunderkrankung und dem Auftreten von Frakturneigungen wurde bei Patientinnen mit Morbus Parkinson oder Multipler Sklerose beobachtet (DENNISON et al. 2012). Bei diesen Erkrankungen lässt sich das häufige Auftreten von Frakturen durch eine krankheitsbedingte erhöhte Sturzgefahr erklären.

2.2.3 Risikofaktoren

Es gibt eine Vielzahl von Faktoren, die eine Osteoporoseentwicklung und das Auftreten von Frakturen und somit einer manifesten Osteoporose begünstigen. Die Risikofaktoren lassen sich in Allgemeine Risiken, Risiken durch spezielle Grunderkrankungen und Frakturrisiken durch medikamentöse Therapie unterteilen (DACHVERBAND OSTEOLOGIE 2014). Die Definition eines klinischen Risikofaktors nach DVO-Leitlinien besagt, dass in prospektiven Studien ein mindestens 1,5-fach

Literaturübersicht

erhöhtes Risiko für mindestens einer der folgenden osteoporotischen Frakturlokalisation (Wirbelkörperfrakturen, Hüftfrakturen, Oberarmfrakturen, Unterarmfrakturen) erwiesen wurde (DACHVERBAND OSTEOLOGIE 2014).

Diese wichtigsten Risikofaktoren sind nachfolgend tabellarisch dargestellt.

Allgemeine Risiken	Alter, Geschlecht, familiäre Prädisposition, Sturzneigung, Immobilität, Genussmittel (Alkohol, Nikotin), Untergewicht, Ernährung (Vitamin D- und Calciummangel, Homozysteinmangel, Folsäure- und Vitamin B12-Mangel, Vitamin K-Mangel)
Risiken durch spezielle Grunderkrankungen	Cushing-Syndrom, primärer Hyperparathyreodismus, Wachstumshormonmangel bei Hypophyseninsuffizienz, Hypogonadismus, Hyperthyreose, Diabetes mellitus Typ I + Typ II, Rheumatoide Arthritis
Risiken durch medikamentöse Therapie	Glukokortikoide, GnRH-Agonisten und – Antagonisten, Antidepressiva, Thiazolidindionen, Heparin, Immunsuppressiva, Schleifendiuretika

Tabelle 2: Risikofaktoren, die eine Osteoporose und osteoporotisch-bedingte Frakturen begünstigen.

Abkürzung: GnRH = Gonadotropin releasing hormone

Wichtige Risikofaktoren, die auch im Kontext dieser Arbeit von Bedeutung sind, werden im Abschnitt: Osteoporoseformen näher erläutert.

2.2.4 Epidemiologie

Osteoporose stellt eine weltweit häufige Erkrankung dar. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation leiden mehr als 75 Millionen Menschen in Europa, Japan und den USA an dieser metabolischen Erkrankung (WHO TECHNICAL REPORT SERIES 1994). Im globalen Vergleich zeigen Europa und Amerika mit einer Prävalenz von 51% den größten Anteil einer diagnostizierten manifesten Osteoporose (JOHNELL und KANIS 2006). Das Risiko an einer Fraktur infolge einer Osteoporose zu erkranken liegt laut WHO in den Industriestaaten zwischen 30 und 40% (WHO SUMMARY MEETING REPORT 2007).

Die Osteoporose-Prävalenz in Deutschland ist in einigen Studien untersucht worden. Hierbei sollte beachtet werden, dass die Studien sich durch verschiedene Erhebungsmethoden, Altersgruppen und Populationen unterscheiden, so dass die Angaben variieren können.

Eine ältere Studie von 2007 (HÄUSSLER et al. 2007), die Daten aus dem Jahr 2000 bis 2003 ausgewertet hat, gibt an, dass 7,8 Millionen Menschen mit einem Alter über 50 Jahren in Deutschland an Osteoporose erkrankt sind. Die errechnete Prävalenz für Osteoporose wird hier insgesamt mit 26% angegeben. Für Frauen ist diese signifikant höher als für Männer des gleichen Alters (39% vs. 9,7%). Die Studie zeigt, dass ab dem 75. Lebensjahr 6 von 10 Frauen an Osteoporose leiden.

In einer retrospektiven Analyse (2006 - 2009) einer deutschen gesetzlichen Krankenkasse (Techniker Krankenkasse) wurden die Daten bezüglich bereits diagnostizierter Osteoporose, osteoporotischer Frakturen oder Arzneimittelverordnung spezieller Medikamente gegen Osteoporose bei Frauen und Männern ab einem Alter von > 50 Jahren ausgewertet. Die entsprechenden Daten wurden auf die Gesamtbevölkerung in Deutschland hochgerechnet und die Prävalenz und Inzidenz der Osteoporose geschätzt. Im Jahr 2009 litten 14% der Versicherungsnehmer (240,657 von 1,7 Millionen Versicherungsnehmern) an Osteoporose. Die geschlechtsspezifische Prävalenz lag bei Frauen um die 24% und bei Männern um die 6%. Auf die Gesamtbevölkerung Deutschlands übertragen sind somit 6,3 Millionen Menschen an Osteoporose erkrankt. Die Inzidenz wird in dieser Studie mit 2,1% pro Jahr angegeben. Das bedeutet, dass schätzungsweise jedes Jahr 885.000 Menschen

eine Osteoporose entwickeln. Die Häufigkeit des Auftretens von Frakturen lag im Beobachtungszeitraum bei 52%. Viele davon waren Mehrfachfrakturen (HADJI et al. 2013).

In einer Umfrage des Robert-Koch-Instituts gaben rund 15% der Frauen ab einem Alter von 50 Jahren und 6% der Männer dieser Altersgruppe eine diagnostizierte Osteoporose an. Die Lebenszeitprävalenz von Frauen lässt einen Anstieg von 8% (50 bis 64 Jahre) auf 21% im Alter über 65 Jahre verzeichnen (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2012).

Bei den genannten Studien sollte beachtet werden, dass die Prävalenzanalyse sich nur auf bereits ärztlich diagnostizierte Osteoporosen bezieht. Somit werden nicht erkannte Osteoporose-Fälle nicht erfasst. Insgesamt zeigen die genannten Studien eine höhere Prävalenz der Osteoporose bei Frauen als bei Männern.

Eine aktuelle Studie konnte jedoch zeigen, dass auch Männer eine hohe Prävalenz haben, an Osteoporose zu erkranken und diese häufig nur unzureichend diagnostiziert wird (HAASTERS et al. 2015). Es handelt sich hierbei um eine prospektive Studie über 2 Jahre, in der Frauen > 50 Jahre und Männer > 60 Jahre aufgrund von osteoporose-typischen Frakturstellen stationär behandelt wurden. Bei diesen Patienten erfolgte eine Diagnostik nach DVO-Leitlinie. Die Ergebnisse konnten zeigen, dass eine wesentlich höhere Osteoporoseprävalenz von 57% vorliegt als bereits angenommen. Interessanterweise waren 56,2% der Frauen und 59% der Männer betroffen. Somit konnte bei Männern gemessen am bundesdeutschen Kollektiv eine 10fach höhere Prävalenz festgestellt werden. Die Studie zeigte weiterhin, dass Männer > 60 und Frauen > 50 Jahren mit Frakturen das gleiche Risiko haben, begleitend an Osteoporose erkrankt zu sein. Eine Osteoporoseabklärung sollte somit bei Männern mit Frakturen gleichermaßen durchgeführt werden wie bei postmenopausalen Frauen (HAASTERS et al. 2015).

2.2.5 Formen der Osteoporose

Die Osteoporose lässt sich anhand ihrer Ätiologie in eine primäre und sekundäre Form unterteilen. Die primäre Osteoporose wird klassischerweise in eine postmenopausale und senile Osteoporose eingeteilt. Beide Formen der primären Osteoporose werden

auch als Involutionsosteoporose bezeichnet, da sie Folge einer physiologischen Atrophie im Alterungsprozess sind (RIGGS und MELTON 1986). Die häufigste Form stellt die postmenopausale Osteoporose (Typ-I-Osteoporose) dar. Eine mittlerweile immer häufiger gebräuchliche Klassifikation erfolgt anhand der Knochenumbaurate (*turnover*) in eine *High-turnover-Osteoporose* und *Low-turnover-Osteoporose* (PIETSCHMANN und PETERLIK 1999). Eine *High-turnover-Osteoporose* beschreibt eine gesteigerte Knochenumbaurate mit erhöhter Knochenresorption wie es bei der postmenopausalen Osteoporose infolge eines Östrogenmangels vorkommt. Man spricht hier auch vom „*fast-loser*“-Typ mit schnellem Verlust von Knochenmasse. Im Vergleich dazu stellt die *Low-turnover-Osteoporose* die Folge vor allem einer verminderten Knochenformation dar. Der Knochenmasseverlust wird als „*slow-loser*“-Typ bezeichnet. Dieser Typ tritt vor allem bei Männern und Frauen im höheren Alter (> 65 Jahren) auf und wird deshalb auch zu der senilen Osteoporose (Typ-II-Osteoporose) gezählt. Diese Einteilung hat insbesondere in der Therapieentscheidung einen großen Stellenwert eingenommen. Die idiopathische juvenile Osteoporose und idiopathische Osteoporose junger Erwachsener stellt neben der Involutionsosteoporose eine seltenere Form der primären Osteoporose dar.

2.2.5.1 Typ-I-Osteoporose oder postmenopausale Osteoporose

Die postmenopausale Osteoporose stellt die häufigste Osteoporoseform dar und entsteht hauptsächlich durch eine verminderte Östrogenproduktion. Aber auch Männer können an Typ-I-Osteoporose durch eine verminderte Sexualhormonproduktion (Östrogen, Testosteron) erkranken. Östrogene und Testosteron sind die Hauptregulatoren des Skelettwachstums und dessen Reifung. Diese (insbesondere Östrogene) bewirken in der Pubertät zusammen mit *Gonadotropin releasing hormon* (GnRH) und *Insulin-like growth factor-1* (IGF-1) eine extreme Zunahme der Knochendichte und sorgen bei Männern und Frauen zum Erreichen der maximalen Knochendichte (*peak bone mass*) (RIGGS et al. 2002). Das Knochendichte-Maximum ist in der Regel bis zum 30. Lebensjahr erreicht. Ab diesem Zeitpunkt kommt es mit zunehmendem Alter wieder zu einer Abnahme der Knochendichte. Die maximale Knochendichte sowie das Alter, in dem es zum stetigen Absinken der Knochendichte kommt, ist abhängig von genetischen und nutritiven Faktoren (VICENTE-RODRÍGUEZ

Literaturübersicht

et al. 2008). Spätestens ab dem 50. Lebensjahr kommt es zu einer deutlich gesteigerten Knochenresorption. Bei Frauen zeigt sich eine Beschleunigung des Knochenverlustes um den Zeitpunkt der Menopause aufgrund des rapiden Östrogenabfalls, welcher insbesondere den trabekulären Knochen betrifft (MANOLAGAS 2000a; COMPSTON 2009), während sich bei Männern die Geschlechtshormonproduktion nur sehr langsam vermindert. Eine Studie konnte dennoch zeigen, dass kastrierte Männer einen erhöhten Knochendichteverlust ähnlich wie bei der postmenopausalen Osteoporose der Frau aufweisen (STĚPÁN et al. 1989). In der ersten Phase der Menopause verlieren Frauen etwa 20 - 30% des trabekulären und 5 - 10% des kortikalen Knochens (RIGGS et al. 2002). Nach dieser Periode stellt sich bei Frauen eine langsame kontinuierliche Phase des Knochenverlustes ein, die auch bei älteren Männern zu beobachten ist (RIGGS et al. 1998). Gemessene Serummarker im frühen postmenopausalen Stadium zeigen eine gesteigerte Knochenresorption von 90% mit einer Knochenformationsrate von 45% an. Die Steigerung im Knochen- turnover infolge eines Östrogenmangels deutet auf eine Imbalance im *Remodeling*- Prozess hin (GARNERO et al. 1996a).

Für die Interaktion zwischen Östrogenen und Knochenstoffwechsel exprimieren Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten folgende Östrogenrezeptoren (ER): ER- α und ER- β . Hierbei spielt vor allem der ER- α eine wichtige Rolle für den Knochenstoffwechsel (BARKHEM et al. 1998). Östrogene sorgen im physiologischen Knochenstoffwechsel durch Wechselwirkung der entsprechenden Zellen für eine verminderte Knochenresorption und gesteigerte Knochenformation. Dabei agieren diese unterschiedlich je nach Lokalisation des Rezeptors. Östrogenrezeptoren auf reifen Osteoklasten sorgen durch Ligand-Rezeptor-Bindung für eine gesteigerte Apoptose. Die östrogen-induzierte Stimulation von Osteoblasten regt nicht nur die Knochenformation an, sondern hemmt auch die Osteoklastengnese, da Östrogen zu einer vermehrten Sekretion von Osteoprotegerin (OPG) in Osteoblasten führt. OPG verhindert als Decoy-Rezeptor die Interaktion zwischen RANKL und RANK und somit die Induktion des Signalweges für die Ausdifferenzierung von Osteoklasten (KHOSLA 2001; LERNER 2006; MCNAMARA 2010). Bei postmenopausalen Frauen konnte eine Überexpression von RANKL nachgewiesen werden, was zu einer verminderten Knochendichte aufgrund gesteigerter Resorption führte. Die RANKL Expression pro

Literaturübersicht

Zelle zeigte in dieser Studie eine positive Korrelation mit Knochenresorptionsmarkern wie C-terminales Telopeptid (CTX) und N-terminales Telopeptid (NTX) sowie eine negative Korrelation mit 17β -Östradiol (EGHBALI-FATOURECHI et al. 2003). Eine andere Studie stellte eine positive Korrelation zwischen OPG- Serum Konzentration, β -Östradiol und der Knochendichte dar. (ROGERS et al. 2002). Der Einfluss von Östrogenen auf die Knochenformation ist jedoch noch nicht restlos bekannt. Es wird weiterhin angenommen, dass ein Mangel an Östrogenen zu einer verminderten Expression von Transforming growth factor- β (TGF- β) und IGF-1 in Osteoblasten führt und somit eine verminderte Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten stattfindet (ERNST et al. 1989). Östrogene stimulieren zudem die Expression von Kollagen Typ I, so dass es bei einem Östrogenmangel zur verminderten Produktion von extrazellulärer Matrix kommt (ERNST et al. 1989). Desweiteren ist bekannt, dass Östrogene die Apoptose von Osteoblasten hemmen (MANOLAGAS 2000a). Weiterhin sind Zytokine, wie das Interleukin 6 (IL 6) zu nennen, die eine Rolle in der Entstehung der postmenopausalen Osteoporose spielen, da diese durch Androgene und Östrogene reguliert werden. Interleukin 6 ist ein Aktivator der Osteoklastendifferenzierung und somit verantwortlich für eine erhöhte Knochenresorption. Die Sexualhormone sind in der Lage die Gentranskription von IL 6 zu hemmen und somit eine vermehrte Osteoklastenaktivität zu verhindern. Kommt es infolge einer Gonadenunterfunktion zur verminderten Östrogen- und Androgen-Konzentration, führt dies zu einer Hochregulation von IL 6 und somit zu einem gesteigerten Knochenverlust (MANOLAGAS 1995).

Neben dem Östrogenmangel, der die Hauptursache der postmenopausalen Osteoporose spielt, tragen weitere Veränderungen, die mit dem Alter in Zusammenhang stehen zur Knochenminderung bei. Ebenso entscheidend sind die im Text erwähnten nutritiven und genetischen Faktoren, die über das Ausmaß der Knochenresorption entscheiden. Es ist zu beachten, dass die Übergänge von der postmenopausalen Osteoporose in die senile Osteoporose fließend sein können.

2.2.5.2 Typ-II-Osteoporose oder senile Osteoporose

Die senile Osteoporose entwickelt sich nach der Einteilung von Riggs und Melton (RIGGS und MELTON 1986) nach dem 70. Lebensjahr, wobei Männer und Frauen gleichermaßen betroffen sind. Im Gegensatz zur postmenopausalen Osteoporose, die durch den rapiden Östrogenabfall eher zum Verlust des trabekulären Knochen führt, ist die senile Osteoporose durch Abnahme der Knochendichte in beiden Anteilen (Kortikal und Trabekular) gekennzeichnet (SEEMAN 2003). Die Knochendichte zeigt hier im Vergleich zur Typ-I-Osteoporose eine langsame, progressive Abnahme (DUQUE und TROEN 2008). Mit steigendem Alter kommt es zu einer signifikanten Abnahme der Knochenformation bei bestehender Knochenresorption. Neben den Einflüssen der verminderten Sexualhormonkonzentration, die bereits vorher beschrieben worden ist, spielen noch andere Pathomechanismen zur Entstehung der senilen Osteoporose eine Rolle. Die senile Osteoporose ist ein Ergebnis aus der Kombination von veränderten Zell- und Hormonaktivitäten sowie nutritiven Faktoren (DUQUE und TROEN 2008).

Einen wesentlichen Aspekt in der Pathogenese spielt dabei der Vitamin D-Mangel der älteren Bevölkerung. Eine Studie konnte zeigen, dass bei einem verwendeten Grenzwert (cut-off-Wert) für 25-OH-Vitamin D von < 25 nmol/l alleine in Europa 2 - 30% der Erwachsenen und sogar 80% der älteren Menschen ein Defizit aufweisen (LIPS 2007). Laut einer Studie liegt in Deutschland die Prävalenz eines Vitamin D-Defizits zwischen 15 - 30% (ZITTERMANN 2010). Wichtige Ursachen für die Entwicklung eines Vitamin D-Mangels sind zum einen die geringe Sonnenexposition und zum anderen die mangelhafte Aufnahme über die Nahrung. Interessanterweise zeigen auch gewisse Lebensgewohnheiten einen Einfluss auf den Vitamin D-Gehalt im Körper. So konnte nachgewiesen werden, dass Frauen aus Ländern wie der Türkei, Jordanien und dem Libanon aufgrund des Tragens traditioneller Kleidung, d.h. dem vollständigen Bedecken aller Körperteile, signifikant häufiger gegenüber westlich geprägten Frauen einen Vitamin D-Mangel aufweisen (ALAGÖL et al. 2000; GANNAGÉ-YARED et al. 2000; MISHAL 2001). Es konnte zudem in Bezug auf die senile Osteoporose gezeigt werden, dass ältere Menschen eine eingeschränkte Produktion von Provitamin D₃ in der Haut haben (MACLAUGHLIN und HOLICK 1985).

Ebenso erniedrigt sich im Alterungsprozess die renale Funktion, was zu einer verminderten Metabolisierung des Vitamin D in die aktive Form führt (SLOVIK et al. 1981).

Durch die Hypovitaminose D entsteht aufgrund der verminderten Calciumresorption ein sekundärer Hyperparathyreodismus. Hierbei kommt es als Gegenregulation zur Hypocalcämie zu einer vermehrten Sekretion von Parathormon (PTH). PTH bewirkt eine verstärkte Aktivierung von 1,25-Dihydroxycholecalciferol in der Niere und sorgt somit wieder für eine verstärkte Calciumabsorption. Ein Nebeneffekt des PTH ist allerdings auch die Steigerung der Knochenumbaurate, welche mit einem erhöhten Knochenverlust, insbesondere des kortikalen Knochen, einhergeht (LIPS 2001). Dafür spricht auch eine weitere Studie, die anhand von gesteigerten Resorptions- und Formationsmarkern im Serum bei gleichzeitig erhöhten PTH einen gesteigerten Knochenumbau mit einhergehendem Knochenverlust bei Patienten mit Vitamin D-Defizit zeigen konnte (SAHOTA et al. 1999). Weiterhin finden sich Studien, die sogar den jahreszeitlichen Verlauf von PTH und Vitamin D widerspiegeln. So findet man beispielsweise am Ende des Winters hohe Konzentrationen von PTH gegenüber dem Ende des Sommers, wo niedrige Konzentrationen vorliegen (LIPS et al. 1983; KRALL et al. 1989).

Neben den genannten hormonellen und nutritiven Einflüssen auf die Genese der senilen Osteoporose spielen noch zelluläre Mechanismen eine Rolle. Hierbei kommt es während des Alterungsprozesses zur vermehrten Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Adipozyten und weniger zu Osteoblasten. Infolge dessen kommt es zu einer verminderten Anzahl an Osteoblasten, die der Knochenformation und dem *Remodeling* zur Verfügung stehen (GIMBLE et al. 2006).

Die hier aufgezählten Mechanismen zur Entstehung einer senilen Osteoporose zeigen, dass es sich wie bei den anderen Osteoporoseformen eher um eine multifaktorielle Erkrankung handelt.

2.2.5.3 Idiopathische Osteoporose

Die idiopathische Osteoporose wird nochmal in eine juvenile idiopathische Osteoporose und eine idiopathische Osteoporose junger Erwachsener unterteilt. Der

Literaturübersicht

Begriff beschreibt eine Osteoporoseform, die entweder im Kindesalter bis zum Erreichen der Pubertät (juvenil) oder bei Frauen und Männern zwischen Pubertät und Funktionsminderung der Gonaden (junger Erwachsener) auftritt.

Die juvenile idiopathische Osteoporose ist selten und tritt in der Regel bei Kindern vor dem Erreichen der Pubertät auf. Die Ursache ist bislang ungeklärt und kann sowohl Mädchen als auch Jungen betreffen. Für die Diagnose müssen kongenitale Formen, die eine erhöhte Frakturneigung begünstigen, wie die *Osteogenesis imperfecta*, ausgeschlossen werden. Desweiteren muss ein Ausschluss häufiger sekundärer Ursachen, die eine Osteoporose auslösen können erfolgen. Hierzu zählen vor allem endokrine Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Cushing-Syndrom, gastrointestinale Erkrankungen, die mit Malabsorption einhergehen sowie andere Ursachen wie Immobilisation (KRASSAS 2000; LORENC 2002). Die juvenile Osteoporose zeichnet sich durch eine verminderte Knochenformation insbesondere im trabekulären Knochen aus (RAUCH et al. 2002).

Die idiopathische Osteoporose junger Erwachsener ist wie die juvenile Osteoporose eine Ausschlussdiagnose. In der Regel sind sekundäre Ursachen wie Endokrinopathien, Glukokortikoid-Gabe, Alkoholismus oder *Anorexia nervosa* für die Osteoporose verantwortlich (KHOSLA et al. 1994; PERIS BERNAL 2010). Es scheint keine Geschlechtspräferenz vorzuliegen. Auch wenn die genaue Pathogenese der idiopathischen Osteoporose unklar ist, vermutet man eine beeinträchtigte Osteoblastenfunktion. Es liegen Studien vor, die bei Männern mit idiopathischer Osteoporose signifikant erniedrigte Plasmakonzentrationen von IGF-1 im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe zeigen. Insbesondere konnte eine positive Korrelation zwischen IGF-1 Plasmakonzentration und der Knochendichte von Wirbel- und Unterarmknochen festgestellt werden (LJUNGHALL et al. 1992). Es konnte weiterhin eine Assoziation zwischen niedrigen IGF-1 Plasmaspiegeln und einem spezifischen Allel auf dem IGF-1 Gen detektiert werden, so dass eine hereditäre Komponente angenommen werden muss (ROSEN et al. 1998). Eine weitere Studie stellte fest, dass Männer mit einer idiopathischen Osteoporose eine verminderte Expression von Östrogen-Rezeptor α -Proteinen auf Osteoblasten und Osteozyten zeigen (BRAIDMAN

et al. 2000). Auch dieses kommt als primäre Ursache infrage, so dass der Begriff idiopathisch möglicherweise bald abgelöst wird.

2.2.5.4 Sekundäre Osteoporose

Die sekundäre Osteoporose kann durch eine Vielzahl von bestimmten Erkrankungen, Stoffwechselstörungen oder iatrogen durch Medikamente ausgelöst werden. Diese Form der Osteoporose ist für Männer von größter Bedeutung, während bei der Frau die postmenopausale Osteoporose im Vordergrund steht.

Endokrinopathien	Cushing-Syndrom, Hyperthyreose, Hypogonadismus, Hyperparathyreodismus, Diabetes mellitus
Iatrogen-medikamentös	Heparin, GnRH-Analoga, Glukokortikoide
Mangelernährung	Malabsorption, <i>Anorexia nervosa</i> , Mangel an Vitamin D, C, K, Calcium
Maligne Erkrankungen	Myelo- und lymphoproliferative Erkrankungen, Plasmozytom, skelettale Metastasierung
Hereditäre Bindegewbserkrankungen	<i>Osteogenesis imperfecta</i> , Marfan-Syndrom, Ehlers-Danlos-Syndrom
Sonstiges	Immobilisierung, Alkohol, Nikotin

Tabelle 3: Ursachen für eine sekundäre Osteoporose nach Bieglmayer (2012) und Schulte (1997). Abkürzung: GnRH = Gonadotropin releasing hormone

Aufgrund des Themas der vorliegenden Arbeit wird insbesondere auf die Glukokortikoid-induzierte Osteoporose und im späteren Kapitel auf den Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und dem Knochenstoffwechsel als Ursache für eine sekundäre Osteoporose eingegangen.

2.2.5.4.1 Glukokortikoid-induzierte Osteoporose

Die Glukokortikoid-induzierte Osteoporose stellt die häufigste Form der sekundären Osteoporose dar und ist somit einer der wichtigsten Risikofaktoren für Osteoporosebedingte Frakturen (LANGE und MÜLLER-LADNER 2007).

Die erhöhte Exposition mit Glukokortikoiden kann sowohl endogen als auch exogen erfolgen, wobei der medikamentöse Einsatz von Glukokortikoiden die Hauptursache für eine sekundäre Osteoporose darstellt (LANGE und MÜLLER-LADNER 2007; WARRINER und SAAG 2013). Glukokortikoide finden aufgrund ihrer immunsuppressiven und antiinflammatorischen Wirkung großen Einsatz in der Humanmedizin. Häufige Erkrankungen, bei denen Glukokortikoide eingesetzt werden, sind die chronische obstruktive Atemwegserkrankung (COPD), rheumatoide Arthritis oder *inflammatory bowel disease* (IBD) (WALSH et al. 1996). Weltweit nehmen ca. 1% der Bevölkerung Glukokortikoide zu sich (ADLER 2010). Einige Studien konnten zeigen, dass die Therapie mit Glukokortikoiden abhängig von der Dosis und dem Zeitraum der Anwendung zu einem erhöhten Frakturrisiko führt. Schon bei niedrigen oralen Dosen von 2,5 mg Prednisolon pro Person und Tag steigt das Frakturrisiko (VESTERGAARD et al. 2005). Langzeittherapien mit 10 mg Prednisolon täglich für mehr als 90 Tage können das Risiko von Hüftfrakturen um das 7-fache, das von Wirbelkörperfrakturen sogar auf das 17-fache erhöhen (WEINSTEIN 2012). Da nachgewiesenermaßen der trabekuläre Knochen stärker betroffen ist als der kortikale Knochen, erscheint es nicht verwunderlich, dass insbesondere Wirbelkörper und Hüfte aufgrund anatomischer Gegebenheit ein hohes Frakturrisiko aufweisen (LAAN 1993). Glukokortikoide zeigen eine biphasische Wirkung auf den Knochenstoffwechsel. Studien konnten zeigen, dass insbesondere in den ersten 3-12 Monaten der Knochendichteverlust besonders ausgeprägt ist. Dies geht vor allem mit einer Verminderung der Knochenquantität einher. In dieser Phase liegt eine gesteigerte Knochenresorption („*fast-loser*“) und eine verminderte Knochenformation vor. Die anschließende Phase ist geprägt von einer verminderten Mineralisierung des Knochens, was Einfluss auf die Knochenqualität hat. Das Frakturrisiko steigt somit schon bereits in den ersten 3 Monaten der Glukokortikoidtherapie drastisch an (VAN STAA et al. 2000).

Literaturübersicht

Eine endogene Erhöhung der Kortisolplasmaspiegel wird durch das Cushing-Syndrom ausgelöst. Hierdurch kommt es entweder durch ein Hypophysenadenom induziert zu einer erhöhten hypophysären Ausschüttung von Adrenocorticotrophes Hormon (ACTH) und somit zu einer vermehrten Kortisolsekretion der Nebennierenrinde (*Zona fasciculata*) oder durch ein Adenom in der Nebennierenrinde selbst. Obwohl endogene Erkrankungen wie das Cushing-Syndrom seltener als die Medikamenten-assoziierte Form als Ursache für eine Glukokortikoid-induzierte Osteoporose auftreten, ist zu beachten, dass auch das Cushing-Syndrom laut einer Studie mit einem fünffach erhöhten Frakturrisiko eingerechnet (TÓTH und GROSSMAN 2013).

Insgesamt handelt es sich bei der Entstehung der Glukokortikoid-induzierten Osteoporose um ein multifaktorielles Geschehen. Der wohl wichtigste pathologische Effekt von Glukokortikoiden ist die Induktion einer Dysfunktion der Osteoblasten. Moderate Dosen von Glukokortikoiden sind der Lage, die Ausdifferenzierung der Vorläuferzellen in reife Osteoblasten zu inhibieren und somit sekundär die Kollagensynthese zu hemmen (PATZCHAN et al. 2001; Van Staa, T. P. 2006). Dies geschieht durch die Destabilisierung von β -Catenin des Wnt/ β -Catenin Signalwegs, der eine Schlüsselrolle in der Osteoblastengenese spielt (SMITH und FRENKEL 2005b). Des Weiteren konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Glukokortikoide einen proapoptischen Effekt auf Osteoblasten haben (O'BRIEN et al. 2004). Im physiologischen Knochenstoffwechsel sorgen Osteoblasten für die Regulierung der Osteoklastengenese über das OPG/RANK/RANKL-System. Glukokortikoide sind in der Lage, die Osteoprotegerin (OPG) Expression zu verringern und somit einen stimulierenden Einfluss auf die Osteoklastengenese auszuüben. Ein weiterer stimulierender Effekt auf die Knochenresorption ist die Überexpression von *receptor activator of NF- κ B* Liganden (RANKL) auf Osteoblasten, welches wiederum eine gesteigerte Osteoklastengenese begünstigt (SIVAGURUNATHAN et al. 2005). Neben den Osteoblasten zeigen auch Osteozyten eine erhöhte Apoptoserate infolge der Einwirkung von Glukokortikoiden. Gerade der Verlust der Osteozyten führt zu einer verschlechterten Mikroarchitektur und letztendlich zur erhöhten Frakturneigung (MANOLAGAS 2000b).

Literaturübersicht

Des Weiteren haben Glukokortikoide einen negativen Effekt auf den Geschlechtshormonstatus bei Frauen und Männern, indem diese die Produktion von FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) und somit sekundär die Östrogenproduktion inhibieren. Bei Männern kommt es weiterhin zu einer Verminderung der Testosteronproduktion (VAN STAA 2006). Im physiologischen Stoffwechsel haben Östrogene einen hemmenden Einfluss auf die Osteoklastengnese, vermindern die knochenresorbierende Aktivität von isolierten Osteoklasten und hemmen die Produktion verschiedener Zytokine (z.B. IL 6) (PIETSCHMANN und PETERLIK 1999). Fällt dieser Stimulus weg, kommt es wie bei der postmenopausalen Osteoporose zum vermehrten Knochenabbau.

Ein weiterer negativer Effekt der Langzeit-Behandlung mit Glukokortikoiden ist die Beeinflussung der Calciumhomöostase durch eine verminderte renale Reabsorption von Calcium in den Nierentubuluszellen. Der genaue Mechanismus ist noch unklar (REID und IBBERTSON 1987). Ebenso kommt es zu einer verminderten Calciumabsorption aus dem Darm, wobei auch hier der Mechanismus nicht vollständig geklärt ist (PATTSCHAN et al. 2001). Es wurde in einer Studie gezeigt, dass durch Vitamin D-Substitution die Calcium-Malabsorption im Darm von Patienten, die mit Glukokortikoiden behandelt worden sind, reversibel ist. Das lässt vermuten, dass Glukokortikoide keinen direkten Effekt auf die Mukosa des Darms haben, sondern dosisabhängig eine Störung des Vitamin D-Metabolismus hervorrufen und somit sekundär zu einer verminderten Absorption von Calcium aus dem Darm führen (KLEIN et al. 1977). Welchen Einfluss Glukokortikoide auf den Vitamin D-Metabolismus haben, wird in Studien kontrovers diskutiert. Ergebnisse weniger Studien konnten zeigen, dass die Langzeitanwendung von Glukokortikoiden mit einer Verringerung der 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration im Serum einhergeht (CHESNEY et al. 1978; SEARING et al. 2010). Im Gegensatz dazu konnte eine Studie bei Männern unter Kurzzeittherapie mit Prednisolon eine geringgradige Erhöhung des aktiven Vitamin D (Calcitriol) feststellen (HAHN et al. 1981).

Glukokortikoide haben zudem einen stimulierenden Effekt auf die PTH-Synthese und -Sekretion in der Parathyroidea (PERALDI et al. 1990). Studien konnten ebenfalls zeigen, dass nicht unbedingt eine PTH-Erhöhung im Serum infolge einer Therapie mit

Literaturübersicht

Glukokortikoiden erfolgen muss, sondern es gleichzeitig zu einer erhöhten PTH-Sensitivität des Knochens kommt (PAZ-PACHECO et al. 1995). Dies kann mit einer Glukokortikoid-induzierten Steigerung der PTH-Rezeptor-Expression der Osteoblasten begründet werden (PATSCCHAN et al. 2001).

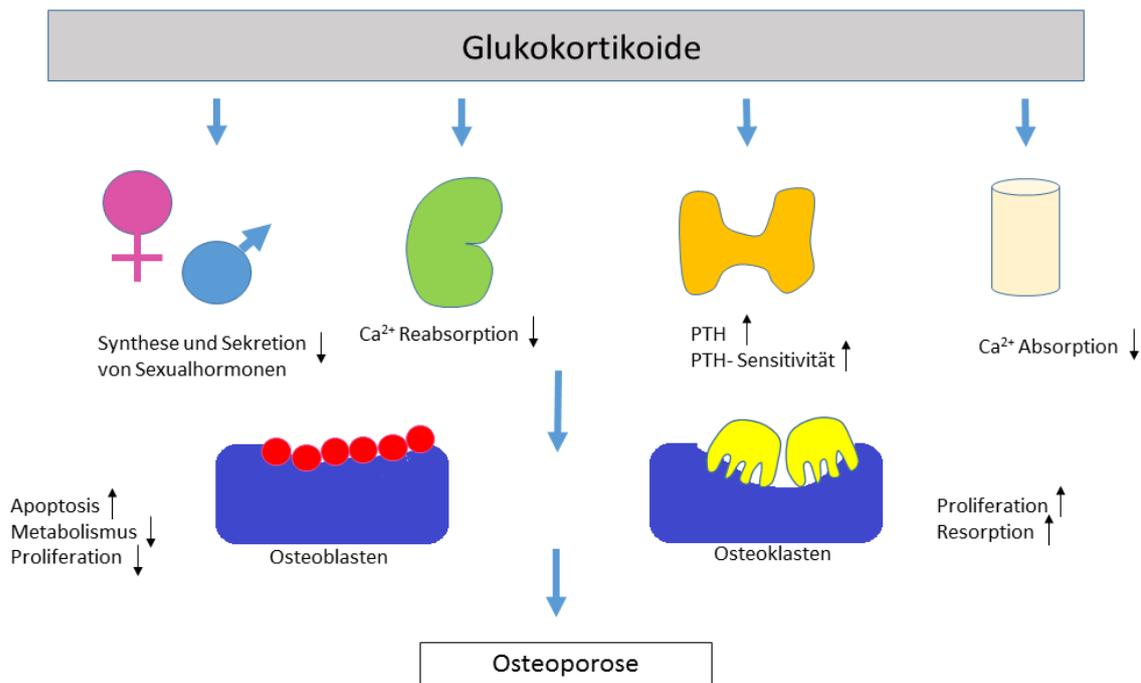


Abbildung 4: Modifiziert nach Patschkan et al. (2001). Wirkungsweisen endogener/exogener Glukokortikoide im Knochenstoffwechsel. Niere, Schilddrüse, Darm und Knochen sind jeweils grün, orange, rosa bzw. blau dargestellt.

Schätzungsweise erleiden 50% aller Patienten unter Langzeittherapie mit Glukokortikoiden eine Fraktur (WARRINER und SAAG 2013). Somit wird deutlich, welchen negativen Einfluss Glukokortikoide auf den Knochenstoffwechsel haben und dass insbesondere bei älteren Patienten präventive Maßnahmen zum Schutz vor Osteoporose ergriffen werden sollten.

2.3 Interaktion zwischen Knochen- und Energiestoffwechsel

Diabetes mellitus, insbesondere Diabetes mellitus Typ II ist eine häufige metabolische Erkrankung mit weltweit steigender Prävalenz (HAMANN et al. 2012). Es sind zahlreiche sekundäre Komplikationen wie Angiopathien oder Neuropathien infolge eines Insulinmangels (Diabetes mellitus Typ I) oder einer Insulinresistenz (Diabetes mellitus Typ II) bekannt. Auch der Knochenstoffwechsel erscheint hiervon sekundär betroffen, da unabhängig von Diabetestyp eine erhöhte Frakturneigung besteht (AHMED et al. 2006; VESTERGAARD et al. 2009). Diabetes mellitus gehört somit zu den eine sekundäre Osteoporose auslösenden Endokrinopathien. Interessanterweise zeigen die beiden Diabetes-Typen eine unterschiedliche Auswirkung auf die Knochenstabilität. Diabetes mellitus Typ I geht vor allem mit einer erniedrigten Knochendichte (BMD) einher. Da dieser Typ häufig im jungen Alter vorkommt, kommt es zu einer erniedrigten Knochenformation und Osteoblastenaktivität während des Wachstums und somit zu einer niedrigen maximalen Knochendichte (*peak bone mass*) (WEBER et al. 1990; HOFBAUER et al. 2007). Dahingegen ist die Knochendichte (BMD) beim Diabetes mellitus Typ II zwar normal bis sogar erhöht, jedoch zeigen die Patienten eine schlechtere Knochenqualität, was wiederum die Frakturneigung begünstigt (VESTERGAARD et al. 2009). Ein wichtiger Faktor für die Entstehung eines Typ II Diabetes ist die Adipositas. Adipositas und Dyslipidämie stellen entscheidende Risikofaktoren für den Krankheitskomplex des metabolischen Syndroms dar, was mit einer erhöhten Insulinresistenz und somit mit einem Diabetes mellitus Typ II einhergehen kann (LOBO 2008).

Die zugrunde liegenden Pathomechanismen zwischen Diabetes mellitus, metabolischem Syndrom, niedriger Knochendichte und erhöhter Frakturneigung sind noch nicht vollständig geklärt (HAMANN et al. 2012). Ein wichtiger Faktor stellt das Östrogendefizit der postmenopausalen Frau dar, denn neben den positiven Effekten auf den Knochenmetabolismus regulieren Östrogene zudem den Energiehaushalt. Östrogendefizite führen zu erhöhten Mengen an intraabdominalem Fett, Glukoseintoleranz und Insulinresistenz (LOUET et al. 2004; KAAJA 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Vitamin D-Mangel durch Regulation der Calcium- und

Literaturübersicht

Phosphathomöostase nicht nur zu einer Mineralisationsstörung im Knochen führt, sondern insbesondere durch den hervorgerufenen Calciummangel auch Einfluss auf die Insulinsekretion und Ansprechbarkeit im insulinabhängigen Gewebe hat (MAESTRO et al. 2000; MUSCOGIURI et al. 2012). In den letzten Jahren konnte man verschiedene Moleküle ausfindig machen, die für die Interaktion von Knochen- und Energiestoffwechsel weiterhin verantwortlich sind. Es wurde schon länger angenommen, dass Insulin einen anabolischen Effekt auf Osteoblasten besitzen muss, da Patienten mit Diabetes mellitus Typ I eine verminderte Knochenformation im Gegensatz zu Typ II Diabetes Patienten zeigen. Jedoch ist der Einfluss von Glukosetoxizität und anderen Diabetes- assoziierten Komplikationen wie Angiopathien nicht bekannt (HOFBAUER et al. 2007).

Eine wichtige Rolle spielt in diesem Zusammenhang das Osteocalcin. Es handelt sich um ein nicht-kollagenes Protein, welches von Osteoblasten spezifisch gebildet wird und in der extrazellulären Matrix für die Anlagerung von schwerlöslichen Hydroxylapatit verantwortlich ist. Hierzu muss Osteocalcin carboxyliert werden. Aufgrund des Grades der Carboxylierung kann man neben Osteocalcinfragmenten, zwei verschiedene Formen unterscheiden: das carboxylierte Osteocalcin, welches in die Knochenmatrix eingelagert wird und als inaktiv gilt oder die untercarboxylierte Form. Diese untercarboxylierte Form (auch als decarboxylierte Form bezeichnet) des Osteocalcin gilt als aktive Form (SHAO et al. 2015). Ein kleiner Teil des untercarboxylierten Osteocalcin wird in die Zirkulation abgegeben und ist endokrin tätig (HAUSCHKA et al. 1989; GONCIULEA und BEUR 2015). Osteocalcin galt aufgrund der spezifischen Produktion durch Osteoblasten lange nur als Marker der Knochenformation. Allerdings konnte durch Mausmodelle, wie bei Osteocalcin-defizitären Mäusen gezeigt werden, dass ein Osteocalcin-Mangel zu Adipositas, verminderter Proliferation von β -Zellen im Pankreas, einer Glucose-Intoleranz sowie Insulinresistenz führt (LEE et al. 2007).

Es ist bekannt, dass Osteoblasten Insulin-Rezeptoren (InsR) exprimieren (FULZELE et al. 2010; CLEMENS und KARSENTY 2011). Durch Studien an Mäusen mit defizitärem Insulin-Rezeptor (InsR) der Osteoblasten konnten weitere Nachweise für die Interaktion zwischen Knochen- und Energiemetabolismus erbracht werden. Diese

Literaturübersicht

Mäuse zeigten eine verminderte Insulinsekretion, verminderte Insulinsensitivität und beeinträchtigte Glukosetoleranz. Die Mäuse waren adipös und im Serum ließ sich eine niedrige Konzentration von decarboxylierten Osteocalcin nachweisen (FERRON et al. 2010). Schlussfolgernd zeigt sich somit, dass Insulin an Osteoblasten eine vermehrte Osteocalcinaktivität bewirkt mit Einfluss auf die Glukose-Homöostase. Interessanterweise fand die Arbeitsgruppe heraus, dass eine gesteigerte Osteocalcinaktivität auch die osteoklastäre Knochenresorption und deren Regulation durch Osteoblasten beeinflusst. Defizitäre InsR-Mäuse zeigten in der Studie eine ausgeprägte Verminderung des Knochenresorptionsmarkers C-terminales Kollagen Crosslinks (CTX). Dies lässt auf einen Zusammenhang zwischen Insulin, Osteoblasten und Knochenresorption schließen. In der gleichen Studie konnte bei Insulinrezeptor-defizitären Mäusen eine zweifach höhere Konzentration an Osteoprotegerin (OPG), das als Inhibitor der Osteoklastengenese fungiert, gezeigt werden (FERRON et al. 2010). Insulin hat somit Einfluss auf die Knochenresorption. Die Knochenresorption spielt in Zusammenhang mit der Osteocalcinaktivierung eine wichtige Rolle, da ein niedriger pH-Wert in den Resorptionslakunen des Knochens für die Decarboxylierung von Osteocalcin notwendig ist. Nur das decarboxylierte (untercarboxylierte) Osteocalcin gelangt in den Kreislauf und ist endokrin tätig. Entsprechend dem niedrigen oder hohen Insulinsignal an Osteoblasten kommt es zu einer resorptionsabhängigen- Hemmung oder Steigerung des Glukose-Metabolismus.

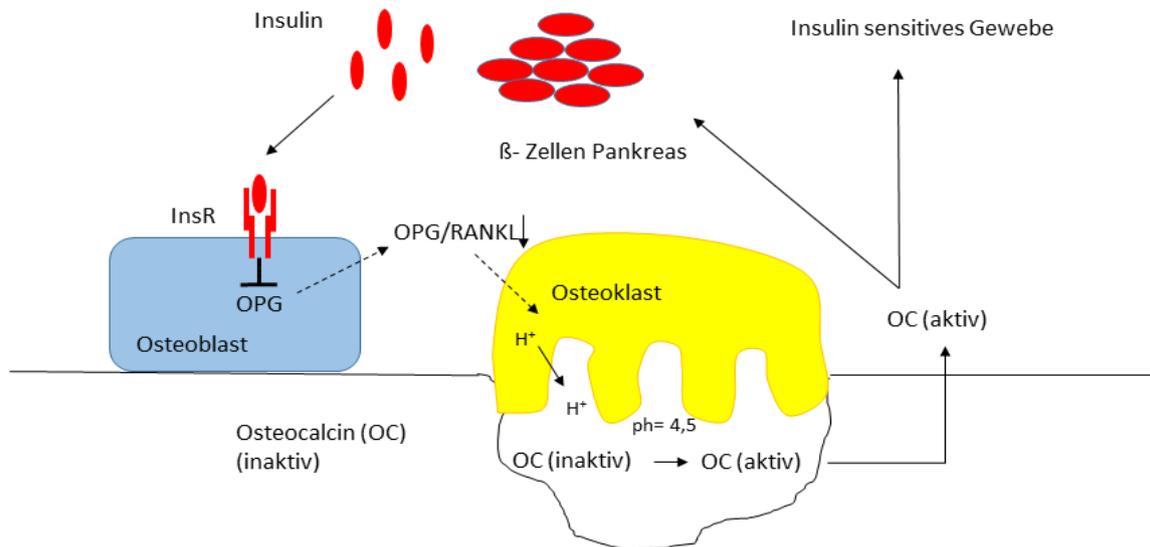


Abbildung 5: Modifiziert nach Clements und Karsenty (2011): Interaktion zwischen Knochen- und Energiestoffwechsel. Insulin bewirkt über den Insulinrezeptor (InsR) an Osteoblasten eine Hemmung der Osteoprotegerin (OPG)-Expression. Dadurch kann RANKL weniger durch OPG gebunden werden und aktiviert somit die Resorption durch Osteoklasten. Wasserstoffionen strömen in die Resorptionslakunen ein und senken den pH-Wert. Dadurch wird das carboxylierte, inaktive Osteocalcin in die aktive decarboxylierte Form überführt. Die aktive Form gelangt in den Kreislauf und stimuliert die Insulinsekretion durch β-Zellen des Pankreas und erhöht die Insulinsensitivität. Abk: OPG: Osteoprotegerin, InsR: Insulinrezeptor, RANKL: receptor activator of NF-κB ligand, OC: Osteocalcin.

Ein weiteres wichtiges Hormon, das in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt, ist das Leptin. Leptin gilt als Inhibitor des Insulin-Osteocalcin-Regelkreis (GONCIULEA und BEUR 2015). Es wird vorwiegend von Adipozyten exprimiert und sorgt für eine Appetitzügelung bei ausreichendem Fettdepot und somit für die Regulierung des Fettstoffwechsels bei Mensch und anderen Säugetieren. Neben dieser Aufgabe wirkt es als Regulator der Knochenformation durch einen komplexen Mechanismus über das zentrale Nervensystem. Hierbei wird die Wirkung des sympathischen

Nervensystems auf den adrenergen Rezeptor (β 2-Rezeptoren) der Osteoblasten durch Leptin gesteuert (TAKEDA et al. 2002). Hohe Mengen Leptin sorgen für eine verminderte Knochenformation mit gleichzeitig vermehrter Expression von RANKL, das eine vermehrte Osteoklastendifferenzierung zur Folge hat (ELEFTERIOU et al. 2005). In Ergänzung dazu, konnten Studien an Leptin-defizitären Mäusen einen Hypogonadismus und gesteigerte Knochendichte zeigen (DUCY et al. 2000).

Neben einigen Tiermodellen konnte auch in humanmedizinischen Studien eine negative Korrelation zwischen decarboxylierten Osteocalcin und *Body Mass Index* (BMI), Insulinresistenz, Insulinsekretion, Leptinkonzentration, Triglyzeridkonzentration und Glukosekonzentration festgestellt werden (KINDBLOM et al. 2009; HWANG et al. 2009; SALEEM et al. 2010). Weiterhin konnten niedrige Osteocalcinwerte bei Diabetes Typ II Patienten gefunden werden (KANAZAWA et al. 2011).

Das Skelettsystem wirkt somit durch eine Form des Osteocalcins als endokrines Organ und spielt eine entscheidende Rolle im Energiemetabolismus. Dies gilt insbesondere für den Glukosestoffwechsel durch den positiven Effekt auf die β -Zell- Proliferation, Insulinsekretion und Insulinsensitivität (SHAO et al. 2015).

2.4 Diagnostik

Der Dachverband Osteologie (DVO) empfiehlt in seinen Leitlinien von 2014 die Durchführung einer Basisdiagnostik bei postmenopausalen Frauen und Männern ab dem 60. Lebensjahr, die sogenannte niedrig traumatische Frakturen, Krankheiten, bei denen das Frakturrisiko unmittelbare therapeutische Konsequenzen hat sowie ein erhöhtes Frakturrisiko durch Risikofaktoren nach DVO aufweisen. (DACHVERBAND OSTEOLOGIE e.V. 2014). Eine weitere Empfehlung für die Durchführung einer Basisdiagnostik wird für Frauen ab dem 60. Lebensjahr und Männer ab dem 70. Lebensjahr gegeben, die bestimmte Faktoren aufweisen wie Rauchen, Immobilität, hochdosierte Gabe von Glukokortikoiden (inhalativ) oder einen Diabetes mellitus Typ II. Laut DVO Leitlinien sollten generell Frauen ab dem 70. Lebensjahr sowie Männer ab dem 80. Lebensjahr aufgrund des ab diesem Alter erhöhten Frakturrisikos einer Basisdiagnostik unterzogen werden (DACHVERBAND OSTEOLOGIE e.V. 2014).

Die Basisdiagnostik basiert auf einer ausführlichen Anamnese, dem klinischen Befund, einer Osteodensitometrie sowie einem Basislabor. Es können ggf. auch andere bildgebende diagnostische Mittel bei klinischen Hinweisen auf osteoporotische Wirbelkörperfrakturen angewendet werden.

Die ausführliche Anamnese sowie die klinische Evaluation kann anhand bestimmter Symptomatik (Schmerzen in der Wirbelsäule, „Tannenbaumphänomen“ d.h. typische durch Verminderung der Körpergröße auftretende Hautfaltung am Rücken) schon Hinweise auf eine Osteoporose geben. Die Anamnese ist zudem für die Interpretation labormedizinischer Resultate auch in Bezug auf andere Grunderkrankungen unerlässlich.

2.4.1 Knochendichtemessung (Osteodensitometrie)

Nach der Osteoporosedefinition der WHO empfehlen die Leitlinien des Dachverbandes Osteologie 2014 eine Knochendichtebestimmung mittels *Dual-energy x-ray absorptiometry* (DXA) (DACHVERBAND OSTEOLOGIE e.V. 2014). Beim DXA handelt es sich um ein röntgenologisches Verfahren zur Bestimmung der Körperzusammensetzung. Das Messprinzip beruht auf der Anfertigung zweier Aufnahmen mit unterschiedlicher Röntgenenergie, wobei man sich die gewebeabhängige Resorption verschiedener Wellenlängen zunutze macht. Mit Hilfe eines Detektors werden die wieder ankommenden Röntgenstrahlen erfasst und mit einer entsprechenden Computer-Software verarbeitet. Über die charakteristische Abschwächung der Röntgenstrahlen lässt sich eine Aussage über die Gewebeart (Knochen, Muskel- und Fettgewebe) treffen. Durch Subtraktion des Weichteilgewebes (Muskel- und Fettgewebe) wird das Skelett als Fläche abgebildet und das Ergebnis als „*bone mineral density*“ (BMD) = Masse pro Fläche (g/cm^2) angegeben (GUGLIELMI et al. 2011). Weitere Parameter, die die Software in diesem Zuge erstellt sind: „*bone mineral content*“ (BMC) in g, Körperfettanteil in % und Muskelmasse in g. Neben der Messung des Gesamtkörpers können für die Analyse durch Projektion bestimmter Skelettanteile die „*Region of Interest*“ (ROIs) festgelegt werden. Empfohlene Messorte für die Diagnose der Osteoporose sind die Lendenwirbelsäule (LWS und hier die

Literaturübersicht

Lendenwirbel L1–L4) und der proximale Femur (Gesamtfemurregion „total hip“) (DACHVERBAND OSTEOLOGIE e.V. 2014).

Der BMD wird in Bezug auf die Standardabweichung als *T*- oder *Z*-Score ausgedrückt. Der *T*-Score beschreibt die Abweichung des Messwertes vom Mittelwert einer standardisierten Gruppe von jungen Erwachsenen zwischen 20 - 30 Jahren in Bezug auf die maximale Knochendichte (GUGLIELMI et al. 2011). Der Normalbefund liegt bei einem *T*-Score von 0 bis - 1 Standardabweichungen (siehe Definition Osteoporose). *T*-Score-Werte von - 2,5 und darunter sind als eindeutig pathologisch und somit als Kriterium der Osteoporose anzusehen. Der *Z*-Score gibt die Abweichungen des BMD des Patienten zum Mittelwert einer alters- und geschlechtsangepassten Population wider. Der *Z*-Score sollte demnach vor allem für die Beurteilung der Knochendichte von jüngeren Frauen und Männern sowie für Kinder angewendet werden (Writing Group for the ISCD 2004).

Die Vorteile in der DXA-Messung liegen in der niedrigen Strahlendosis, geringem Kostenaufwand, einfacher Anwendung und schnellem Ergebnis. Jedoch ist die fehlende Differenzierung zwischen Kortikalis und Spongiosa wie sie bei anderen Messtechniken wie der quantitativen Computertomographie (qCT) möglich ist, als Nachteil zu nennen (GUGLIELMI et al. 2011). Eine zusätzliche Limitation ist die integrale Messung des zu untersuchenden Skelettareals, da nicht immer sicher unterschieden werden kann ob, verkalkte Strukturen (Lymphknoten, Muskelanteile) in die Messung mit eingehen (BARTL und GRADINGER 2009).

Neben der Knochendichtebestimmung wird das DXA immer häufiger auch zur Bestimmung der Körperzusammensetzung insbesondere hinsichtlich der Fettverteilung angewendet. Es dient hier der Evaluierung des Ernährungsstatus und somit auch der Gesundheit, da bekannt ist, dass vor allem abdominale Fettleibigkeit ein erhöhtes Risiko für Diabetes mellitus Typ II oder koronare Herzerkrankungen darstellt (ANDREOLI et al. 2009).

Obwohl die aktuellen DXA-Geräte eine Richtigkeit von 2 - 6% sowie eine Präzision von 1 - 3% aufweisen und sich in der Regel gut für Kontrollmessungen eignen (BARTL und GRADINGER 2009), sollte wie bei jedem Messverfahren beachtet werden, dass Messgenauigkeiten vom Messprinzip und Gerät abhängig sind (BINKLEY et al. 2005).

Daher ist die Qualitätssicherung und Kalibrierung von entscheidender Bedeutung, um eine möglichst gute Wiederholbarkeit zu erreichen.

2.4.2 Basislabor

Das Basislabor dient der Abgrenzung einer sekundären Osteoporose oder anderen zugrunde liegenden Osteopathien wie beispielweise der Osteomalazie von der primären Osteoporose. Nach den DVO Leitlinien stellt das Basislabor ebenfalls eine Überprüfung von Kontraindikationen für eine medikamentöse Therapie dar (Dachverband Osteologie e.V. 2014).

Zum einfachen Basislabor gehören folgende Parameter:

Differentialblutbild, Calcium (Serum), Phosphat (Serum), Alkalische Phosphatase (AP)(Serum), Gamma-GT, Kreatinin-Clearance, Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), C-reaktives Protein (CRP), Serumelektrophorese sowie eine fraktionierte Calciumausscheidung im Urin (SCHULTE 1997; Dachverband Osteologie e.V. 2014). Diese Parameter sind in der Regel bei der primären Osteoporose ohne besonderen Befund (SCHULTE 1997). Anhand des Differentialblutbildes, der CRP-Konzentration, der Blutsenkungsgeschwindigkeit und der Serumelektrophorese können systemische Infektionserkrankungen, aber auch Neoplasien wie das Multiple Myelom ausgeschlossen, bzw. als weniger wahrscheinlich erachtet werden. Die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase (AP) kann auf eine Skeletterkrankung wie Rachitis, Osteomalazie, Vitamin D-Mangel bedingte Knochenerkrankungen, Knochenmetastasen oder das Multiple Myelom hinweisen. In Zusammenhang mit einer Erhöhung der Gamma-GT kann diese auch für eine hepato-biliäre Erkrankung sprechen (THOMAS 2012). Die Kreatinin-Bestimmung dient der Diagnostik einer Nierenerkrankung und weist erhöhte Werte bei renaler Osteopathie auf.

2.4.2.1 Elektrolyte

Calcium und Phosphat werden in der Osteoporosediagnostik hauptsächlich zur Beurteilung einer sekundären Osteoporose infolge eines Hyperparathyreodismus (primär/sekundär) bestimmt (Dachverband Osteologie e.V. 2014). Eine Hypercalcämie kann in diesem Zusammenhang auf einen primären Hyperparathyreoidismus aufgrund

Literaturübersicht

einer Überproduktion von PTH infolge eines Adenoms der Nebenschilddrüse hinweisen. Das Phosphat liegt hierbei durch den Einfluss des PTH unter dem Referenzbereich (Hypophosphatämie). Bei einem sekundären Hyperparathyreodismus liegt charakteristischerweise eine Hypocalcämie bei erhöhtem PTH-Spiegel vor. Ursache sind vor allem Nierenerkrankungen, die mit einem Vitamin D-Mangel einhergehen (PREMAOR und COMPSTON 2012). Eine Hypocalcämie, Hypophosphatämie und erhöhte Alkalische Phosphatase im Serum sprechen mit hoher Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Osteomalazie. In den meisten Fällen der Osteomalazie findet sich eine niedrige Konzentration von 25-Hydroxyvitamin D und erhöhte PTH-Konzentration im Serum (PREMAOR und COMPSTON 2012).

Auch andere Erkrankungen, die in Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel stehen, können zu einer Hypercalcämie führen und müssen abgeklärt werden. Hierzu zählen insbesondere Neoplasien wie das Multiple Myelom oder auch Metastasen von Mamma- oder Bronchialkarzinomen. Hierbei kommt es in der Regel zu osteolytisch-induzierten Hypercalcämien. Eine andere Differentialdiagnose ist eine Vitamin D-Überdosierung. Hierbei befindet sich das Phosphat im Referenzbereich oder ist erhöht (THOMAS 2012).

Neben den beiden Hauptelektrolyten Calcium und Phosphat, ist auch die Bestimmung von Magnesium bezüglich des Knochenstoffwechsels wichtig. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein Magnesiummangel neben neuromuskulären Erkrankungen, Insulinresistenz und Eklampsie, ein Faktor für die Entwicklung von Knochenstoffwechselerkrankungen wie der Osteoporose ist (ORCHARD et al. 2014). Im Rattenmodell wurde eine verminderte Osteoblastenfunktion und erhöhte Osteoklastenaktivität durch einen Magnesiummangel hervorgerufen. Histomorphologisch konnte ein Knochenverlust detektiert werden (RUDE et al. 2009). Die Bestimmung von Calcium, Phosphat und Magnesium im Serum dient ebenfalls der Abschätzung der nutritiven Versorgung und gegebenenfalls notwendigen Supplementierungen (BRONNER 1994; NORDIN 1997).

2.4.2.2 Calcium- und Phosphatbestimmung im Urin

Neben der Bestimmung im Serum kann die Calcium/bzw. Phosphatausscheidung im Urin herangezogen und als Bestandteil der Basisdiagnostik angegeben werden (SCHULTE 1997). Hierfür wird die Untersuchung von 24h Sammelurin empfohlen (TOUITOU et al. 2010). Eine Messung aus 2h Sammelurin morgens zwischen 8:00-10:00 Uhr für die Bestimmung des Calcium/Kreatinin- Verhältnisses oder Phosphat/Kreatinin Clearance ist ebenfalls möglich (THOMAS 2012).

Die tägliche physiologische intestinale Calciumaufnahme entspricht den Mengen, die über Faeces und Urin verloren gehen (COE und FAVUS 1992). Kommt es nun zu einer gesteigerten Calciumausscheidung im Urin ohne vermehrten Calciumgehalt in der Diät, können folgende Pathomechanismen zugrunde liegen: erhöhte intestinale Calcium- Absorption, vermehrte Resorption von Calcium aus dem Skelett oder verminderte renal-tubuläre Calcium-Reabsorption. Häufige sekundäre Ursachen für eine Hypercalcurie stellen beispielweise Vitamin D-Therapien oder der primäre Hyperparathyreodismus dar. Des Weiteren sind genetische Störungen beschrieben, die eine verminderte renale tubuläre Calcium-Reabsorption verursachen (GIANNINI et al. 2005). Die renale Phosphatausscheidung kann ebenfalls bestimmt werden. Eine gesteigerte Phosphatausscheidung entsteht häufig als Folge eines gesteigerten PTH-Effektes durch einen Hyperparathyreodismus. Die Phosphatausscheidung ist ansonsten ebenfalls von Nahrungszufuhr, glomerulärer Filtrationsrate (GFR) und tubulärer Phosphat- Reabsorption abhängig.

2.4.2.3 Hormone

Bei Verdacht auf eine endokrinologische Ursache der Osteoporose sollten Hormonbestimmungen erfolgen. Liegen Abweichungen in der Calcium- und Phosphathomöostase vor, ist vor allem eine Bestimmung von Vitamin D und Parathormon indiziert, da beide Hormone als Hauptregulatoren gelten. Eine Interpretation der Calcium- und Phosphatkonzentrationen ist nur in Zusammenhang mit diesen Hormonen möglich (siehe oben).

Die Indikation einer PTH-Bestimmung liegt somit in der Unterscheidung zwischen Hyperparathyreodismus und anderen Formen der Hypercalcämie. Zudem wird es bei

Vitamin D- Mangel bestimmt. Für die PTH-Bestimmung wird eine Blutentnahme morgens bis ca. 10:00 Uhr empfohlen, da für PTH eine leichte Pulsatilität und eine zirkadiane Rhythmik mit höheren Werten am Abend beschrieben ist (THOMAS 2012).

Der Vitamin D Status wird mithilfe der 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration im Serum untersucht. Das 25-Hydroxyvitamin D repräsentiert den Gehalt an verfügbarem Vitamin D für den Organismus. Eine Bestimmung der aktiven Form 1,25-Dihydroxyvitamin D ist bei normalen Werten nicht erforderlich (BINKLEY et al. 2006). Das 25- Hydroxyvitamin D spiegelt die Nahrungszufuhr und die Bildung in der Haut wieder. Es ist zu beachten, dass die Werte stark individuell (z.B. Alter, Hautpigmentation) und von ökologischen Faktoren (z.B. Jahreszeit) abhängig und somit schwer mit einer Referenzgruppe vergleichbar sind (MOSEKILDE 2005). Ein häufig verwendeter Grenzwert für die Bezeichnung einer Vitamin D-Insuffizienz liegt bei < 50 nmol/l. Von einem Vitamin D-Defizit wird in der Regel bei Werten < 25 nmol/l gesprochen (LIPS 2001). Es konnte eine Assoziation zwischen 25- Hydroxyvitamin D-Werten von < 30 nmol/l und sekundären Hyperparathyreodismus sowie erniedrigtem Knochenumbau bei älteren Frauen gezeigt werden (OOMS et al. 1995). Es wird eine morgendliche Blutentnahme aus Serum oder Plasma empfohlen. Nach DVO Leitlinien sollte eine Vitamin D-Messung bei labordiagnostischen Hinweisen auf eine Osteomalazie, bei klinischem Verdacht, bei bestimmten Bevölkerungsgruppen sowie unter Vitamin D-Substitutionstherapie erfolgen. Auch Niereninsuffizienzen oder gastrointestinale Erkrankungen stellen eine Indikation dar (DACHVERBAND OSTEOLOGIE e.V. 2014).

Hormone wie Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH) zur Diagnostik einer Hyperthyreose, Follikelstimulierendes Hormon (FSH) für gonadale Störungen oder Cortisol bei Verdacht auf Morbus Cushing können zum Ausschluss anderer auslösender Erkrankungen bestimmt werden.

2.4.2.4 Marker des Knochenstoffwechsels

Neben der beschriebenen Basisdiagnostik können spezifische biochemische Marker Aufschluss über die Knochenstoffwechselaktivität geben. Hierbei handelt es sich um

Literaturübersicht

Enzyme oder Knochenstoffwechselprodukte, die beim Knochenumsatz entstehen und in erhöhter/bzw.- erniedrigter Konzentration im Serum oder Urin vorliegen. Sie reflektieren somit die Zellaktivität der Knochenformation und -Resorption (CHOPIN et al. 2012). Knochenmarker sind nicht krankheitsspezifisch (SCHULTE 1997). In der Osteoporosediagnostik finden sie insbesondere Anwendung zur Beurteilung einer *High-turnover-Osteoporose*, gesteigerten Resorption mit fortschreitendem Verlust an Knochensubstanz sowie zur Beurteilung der Knochenbeteiligung bei Glukokortikoidtherapie. Neben der Diagnostik werden Knochenmarker zunehmend in der Therapiekontrolle eingesetzt (THOMAS 2012; BIEGLMAYER et al. 2012). Biochemische Knochenmarker werden weiterhin beim Verdacht auf Osteomalazie/Rachitis zum Monitoring von Dialysepatienten (Vermeiden eines *low-* und eines *high-turnovers*) bestimmt. Weiterhin dienen sie der Abschätzung der Knochenbeteiligung bei einem Hyperparathyreodismus.

Die biochemischen Marker werden anhand des metabolischen Vorganges, in dem sie entstehen, eingeteilt. Somit lassen sich Knochenformations- und Knochenresorptionsmarker unterscheiden. Im folgenden Teil wird insbesondere auf die Marker eingegangen, die in dieser Studie verwendet worden sind. Andere Knochenmarker werden kurz dargestellt.

Literaturübersicht

Marker der Knochenformation	
Knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP)	Enzym, Nebenprodukt der Osteoblasten
Osteocalcin (OC)	Nicht-kollagenes Protein, produziert von Osteoblasten, auch als Umsatzmarker bezeichnet
C-terminales Propeptid des Typ I Prokollagen (PICP)	Produkt von proliferierenden Osteoblasten und Fibroblasten
N-terminales Propeptid des Typ I Prokollagen (PINP)	Produkt von proliferierenden Osteoblasten und Fibroblasten
Marker der Knochenresorption	
Kollagene Proteine	
Pyridinoline (PYD)	Abbauprodukt des Typ I Kollagen (auch als Crosslinks bezeichnet)
Desoxypyridinoline (DPD)	Abbauprodukt des Typ I Kollagen (auch als Crosslinks bezeichnet)
Amino-terminales Telopeptid von Typ I Kollagen (NTX)	Abbauprodukt des Typ I Kollagen (große Fraktion)
Carboxy-terminales Telopeptid von Typ I Kollagen (CTX)	Abbauprodukt des Typ I Kollagen (große Fraktion)
Nicht-kollagene Proteine	
Tatratresistente saure Phosphatase (TRAP 5b)	Enzym, Osteoklasten-Nebenprodukt
Cathepsin K (CatK)	Enzym, Osteoklasten-Nebenprodukt, gilt auch als Umsatzmarker

Literaturübersicht

Sonstiges	
Sklerostin	Antagonist im Wnt-Signalweg, produziert von Osteozyten, Inhibitor der Knochenformation
Dickkopf-1 (DKK-1)	Antagonist im Wnt-Signalweg, Inhibitor der Knochenformation
Bone Sialoprotein (BSP)	Phosphoriliertes Glykoprotein, Produkt von Osteoblasten, Odontoblasten und Osteoklasten-ähnlichen Zellen, Ausgangspunktmatrix für Hydroxylapatitkristalle
Osteonectin (ON)	Knochenmineralisation, Kollagenbindung
Osteopontin (OP)	Adhäsionsmolekül von Osteoklasten an die Knochenmatrix

Tabelle 4: Modifiziert nach Obermayer-Pietsch (2013) und Seibel (2005). Überblick über aktuell klinisch eingeführte Biomarker des Knochenstoffwechsels in der Humanmedizin.

Es gibt einige neue potentielle Marker, die derzeit aber noch nicht für die Routinediagnostik zur Verfügung stehen. In Zukunft jedoch, sollen diese für eine noch bessere Evaluierung der Knochenstoffwechselsituation dienen. Hierbei handelt es sich beispielhaft um die Marker: *β 3-Integrin*: Adhäsionsmolekül der Knochenmatrix; *Runx2*: Marker der osteoblastären Differenzierung und *Klotho*: Marker des Calcium-Phosphat Metabolismus (OBERMAYER-PIETSCH 2013).

2.4.2.4.1 Marker der Knochenformation

Knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP)

Das von Osteoblasten gebildete membranständige Enzym spielt eine wichtige Rolle in der Osteoidformation und Mineralisation (HARRIS 1990). Die genaue Funktion ist bis heute jedoch noch unklar. Die knochenspezifische alkalische Phosphatase macht als Isoenzym etwa 50% der gesamten alkalischen Phosphatase aus (THOMAS 2012). Indikation zur Bestimmung der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase sind die Abklärung verstärkter osteoblastärer Aktivität bei z.B. Frauen mit mehr als 2 Jahren nach der Menopause, Vitamin D-Mangel, Hyperparathyreodismus, Morbus Paget oder Knochentumoren.

BAP steigt mit dem Alter signifikant an. In einer Studie konnte ein postmenopausaler Anstieg von 77% verzeichnet werden (GARNERO und DELMAS 1993). Andere Studien zeigen einen Anstieg von Knochenformationmarkern inklusive BAP von 37 - 52% postmenopausal, wobei die Marker der Knochenresorption noch höhere Werte von 79 - 97% aufweisen (GARNERO et al. 1996b). Weiterhin wurden erhöhte BAP Werte in Korrelation mit einem niedrigen BMD bei postmenopausalen Frauen beschrieben, die mit einem signifikant erhöhten Frakturrisiko einhergehen (ROSS et al. 2000). Allgemein führen Frakturen (z.B. traumatische Frakturen) zu einer Erhöhung der knochenspezifischen Phosphatase. Diese Erhöhung kann in Abhängigkeit zur Frakturgröße bis zu 100 Tage lang bestehen. Interessanterweise findet man in den ersten fünf Tagen nach dem Frakturgeschehen leicht erniedrigte Werte (HERRMANN et al. 1998). Erniedrigte BAP Werte und somit eine verminderte Knochenformation oder Umbaurate konnten auch bei der Gabe von Glukokortikoiden gezeigt werden (VAN STRAALLEN et al. 1991). Allerdings kommt es hierbei erst nach Wochen der Therapie zum Absinken der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase (PERETZ et al. 1996). Insgesamt ist dieser Marker der Knochenformation recht träge.

Aufgrund seines spezifischen Charakters bezüglich der Knochenformation sowie der relativ einfachen und kostengünstigen Bestimmung (SEIBEL 2000) wird BAP häufig im Monitoring der Osteoporose und anderen Erkrankungen eingesetzt.

Osteocalcin

Osteocalcin ist ein nicht-kollagenes Protein und wird auch als *bone- γ -carboxy-acid-containing-protein* (BGP, bone Gla-Protein) bezeichnet. Es wird von aktiven Osteoblasten in der Matrix-Mineralisationsphase gebildet und durch 1,25-Dihydroxycholecalciferol reguliert (THOMAS 2012). Zum größten Teil wird es in die organische Matrix unter der Abhängigkeit von Vitamin K eingebaut. Geringe Mengen (20 - 30%) an freiem Osteocalcin gelangen in die Zirkulation und werden dort rasch proteolytisch abgebaut (PRICE et al. 1980). In der Regel gilt Osteocalcin als Knochenformationsmarker, jedoch wird es vermehrt als Knochenumbau-marker bezeichnet. Der Grund liegt darin, dass das freie Osteocalcin aus drei Komponenten besteht: 1/3 intaktem Osteocalcin, 1/3 große N-terminale Fragmente und 1/3 in Form von kleinen C-Fragmenten (LEE et al. 2000). Diese Fragmente werden insbesondere bei resorptiven Prozessen in die Zirkulation abgegeben und sprechen somit auch für eine erhöhte Knochenresorption. Sind Knochenformation und Knochenresorption „gekoppelt“, so gilt Osteocalcin (intakt) als Knochenumbau-marker. Im Falle einer Störung des Remodeling-Prozesses wird Osteocalcin (intakt) als Knochenformationsmarker interpretiert, da es eng mit der Osteogenese verbunden ist (ZAITSEVA et al. 2015). Osteocalcin gilt ansonsten als „Spätmarker“ der Osteoblastenaktivität (BIEGLMAYER et al. 2012). Erhöhte Serumwerte sind meist Folge eines vermehrten Knochenumsatzes wie z.B. bei der *High-turnover-Osteoporose*, dem primären Hyperparathyreodismus und Morbus Paget (THOMAS 2012; ZAITSEVA et al. 2015). In Ergänzung dazu konnte eine Studie anhand vergleichender knochenhistologischer Messungen der Osteoidmenge zeigen, dass sich bei Patienten mit verminderter Knochenformation (wie bei einer *Low-turnover-Osteoporose*) auch erniedrigte Osteocalcinwerte finden, im Vergleich zur Gruppe mit normalen oder leicht erhöhten Knochenformation (STRACKE et al. 1987). Somit kann der Osteocalcinspiegel im Serum Rückschlüsse geben, ob es sich um eine „*high turnover*“, wie im Falle einer postmenopausalen Osteoporose oder um einen „*low turnover*“ wie bei der senilen Osteoporose handelt. Eine andere Studie konnte jedoch anhand der Osteocalcinwerte keine signifikanten Veränderungen zwischen einer histologisch gesicherten *Low- oder High-turnover-Osteoporose* feststellen (MEHL et

al. 2002). Erniedrigte Werte finden sich beim Einsatz von Glukokortikoiden. Glukokortikoide sind in der Lage innerhalb von 24h ein Absinken von Osteocalcin zu erreichen (PERETZ et al. 1996).

Neben dem intakten Osteocalcin und den Osteocalcinfragmenten kann noch eine weitere Osteocalcinfraction bestimmt werden. Hierbei handelt es sich um das untercarboxylierte Osteocalcin (SEIBEL 2000). Neben Studien, die zeigten, dass ein erhöhtes untercarboxyliertes Osteocalcin im Serum mit einem erhöhten Hüftfrakturrisiko bei älteren Frauen einhergeht (SZULC et al. 1993) oder der Serumspiegel auf die nutritive Versorgung von Vitamin K schließen lassen (SOKOLL und SADOWSKI 1996), konnten neuere Studien den Zusammenhang mit dem Energiestoffwechsel darstellen. Wie zuvor beschrieben gilt untercarboxyliertes Osteocalcin als Hormon, welches den Glukose- und Fettstoffwechsel beeinflusst (STRAPAZZON et al. 2011). Näheres wurde im Kapitel 2.3 bereits geschrieben.

Es ist bei der Osteocalcinbestimmung im Allgemeinen darauf zu achten, dass die Serumkonzentration von der glomerulären Filtrationsrate abhängig ist (THOMAS 2012). Ebenso besteht ein zirkadianer Rhythmus mit hohen Werten in den frühen Morgenstunden.

Prokollagene (PICP, PINP)

Die Knochenmatrix besteht zu 90% aus Kollagen Typ I, das von Osteoblasten produziert wird. Auch andere Gewebe bilden zu einem geringen Prozentsatz Kollagen wie beispielweise Haut- oder Knorpelgewebe. Prokollagen stellt die Vorstufe von Kollagen dar und besitzt ein N-terminales und ein C-terminales Ende (BRODSKY und PERSIKOV 2005). Diese Enden werden durch Prokollagenpeptidasen im Verlauf der Kollagenentwicklung in ein Prokollagen N-terminales Propeptid (PINP) und ein C-terminales Propeptid (PICP) abgespalten und gelangen in den Kreislauf. Sie repräsentieren somit die Neusynthese von Typ I Kollagen und stellen einen „Frühmarker“ der Osteoblastenaktivität dar (BIEGLMAYER et al. 2012). Das PINP wird gegenüber dem PICP bevorzugt (THOMAS 2012) und besitzt im Gegensatz zu PICP eine 100-fach höhere Serumkonzentration (ZAITSEVA et al. 2015).

Erhöhte Konzentrationen von PICP und PINC finden sich bei pathologischen Prozessen, die mit einem gesteigerten Knochenumbau, beispielweise Morbus Paget oder primärem Hyperparathyreodismus einhergehen (ZAITSEVA et al. 2015). In der Humanmedizin finden diese weiterhin hohen Einsatz in Bezug auf Therapie-Monitoring der Osteoporose. Hier zeigt sich eine Erniedrigung der Serummarker bei antiresorptiven Therapien (Östrogene und Bisphosphonate) und eine Steigerung der Serumkonzentration bei Einsatz von anabolen Medikamenten (humanes rekombinantes Parathyroidhormon (rPTH)) (GARNERO et al. 2008; HLAING und COMPSTON 2014).

2.4.2.4.2 Marker der Knochenresorption

Pyridinoline (PYD, DPD)

Hierbei handelt es sich um die Kollagen-Quervernetzungsprodukte Pyridinoline (PYD) und Desoxypyridinoline (DPD). Ihre physiologische Funktion ist es, Kollagen durch Quervernetzung der Fibrillen zu stabilisieren. Diese werden deshalb auch als Cross-Links bezeichnet (HLAING und COMPSTON 2014). PYD und DPD werden durch Knochenresorptionsvorgänge proteolytisch aus reifen Kollagen abgebaut und über den Urin ausgeschieden. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen Urinausscheidung der Pyridinoline und histologisch gemessener Knochenresorption gezeigt werden (DELMAS et al. 1991). Somit dienen PYD und DPD als wichtige Resorptionsmarker in der Früherkennung eines gesteigerten Knochenabbaus, v.a. infolge einer postmenopausalen Osteoporose. So zeigen Frauen postmenopausal eine 2-3-fach höhere DPD-Ausscheidung als Frauen vor der Menopause (ZAITSEVA et al. 2015). Neben dem Nachweis anderer Erkrankungen, die mit einer erhöhten Knochenresorption einhergehen, dienen Pyridinoline zur Überwachung des Therapieerfolges im Osteoporose-Monitoring (SRIVASTAVA et al. 2005; REGINSTER et al. 2008).

Pyridinoline unterliegen einem circadianen Rhythmus mit den höchsten Konzentrationen in der Nacht. Aufgrund dessen ist Morgenurin für die Bestimmung am

besten geeignet. UV-Strahlen können die Konzentration im Urin negativ beeinflussen (GERRITS et al. 1995).

Telo peptide des Typ I Kollagen (CTX, NTX)

Telo peptide vom Typ I Kollagen lassen sich in zwei Formen unterteilen: N-terminales Telo peptide (NTX) und C-terminales Telo peptide (CTX) (HLAING und COMPSTON 2014). Diese entstehen wie die vorher beschriebenen Pyridinoline infolge der Degradation von Kollagen Typ I durch Osteoklasten und sind einer der wichtigsten Resorptionsmarker im Knochenstoffwechsel (BAIM und MILLER 2009; ZAITSEVA et al. 2015). Im Gegensatz zu PYD und DPD stellen diese beiden größere Crosslink-Frak tionen dar, so dass es durch Knochenresorptionsvorgänge zu deutlicheren Veränderungen von NTX und CTX im Serum und Urin kommt (THOMAS 2012). Beim CTX unterscheidet man weiterhin in eine nicht- isomerisierte Form: α -CTX und in eine isomerisierte Form: β -CTX. Das β -CTX wird auch als Crosslap bezeichnet. Eine Erhöhung der α -CTX Konzentration spricht für einen vermehrten Abbau von neuem Kollagen, wohingegen ein Anstieg des β -CTX den Abbau des reifen Kollagens widerspiegelt. Der α -CTX/ β -CTX Quotient wird als Index für den Knochenstoffwechsel angegeben. Bei der Osteoporose wurde ein zweifach höherer Index-Wert gefunden (ZAITSEVA et al. 2015). Beide Formen des CTX gehen in erhöhter Konzentration sogar unabhängig vom BMD mit einer erhöhten Knochenfragilität einher (GARNERO et al. 2002). Somit wird der hohe Stellenwert der Telo peptide des Typ I Kollagen in der Osteoporosedagnostik (postmenopausal) sowie maligner Knochenerkrankungen deutlich. Eine erhöhte Konzentration von NTX und CTX bei postmenopausalen Frauen spricht in Zusammenhang mit niedrigen Formationsmarkern für einen erhöhten Knochenumsatz (GARNERO et al. 1996c). Eine Studie zeigte beim Vergleich zwischen Frauen mit diagnostizierter Osteopenie und Osteoporose (Einteilung nach WHO) zu prä- und postmenopausalen Frauen mit physiologischer Knochendichte, signifikant höhere Werte von NTX und CTX in den ersten beiden Gruppen (REGINSTER et al. 2001). Daneben stellte eine Studie fest, dass erhöhte Serum- und Urinwerte ein erhöhtes Frakturrisiko bei älteren Frauen prognostizieren (CHAPURLAT et al. 2000). Interessanterweise zeigten prämenopausale Frauen mit erhöhter

Konzentration der Telopeptide in der nachfolgenden Lebensphase einen signifikant höheren Knochenverlust (IKI et al. 2006). Neben dem diagnostischen Nutzen spielen NTX/CTX vor allem im Therapiemonitoring der Osteoporose eine große Rolle. So finden sich beispielweise bei Langzeitbehandlungen mit Östrogenen erniedrigte Werte von NTX und CTX im Serum und Urin und können somit der Überprüfung des Therapieerfolgs dienen (UEBELHART et al. 1991; SEIBEL et al. 1993; HASSAGER et al. 1994).

Für beide Marker wird aufgrund eines circadianen Rhythmus eine Probenentnahme von Serum und 24h-Urin in den frühen Morgenstunden empfohlen. Nach Studienlage reduzieren „Nüchternwerte“ die circadiane Variation der Messung, so dass die Probenentnahme bei nüchternem Zustand erfolgen sollte (CHRISTGAU 2000).

TRAP 5b

TRAP 5b (Tatratresistente saure Phosphatase Typ 5b) wird zu den Resorptionsmarkern gezählt. Hierbei handelt es sich um eins von fünf Isoenzymen des Enzyms TRAP, das in verschiedenen Geweben wie Milz, Prostata, Knochen und Thrombozyten exprimiert wird (SEIBEL 2000). TRAP 5b wird vor allem von Osteoklasten sezerniert (HALLEEN et al. 2001). Die Konzentration von TRAP 5b im Serum gleicht der Anzahl an aktivierten Osteoklasten (BALLANTI et al. 1997). Um in eine aktive Form überzugehen, benötigt TRAP 5b die Anwesenheit von proteolytischem Cathepsin K. Während der Knochenresorption gelangt TRAP in die Resorptionslakune und bildet neben der enzymatischen Aktivität, freie Radikale, die zusätzlich für einen weiteren Abbau der organischen Knochenmatrix sorgen (BIEGLMAYER et al. 2012). Die Aktivität von TRAP 5b wird im Gegensatz zu anderen Tatratresistenten sauren Phosphatasen nicht stark von der Nierenfunktion beeinflusst (HLAING und COMPSTON 2014). Die Bestimmung wird vor allem im Therapiemonitoring eingesetzt. Einige Studien konnten zeigen, dass TRAP 5b bei Therapie der Osteoporose mit dem Biphosphonat Alendronat nach 3 Monaten einen vergleichbaren signifikanten Abfall zeigt wie andere Resorptionsmarker, beispielweise CTX (NENONEN et al. 2005). Andere Studien besagen dagegen, dass die Antwort auf antiresorptive Prozesse im Therapie-Monitoring im Gegensatz zu anderen

Resorptionsmarkern niedriger ausfällt, es jedoch dennoch zu einem signifikanten Abfall kommt (HANNON et al. 2004).

Cathepsin K

Cathepsin K ist ein Mitglied der Cystein-Proteasen und wird von Osteoklasten gebildet und dort in Lysosomen gespeichert. Durch Aktivierung der Osteoklasten wird Cathepsin K und andere Matrix-Metalloproteinasen (MMP) über das endoplasmatische Retikulum transportiert und in die Resorptionslücke sezerniert. Die Cathepsin K-Produktion wird durch Faktoren wie RANKL oder IL 1 gesteigert. Eine inhibitorische Wirkung haben dagegen Östrogene und OPG (TROEN 2006). Im extrazellulären Raum bewirkt Cathepsin K eine Spaltung der helikalen Anteile als auch der Telopeptide des Typ I Kollagen und spielt somit eine wichtige Rolle im Degradierungsprozess der organischen Matrix während der Knochenresorption (SEIBEL 2005). Wie wichtig Cathepsin K für die Osteoklastenaktivität und somit für das Knochen-Remodeling ist, konnten Mausmodelle zeigen. Eine Studie konnte bei Cathepsin K-defizitären Mäusen ein osteopetrotisches Erscheinungsbild mit exzessiver trabekulärer Knochenbildung nachweisen. Das heißt, ohne Cathepsin K ist eine Knochenresorption und somit ein physiologisch ablaufender Knochen-Remodeling-Prozess nicht möglich (SAFTIG et al. 1998). Diese Aussage spiegelt sich auch in der Erkrankung Pyknodysostose wider. Hierbei handelt es sich um eine autosomal-rezessive Erkrankung mit einem Defekt des Cathepsin K-Gens. Die Betroffenen leiden unter starker Vermehrung der Knochenmasse (Osteosklerose), jedoch ist diese von geringer Qualität, so dass es häufiger zu Frakturen kommt (GELB et al. 1996).

Aus dieser Erkenntnis heraus, wurden Cathepsin K-Inhibitoren wie das Odanacatib entwickelt. Studien konnten zeigen dass, die orale Aufnahme von Odanacatib bei postmenopausalen Frauen nach einem Jahr zu einem gesteigerten BMD und einer Senkung von resorptiven Knochenmarkern (bis 52%) führte. Interessanterweise fand sich auch eine Erniedrigung von 15% der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase. Diese Erniedrigung der Knochenformationsmarker fiel somit niedriger aus, als es bei anderen antiresorptiven Medikamenten der Fall ist, sodass ein

Abkoppeln „*uncoupling*“ von Knochenresorption und Knochenformation, zu Gunsten der Knochenformation, angenommen werden kann.

Neben dem primär therapeutischen Nutzen von Cathepsin K-Inhibitoren kann Cathepsin K im Serum als biochemischer Marker für die Osteoklastenaktivität eingesetzt werden (SEIBEL 2005). Jedoch bedarf es noch einiger Untersuchungen für die routinemäßige Anwendung (HLAING und COMPSTON 2014).

2.4.2.4.3 Sonstige

Dickkopf-1 (Dkk-1)

Dickkopf ist ein löslicher Inhibitor des Wnt/ β -Catenin Signalwegs. Er gilt als ein wichtiger Mitspieler in der Regulation des Knochenstoffwechsels bezüglich des Knochen-Remodeling. Durch Inhibierung des Wnt-Signalweges, der für das Wachstum und die Differenzierung von Osteoblasten verantwortlich ist (nähere Informationen siehe auch Kapitel: 2.1), kommt es zu einer Steigerung der Knochenresorption und somit zur verminderten Knochenmasse bei gleichzeitig gesteigerter Adipogenese (PINZONE et al. 2009; DAOUSSIS und ANDONOPOULOS 2011). Eine Studie konnte belegen, dass eine Osteoblasten-spezifische Überexpression von DKK-1 zu Osteopenie und Knochendefekten führte (LI et al. 2006). In Ergänzung dazu wies eine Studie bei DKK-1-defizitären Mäusen eine signifikant gesteigerte Knochenmasse auf (MACDONALD et al. 2007). Auch Studien an ovariectomierten Ratten bewiesen durch Hemmung von DKK-1 eine Steigerung des BMD (WANG et al. 2007).

Interessanterweise konnte ein Einfluss von Glukokortikoiden auf die Expression von DKK-1 in humanen Osteoblasten beobachtet werden. Glukokortikoide steigern die DKK-1 Transkription und führen somit zur Inhibierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges. DKK-1 spielt somit auch eine wichtige Schlüsselrolle in der Glukokortikoid-induzierten Osteoporose (OHNAKA et al. 2004).

Aufgrund der nun bekannten Wirkungsmechanismen von DKK-1 gilt der neutralisierende Dickkopf-1 Antikörper als eine der neuesten Therapiestrategien in der

Osteoporosemedizin. Dieser wird aber noch nicht routinemäßig eingesetzt und bedarf noch weiterer Forschungsergebnisse (RACHNER et al. 2011).

Sklerostin

Sklerostin ist ein monomeres Glykoprotein und Produkt des SOST Gen. Es zählt wie DKK-1 zu den löslichen Inhibitoren des Wnt/ β -Catenin Signalweges. Es wird von Osteozyten exprimiert und gilt somit als knochenspezifisches Molekül. Es bindet an den LRP-5/6 Rezeptor und blockiert somit wie DKK-1 die Wnt/ β -Catenin Signalkaskade (DAOUSSIS und ANDONOPOULOS 2011). In präklinischen Studien an Ratten (LI et al. 2009) und Primaten (OMINSKY et al. 2010) konnte nachgewiesen werden, dass eine Behandlung mit Sklerostin- neutralisierenden monoklonalen Antikörpern zu einem osteoanabolen Effekt mit gesteigerter Knochenformation und Festigkeit führte.

Auch der bereits vorkommende therapeutische Einsatz von Anti- Sklerostin- Antikörpern in der Humanmedizin hatte bei postmenopausalen Frauen durch die Steigerung des Knochenformationsmarkers PINP und eine Steigerung der Knochendichte um 6% einen positiven Effekt (PADHI et al. 2007). Somit stellt Sklerostin ebenfalls einen neuen Therapieansatz in der Osteoporosemedizin dar (RACHNER et al. 2011).

Bone Sialoprotein (BSP)

Das Bone Sialoprotein zählt zu den Glykoproteinen und macht ca. 5 - 10% der nicht-kollagenen Proteine der Knochenmatrix aus (FISHER et al. 1983). Es wird von Osteoblasten und Odontoblasten gebildet. Allerdings konnte es auch bei Osteoklasten- ähnlichen Zellen und malignen Zelllinien gefunden werden (BIANCO et al. 1991; BELLAHCÈNE und CASTRONOVO 1997). Intaktes BSP verbessert die Anheftung von Osteoblasten und Osteoklasten an der Oberfläche und fungiert somit als Adhäsionsmolekül. Zudem gilt es als Ausgangspunkt für Hydroxylapatitkristalle. BSP wird weiterhin eine Osteoklasten-vermittelte Knochenresorption zugeschrieben. Diese Hypothese wird durch Studien, die einen signifikanten Anstieg von BSP bei

postmenopausalen Frauen in Zusammenhang mit anderen Resorptionsmarkern zeigen, unterstützt. In Ergänzung zu der Annahme, dass es sich eher um einen Resorptionsmarker handelt, ließ sich ein signifikanter Abfall nach antiresorptiver Therapie detektieren (SEIBEL et al. 1996; HASAN und SHAARAWY 2001).

Osteopontin, Osteonectin

Osteopontin ist ein phosphoryliertes Sialoprotein, das von vielen Geweben wie Knochen, Dentin, Niere, Gehirn, aber auch aktivierten Makrophagen und Lymphozyten exprimiert wird. Osteopontin dient in der extrazellulären Matrix des Knochens vor allem der Mineralisation, da es in der Lage ist, Calcium und Hydroxylapatit zu binden. Obwohl Osteopontin in diversen anderen biologischen Prozessen wie Wundheilung, Immunologie und Tumorgenese eine Rolle spielt (SODEK et al. 2000), hat es als frühen Biomarker bei postmenopausaler Osteoporose an Bedeutung gewonnen. In einer Studie konnte beispielweise eine positive Korrelation mit dem Alter und eine negative Korrelation mit Körpergewicht, BMD der Hüftregion und *T-Score* von Frauen mit Osteoporose gezeigt werden (CHANG et al. 2010).

Osteonectin ist ebenfalls ein Protein in der extrazellulären Matrix des Knochens. Es ist in der Lage an Kollagen zu binden und die Zell-Matrix Interaktion zu regulieren. Auch Osteonectin spielt eine wichtige Rolle im Knochen-Remodeling. Beispielweise zeigen Osteonectin-knock-out-Mäuse eine verminderte Knochenformation (DELANY et al. 2000).

2.4.2.5 Marker des Energiestoffwechsels

Der Zusammenhang zwischen Energiestoffwechsel und Knochenstoffwechsel wurde im Kapitel 2.3 bereits erläutert. In diesem Zusammenhang spielt der Nachweis einer Insulinresistenz infolge einer hochdosierten Glukokortikoidgabe und Adipositas als Risikofaktor für einen Typ II Diabetes oder ein Metabolisches Syndrom eine wichtige Rolle. Eine Insulinresistenz beschreibt im Allgemeinen eine abgeschwächte biologische Antwort des Gewebes auf Insulin. Medikamente wie Glukokortikoide

können sich negativ auf die Gewebeempfindlichkeit für Insulin auswirken und sekundär zu einem Diabetes mellitus Typ II führen (MEYER und BADENHOOP 2003; CLORE und THURBY-HAY 2009). Eine Dauertherapie mit Glukokortikoiden kann dosisabhängig in bis zu 50% der Fälle zu einem Steroiddiabetes führen. Die Pathogenese eines Steroiddiabetes liegt darin, dass Glukokortikoide die Affinität der Insulinrezeptorbindung senken, die Glukoneogenese in der Leber steigern, die insulinabhängige Hemmung der Glukosefreisetzung aus der Leber stören und den Glukoseverbrauch in den Muskelzellen vermindern (MEYER und BADENHOOP 2003; HALL und GUYTON 2010). Das Resultat ist eine Hyperglykämie und pathophysiologisch einem Diabetes mellitus Typ II gleichzusetzen.

Fructosamin

Für die Diagnose eines Diabetes mellitus Typ II sollte eine Blutglukosekonzentration bestimmt werden. Neben der Nüchternwert-Glukose, die starken Schwankungen unterlegen ist, ist die Bestimmung der Langzeitglukose von hoher Bedeutung. Dies geschieht in der Humanmedizin häufiger mit der Messung des Hämoglobin A_{1c} (HbA_{1c}). Dies dient der Abschätzung des mittleren Glukosewerts der vorangehenden 2-3 Monate (THOMAS 2012). In der Veterinärmedizin wird hierfür vor allem das Fructosamin verwendet. Fructosamine sind glykierte Serumproteine (in der Regel Albumin), die durch eine nicht-enzymatische Reaktion entstehen. Diese repräsentieren die mittlere Blutglukosekonzentration der letzten 1 - 3 Wochen (REUSCH et al. 1993) und dienen der Diagnosestellung sowie dem Therapiemonitoring eines Diabetes mellitus (KAWAMOTO et al. 1992). Da es sich um glykierte Serumproteine handelt, sollte beachtet werden, dass vor allem Hypoalbuminämien zu falsch niedrigen Fructosaminkonzentrationen im Serum führen können.

Insulin

Ein weiteres diagnostisches Kriterium für einen Diabetes mellitus Typ II oder auch eines metabolischen Syndroms, die beide durch eine Insulinresistenz gekennzeichnet

Literaturübersicht

sind, ist die Bestimmung der Insulinserumkonzentration. Insulin ist ein Proteohormon, das in den β -Zellen des Pankreas gebildet wird. Die Bestimmung erfolgt im Serum mittels eines Immunoassays. Erhöhte Insulinkonzentrationen in Zusammenhang mit Hyperglykämien können auf eine Insulinresistenz hinweisen. Einen sensitiveren Marker hierfür stellt allerdings das Proinsulin dar, da dieses auch bei erschöpfter β -Zell Funktion durch eine Hyperglykämie-bedingte Überstimulation der β -Zellen eine höhere Konzentration im Serum aufweist und somit auf eine Insulinresistenz hindeutet (PFÜTZNER et al. 2004).

In Bezug auf einen Glukokortikoid-induzierten Diabetes mellitus ist beschrieben, dass es durch die Glukokortikoide zu einer Beeinträchtigung der β -Zellfunktion und somit sogar zur verminderten Insulinausschüttung kommen kann. Auch schon die kurzzeitige Gabe von Prednisolon kann dies bewirken (VAN RAALTE et al. 2010; PETERSONS et al. 2013).

Schaut man sich den Zusammenhang von Insulin und Knochenstoffwechsel an, so findet man schon früh Studien, die eine positive Korrelation zwischen Insulinkonzentration und Knochendichte bei postmenopausalen Frauen nachweisen konnten (REID et al. 1993). Eine ausführliche Erläuterung des Zusammenhangs des Energie- und Knochenstoffwechsel finden sich im Kapitel 2.3.

In der Regel kann zumindest anfänglich der erhöhte Insulinbedarf bei einer Insulinresistenz durch eine erhöhte Insulinproduktion der β -Zellen ausgeglichen werden. Jedoch führt eine kompensatorische Hyperinsulinämie zu einer vermehrten Bildung von Adipozyten, insbesondere des viszeralen Fettgewebes. Insulin hat somit neben der Regulierung des Glukosestoffwechsels eine weitere Funktion im Energiestoffwechsel, in dem es die physiologische Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Adipozyten reguliert (THOMAS 2012).

Aus diesem Grund ist auch Übergewicht häufig mit einem Diabetes mellitus Typ II assoziiert (KAHN und FLIER 2000). Hierbei kommt es durch Adipozytokine (Faktoren, die von Lipozyten gebildet werden) zu einer Steigerung der Insulinresistenz. Zu den Adipozytokinen zählt beispielweise das Adiponectin. Hierbei handelt es sich um ein Adipozyten-spezifisches Protein, das eine erniedrigte Serumkonzentration bei Adipositas, Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ II aufweist. Es stellt einen

möglichen Marker zur Beurteilung des Risikos von Insulinresistenz bei adipösen Personen dar (PISCHON und RIMM 2006). Weitere Adipozytokine, die zur Beurteilung des Energiestoffwechsels herangezogen werden können sind Leptin, welches mit der Menge an Adipozyten positiv korreliert. Resistin stellt ebenfalls ein Bindeglied zwischen Fettsucht und Insulinresistenz dar, jedoch ist seine physiologische Bedeutung beim Menschen noch Gegenstand weiterer Forschung (MEIER und GRESSNER 2004).

Unveresterte freie Fettsäuren (NEFA)

Andere Adipozytokine, die in Zusammenhang mit dem Fettstoffwechsel eine Rolle spielen sind Entzündungsmediatoren wie IL 6 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (FASSHAUER und PASCHKE 2003). Diese führen zu einer gesteigerten Lipolyse und rufen eine erhöhte Konzentration von unveresterten Fettsäuren (NEFA- non esterified fatty acids) hervor. Neben Entzündungsmediatoren führen Ernährungsgewohnheiten (energetische Unterversorgung), aber auch Insulinresistenz zum Beispiel infolge eines Diabetes mellitus Typ II zu einer gesteigerten Lipolyse. Die daraus resultierende erhöhte Konzentration von freien unveresterten Fettsäuren kann bestimmt werden. Obwohl unveresterte Fettsäuren selbst bei einer Insulinresistenz vermehrt anfallen, konnten Studien belegen, dass eine erhöhte Konzentration von NEFAs die Signalübertragung von Insulin beeinflussen und somit zu einer Verstärkung der Insulinresistenz führen (PATTI 1999). In Ergänzung dazu wurde gezeigt, dass eine erhöhte Konzentration von freien Fettsäuren mit einem verminderten Glukosetransport und Phosphorylierung einhergeht. Dies führt zu einer Reduktion der Glukoseoxidation und verminderten Glykogensynthese im Muskel, was den Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ II gleicht (RODEN et al. 1996). Eine weitere Studie postuliert, dass eine erhöhte Konzentration von freien Fettsäuren einen frühen metabolischen Marker für Insulinresistenz darstellt (BLÜHER et al. 2001). Neben dem Einsatz als Biomarker wird die Reduktion von freien unveresterten Fettsäuren auch als wichtige therapeutische Maßnahme bei Adipositas und Typ II Diabetes angesehen (BODEN und SHULMAN 2002).

2.4.2.6 Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)

IGF-1 ist ein anaboles Peptidhormon und wesentlicher Vermittler der Wachstumshormon (Growth- hormone, GH)- Wirkung. Seine physiologische Wirkung in Bezug auf den Knochenstoffwechsel wurde bereits erläutert.

Nur weniger als 1% des im Körper vorhandenen IGF-1 zirkuliert als freies Hormon in der Peripherie. Der größte Teil liegt als ein 150 kilo Dalton (kDa) trinärer Komplex aus IGF- bindenden Proteinen (IGFBP) und Säure- labilen- Untereinheiten (ALS- acid labile subunit) vor. Diese Komplexe dienen vor allem der Stabilisierung von IGF-1 und sorgen für eine Verlängerung der zirkulierenden Halbwertszeit und Verfügbarkeit in anderen Geweben (BOISCLAIR et al. 2001). Man kann 6 verschiedene Proteine des IGFBP unterscheiden, wobei die Konzentration von IGFBP-3 dominiert und das wichtigste Bindeprotein darstellt. ALS dient vor allem der Speicherung und Freisetzung von IGF-1. Es ist weiterhin essentiell für die adäquate Komplexbildung. Nicht nur in der Zirkulation, sondern auch im Gewebe wie z.B. dem Knochen ist ein Großteil des IGF-1 an IGFBP gebunden. Zur Bestimmung des IGF-1 müssen die IGFBP erst entfernt werden.

Die Konzentration von IGF-1 im Serum ist altersabhängig. So weisen Kinder und junge Erwachsene aufgrund der positiven Wirkung auf die Knochenformation höhere Werte auf als ältere Menschen. Mit fortschreitendem Alter fällt der IGF-Spiegel wieder ab (LANDIN-WLLHELMSEN et al. 1994). Die Abnahme mit dem Alter verläuft parallel mit einem progressiven Verlust von Muskelmasse, erhöhten Körperfettanteil und verminderten BMD (GIUSTINA et al. 2008). Studien belegen die positive Korrelation von IGF-1 und BMD bei postmenopausalen Frauen (ÇELIKER und ARSLAN 2000). Weiterhin finden sich Studien, die ein signifikant erhöhtes Risiko für postmenopausale Frauen mit niedrigen IGF-1-Spiegel angeben, osteoporotisch-bedingten Frakturen unabhängig von der Knochendichte zu erleiden (GARNERO et al. 2000). Auch bei Männern konnte bei niedrigen IGF-1-Serumkonzentrationen ein erhöhtes Frakturrisiko nachgewiesen werden (OHLSSON et al. 2011). Neuere Studien bestätigen den Zusammenhang von niedrigen IGF-1 Werten bei postmenopausalen Frauen mit Diabetes mellitus Typ II. Als neuer Knochenmarker wurde hier Sklerostin eingesetzt, welcher erhöhte Werte in diesem Zusammenhang (ARDAWI et al. 2013) zeigte.

Literaturübersicht

Eine Studie korrelierte verschiedene Parameter wie IGF-1, Osteocalcin, OPG und NTX im Urin mit den Ergebnissen der DXA-Messungen bei prä- und postmenopausalen Frauen. Ziel war es den Parameter herauszufinden, der die früheste Veränderung in Bezug auf die Knochendichte darstellt. Das Ergebnis zeigte eine frühzeitige Senkung der IGF-1 Konzentration im Serum junger Frauen. Somit stellt IGF-1 einen Frühmarker zur Abschätzung der Knochendichte und des Osteoporose- Risikos dar (LIU et al. 2008). Auch schon ältere Studien konnten bei postmenopausalen Frauen über 60 Jahren eine positive Korrelation der Knochendichte mit IGF-1 Werten zeigen. Hierbei fand sich interessanterweise keine signifikante Korrelation zwischen den Resorptionsmarkern (NTX, DYD) und IGF-1. Desweiteren konnte keine Korrelation zwischen BMD und Resorptionsmarkern nachgewiesen werden (KIM et al. 1999). Ein anaboler Effekt auf den Knochenstoffwechsel konnte durch die Gabe von rekombinanten Wachstumshormonen durch eine Steigerung der BAP-Konzentration dargestellt werden. Hier waren die IGF- 1 Werte positiv mit BAP korreliert (SARTORIO et al. 1993). Eine weitere Studie fand in Bezug auf die biochemischen Marker eine negative Korrelation von IGF-1 und Osteocalcin sowie PTH (JEHLE et al. 1998). Dieselbe Studie stellte auch eine positive Korrelation zwischen Proinsulin und IGF-1 dar, was die Verbindung zum Energiestoffwechsel aufzeigt.

Einige Faktoren können die IGF-1- Bildung beeinflussen. Hierzu zählen vor allem Östrogene und Glukokortikoide, die im Rahmen der Osteoporoseentstehung eine Rolle spielen. Östrogene steigern die IGF-1-Transkription in Osteoblasten (KASSEM et al. 1998), was einen positiven Effekt auf die Knochendichte hat. Dagegen weisen Glukokortikoide einen negativen Effekt auf (DELANY et al. 2001). Sie inhibieren die Ausschüttung von Growth Hormone (GH) und reduzieren die Ansprechbarkeit auf GHRH (Growth Hormone releasing Hormone) aus dem Hypothalamus (MANELLI et al. 2002). In vitro supprimieren Glukokortikoide die IGF-1- Transkription im Knochen (JUX et al. 1998). Desweiteren ist bekannt, dass Osteoblasten bei Anwesenheit von Glukokortikoiden nicht sensibel für GH und IGF-1 sind (SMITH und FRENKEL 2005a).

2.5 Das Schaf als Osteoporosemodell

Da die Osteoporose eine der häufigsten Erkrankungen mit hohem sozial-ökonomischen Wert darstellt, nimmt sie einen hohen Stellenwert hinsichtlich der Erforschung an Tiermodellen ein. Tiermodelle dienen in der Osteoporoseforschung der Grundlagenforschung für die Entwicklung neuer Medikamente, neue Behandlungsstrategien auch in Bezug auf die Erforschung neuer Biomaterialien zur Frakturversorgung am osteoporotischen Knochen sowie bessere Kenntnis des Knochenstoffwechsels bezüglich Risikoabschätzung und Therapie-Monitoring. Durch den Einsatz von Tiermodellen können interindividuelle endogene und exogene Einflussfaktoren möglichst eingegrenzt und standardisiert werden, da eine homogene Gruppenhaltung über einen definierten Zeitraum möglich ist.

Es sind zahlreiche verschiedene Tiermodelle beschrieben, von denen die Ratte das verbreitetste Tiermodell bezüglich der Osteoporoseforschung darstellt, da Ratten als Tiermodell eine hohe Praktikabilität, niedrige Kosten, gute Verfügbarkeit und einen hohen Wissenstand der Physiologie und Pathophysiologie des Skelettsystems aufweisen (TURNER et al. 2001). Nach den FDA Guidelines (Guideline for Preclinical and Clinical Evaluation of Agents Used in the Treatment or Prevention of Postmenopausal Osteoporosis, 1994) wird neben dem Rattenmodell ein weiteres Großtiermodell empfohlen (THOMPSON et al. 1995).

Als Großtiermodell hat das Schaf in der Osteoporoseforschung an Bedeutung gewonnen. Neben den einfachen, kostengünstigen Haltungsbedingungen, der Fügsamkeit der Tiere und der hohen Verfügbarkeit spielt das Schaf aufgrund der Ähnlichkeit in der Knochenstruktur, Knochenmetabolismus und ähnlichen Hormonprofilen eine wichtige Rolle als Tiermodell für den Menschen (NEWMAN et al. 1995; TURNER 2002; OHEIM et al. 2012). Schafe weisen wie der Mensch ein trabekulären und kortikalen Knochen mit Havers-System auf. Desweiteren führen sie ein Knochen-Remodeling mit *bone multicellular units* (BMU) durch, wobei dies erst bei älteren, ausgewachsenen Schafen vorkommt (OHEIM et al. 2012). Studien an Schafen zeigen, dass durch eine Kombination von Ovariectomie, Glukokortikoidgabe und calciumarmer Diät ein sehr ähnlicher Knochenverlust durch ein zelluläres Zusammenspiel von Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten auftritt wie beim

Literaturübersicht

Menschen (ZARRINKALAM et al. 2012). Dies unterstützt die Aussage, dass sich das Schafmodell für die Osteoporoseforschung eignet.

Obwohl Schafe keine Menopause aufweisen und nur wenige Rassen asaisonal polyöstrisch sind (z.B. Merino-Schafe), konnte durch eine alleinige Ovariectomie gezeigt werden, dass es zu einem Abfall der Östrogenkonzentration im Serum mit gleichzeitigem, histologisch gesichertem Verlust des trabekulären Knochen kommt (NEWTON et al. 2004). Beachtet werden sollte, dass einige Schafrassen saisonal polyöstrisch sind und sich somit jahreszeitlich aufgrund eines veränderten Östrogenspiegels Schwankungen in der Knochendichte darstellen. In einer Studie konnte mithilfe von Östrogen- und Knochenmarkerbestimmung (Knochenresorptions- und Formationsmarker) sowie μ CT ein unterschiedlicher jahreszeitlicher Verlauf der Knochendichte detektiert werden. So wiesen die Schafe im Herbst/Winter erhöhte Östrogenkonzentrationen mit gleichzeitigen erniedrigten Knochenresorptionsmarkern auf. Umgekehrt war dies im Frühjahr/Sommer der Fall. In diesem Zusammenhang kann auch der Einfluss der Östrogene auf die Knochenmarker beim Schaf gezeigt werden (ARENS et al. 2007).

Im Kapitel 2.2.5 wurden die verschiedenen Osteoporoseformen beim Menschen beschrieben. Aufgrund der unterschiedlichen Ätiologien und Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel erscheint eine vergleichbare Ausgangssituation beim Schaf unabdingbar für die Osteoporoseforschung (SIMPSON und MURRAY 2015). Die drei häufigsten Osteoporoseformen (postmenopausale, senile und Glukokortikoid-induzierte Osteoporose) sollen durch verschiedene Techniken beim Schaf induziert werden. Die Ovariectomie stellt hierbei die postmenopausale Osteoporose durch Östrogenmangel dar. Die senile Osteoporose ist schwierig im Tiermodell Schaf nachzustellen. Eine Studie konnte aber zeigen, dass durch eine Unterbrechung der Hypothalamus-Achse ein langsamer Knochenverlust „*low turnover*“, ähnlich älterer Menschen erreicht werden konnte (OHEIM et al. 2013). Die Glukokortikoid-induzierte Form beim Schaf stellt dabei einer der häufigsten sekundären Osteoporoseformen dar. Gängige Methoden zur Induktion eines Knochenverlustes in der Forschung sind neben einer Calcium- und Vitamin D-armen Diät, die einen negativen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel bei Schafen hat (LILL et al. 2002a), die Ovariectomie. Hier

Literaturübersicht

kommt es innerhalb der ersten drei bis vier Monate nach der Operation zu einem deutlichen, schnellen Knochendichteverlust verschiedener Skelettanteile (Radius, Femur, Wirbelkörper), was der postmenopausalen Osteoporose der Frau sehr ähnlich ist (AUGAT et al. 2003; SIGRIST et al. 2006). Interessanterweise stellt sich dann jedoch innerhalb der ersten 12 Monate nach Ovariectomie eine Kompensation hinsichtlich BMD und Knochenmarkern ein, so dass eine Übertragbarkeit auf den Menschen (postmenopausale Frau) somit nur bedingt möglich ist.

Der Einsatz von Glukokortikoiden zeigt nach einigen Monaten den größten Effekt bezüglich Knochenverlust und Änderung der Mikroarchitektur (trabekulärer und kortikaler Knochen) beim Schaf (CHAVASSIEUX et al. 1993; DING et al. 2010). Dieses Modell stellt aufgrund des vergleichbaren Krankheitsbildes eins der wichtigsten Modelle für die Steroid-induzierte Osteoporose beim Menschen dar (SCHORLEMMER et al. 2003). Glukokortikoide inhibieren die Knochenformation und verstärken die Osteoklastenaktivität nachweislich beim Menschen und im Großtiermodell (KOMORI 2015). Auch neue Studien beweisen, dass Glukokortikoide in der Lage sind ein „*uncoupling*“ des Knochen-Remodeling Zyklus zu erreichen und somit durch eine verminderte Knochenformation bei verstärkter Knochenresorption zum deutlichen Verluste der Knochenmasse führen (ANDREASEN et al. 2015).

Häufig werden Kombinationen aus Diät, Ovariectomie und Glukokortikoiden eingesetzt, um den größten Effekt am Knochen zu erzielen (LILL et al. 2002b; LILL et al. 2002a; OHEIM et al. 2012).

Neben den Vorteilen der Glukokortikoide hinsichtlich des Verlusts der Knochenmasse müssen die Nebenwirkungen berücksichtigt werden, da sie das Wohlbefinden der Tiere stark beeinträchtigen (EGERMANN et al. 2008). Neben schweren Infektionen wurden Haarverluste und dünne Haut beschrieben. Diese Studie konnte weiterhin eine altersabhängige Inzidenz von Nebenwirkungen beim Schaf feststellen. So zeigten 61% der Tiere > 7 Jahre Nebenwirkungen in Form von schwere Infektionen und 38% der Tiere < 7 Jahren. Eine gewichtsabhängige Korrelation mit den Nebenwirkungen konnte nicht dargestellt werden. Eine Studie aus dem Jahr 2007 konnte zeigen, dass starke Nebenwirkungen durch eine Verringerung des Applikationsintervalls bei

Literaturübersicht

gleichbleibender Glukokortikoid-Serum-Konzentration gesenkt werden können (KLOPFENSTEIN BREGGER et al. 2007).

In Bezug auf den Einsatz von biochemischen Markern des Knochenturnovers wie alkalische Phosphatase, Osteocalcin oder Crosslinks zeigt sich das Schafmodell in präklinischen Studien bereits als gute Möglichkeit, die Knochenstoffwechsellage zu evaluieren (CHAVASSIEUX et al. 1993; WINDHAGEN et al. 2002; SIGRIST et al. 2006; ARENS et al. 2007). Beispielweise zeigten die Tiere nach einer 7 monatigen Langzeitbehandlung mit Glukokortikoiden und Calcium-armer Diät einen hochgradigen Abfall des Knochenformationsmarker Osteocalcin (DING et al. 2010). Nach Absetzen der Medikamente kam es drei Monate später zu einem Rückkopplungseffekt „Rebound-Effekt“ mit ausgeprägtem Anstieg des Osteocalcin. Verglichen wurde dies mit μ CT Messungen verschiedener Skelettanteile. Als alleiniges Kriterium des Knochenumsatzes sollten biochemische Marker jedoch nicht verwendet werden, da viele Schwankungen und Einflussfaktoren eine sichere Interpretation nicht erlauben. Biochemische Marker in der Osteoporoseforschung am Tiermodell dienen vor allem als nicht invasive Methode der Überwachung des Knochenstoffwechsels. Obwohl es sich immer noch in der Regel um humanmedizinische Test-kits handelt, sind mittlerweile für einige Tierspezies die Kreuzreaktivitäten mit humanen Antikörpern bekannt und können somit gezielt ausgewählt werden (ALLEN 2003). Beim Einsatz von Knochenmarkern muss die biologische Variabilität (insbesondere Intra- und Interspezies-Variation) sowie die tageszeitlichen Schwankungen berücksichtigt werden.

Als Nachteil bei der Verwendung von Schafen im Zuge der Osteoporoseforschung, muss der Verdauungstrakt diskutiert werden, da Schafe im Gegensatz zum Menschen keine Monogastrier sind. Schafe als Wiederkäuer weisen ein Vier-Magen-System auf und sind in der Lage durch Fermentation pflanzliche Cellulose abzubauen. Der Einfluss der mikrobiellen Flora auf beispielweise neue orale Medikamente in der Osteoporosetherapie ist somit nicht sicher abschätzbar und mit dem Menschen vergleichbar. Aufgrund dessen sollte bei Schafen als Tiermodell eine Injektion durchgeführt werden (REINWALD und BURR 2008). Ebenso wird der Einfluss von bestimmten Leguminosen diskutiert, da diese reich an Phytoöstrogenen sind und auch

Literaturübersicht

beim Schaf als selektive Östrogen Rezeptor Modulatoren (SERMs) agieren können (REINWALD und BURR 2008). Bezüglich der Mineralstoffhomöostase weisen Schafe eine im Vergleich zum Menschen verminderte Phosphatexkretion über die Niere auf. Hier wird Phosphat überwiegend über den Darm reguliert (TURNER 2002).

Trotz insgesamt guter Vergleichbarkeit mit dem Menschen und fortschreitenden Wissenstandes, wird immer eine geringe biologische und physiologische Diskrepanz zu der tatsächlichen Situation beim menschlichen Patienten vorhanden sein und somit niemals den exakten Mechanismus beim Menschen widerspiegeln (REINWALD und BURR 2008). Dennoch gilt das Schaf als eins der wichtigsten Großtiermodelle in der Orthopädischen Forschung und findet neben Entwicklung von Medikamenten auch große Anwendung in der Erprobung neuer Biomaterialien.

Neben den Tiermodellen in der Osteoporoseforschung spielen diese Modelle auch in anderen Bereichen wie der Diabetes mellitus Forschung eine wichtige Rolle. Hierbei dienen vor allem Ratten und Mäuse für die Grundlagenforschung verschiedener Diabetestypen. Großtiermodelle sind dagegen seltener (REES und ALCOLADO 2005; ETUK 2010). Auch das metabolische Syndrom als Risikofaktor des Diabetes mellitus Typ II und der Osteoporose ist Gegenstand der Forschung. Neben Ratten und Mäusen gibt es auch Studien an Schafen, die vor allem durch nutritive, pharmakologische, genetische und chirurgische Intervention die fetale Entwicklung beeinflussen und somit die Pathophysiologie des metabolischen Syndroms erforschen (BERTRAM und HANSON 2001).

Der Zusammenhang zwischen Energie- und Knochenstoffwechsel konnte bereits an Rattenmodellen dargestellt werden. Hier konnte eine Studie mit adipösen Ratten eine Kombination aus Insulinresistenz, renaler Beeinträchtigung mit verminderter α -1 Hydroxylase Aktivität und vermindertem BMD darstellen. Die vorliegende Insulinresistenz war hier Grund für die verminderte Aktivierung von Vitamin D durch α -1 Hydroxylase in der Niere und somit sekundär für eine verringerte Knochendichte (CHANG-QUAN et al. 2008). Auch bei Ratten mit induziertem Diabetes mellitus Typ II kam es durch die Insulinresistenz zur verminderten Umsetzung des 1,25-Dihydroxycaliferol in der Niere, was einen negativen Einfluss auf den

Literaturübersicht

Knochenstoffwechsel hatte und somit zu erniedrigtem BMD führte (HUANG et al. 2009).

Neben den Markern des Energiestoffwechsels, wie beispielsweise Insulin können beim Schaf Wachstumshormone wie IGF-1 aufgrund ähnlicher Aminosäuresequenzen im Vergleich zum Menschen und anderen Säugetieren bestimmt werden (STUART und PAGE 2010). Bezüglich der Interaktion zwischen Wachstumshormonen und Knochenstoffwechsel weist diese Studie darauf hin, dass auch bei anderen Säugetieren inklusive Schaf die IGF-1 Konzentration negativ mit der Knochenmasse korreliert.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Studiendesign

In der vorliegenden Arbeit wurden in einem Zeitraum von 8 Monaten (Ende Oktober 2012 bis Anfang Juli 2013) zu drei verschiedenen Zeitpunkten (0, 3 und 8 Monaten) Blut- und Urinproben bei Osteoporose-induzierten weiblichen Schafen untersucht. Untersuchungskriterien waren in der folgenden Studie Marker des Knochen- und Energiestoffwechsels sowie Wachstumsfaktoren (hier: Insulin-like growth factor-1).

Neben der Überprüfung des Einflusses einer Osteoporose auf die Serum- und Urinmarker sollten auch orientierende Referenzwerte für die hier verwendeten Marker erstellt werden, um eine bessere Interpretation der Ergebnisse dieser Studie zu ermöglichen. Zur Überprüfung der Effektivität der Osteoporoseinduktion wurden die Werte mit dem Goldstandard der Knochendichtemessung, der Dual-Röntgen-Aborptiometrie (DXA) verglichen. Ebenso konnten durch die DXA-Messung Veränderungen in der Körperfettzusammensetzung erfasst werden, was gegebenenfalls einen Einfluss auf den Energiemetabolismus und somit auf die Marker des Energiestoffwechsels nehmen kann.

Die Osteoporoseinduktion erfolgte außer bei einer Kontrollgruppe (Gruppe 1) in drei Versuchsgruppen. In Gruppe 2 (im folgenden OVX genannt) erfolgte eine bilaterale Ovariectomie, um die postmenopausale Osteoporose der Frau widerzuspiegeln. Die Gruppe 3 (im folgenden OVXD) erhielt neben einer Ovariectomie eine spezielle Mangel-Diät (Calcium- und Vitamin D-restriktiv), um den zusätzlichen Einfluss von insbesondere Calcium, Phosphat und Vitamin D zu repräsentieren. In Gruppe 4 (im folgenden OVXDC) wurde die Osteoporose zusätzlich zu einer Ovariectomie und einer Mangel-Diät wie in Gruppe 3 auch durch regelmäßige hochdosierte Glukokortikosteroid-Injektionen induziert.

Die Versuche am Tier wurden in der Zentralen Forschungseinrichtung der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main durchgeführt. Der Tierversuchsantrag (GE: F31/36) wurde durch das Regierungspräsidium Darmstadt am 27.09.2012 genehmigt. Die Blut- und Urinanalysen erfolgten im Klinikum Veterinärmedizin,

Material und Methoden

Klinische Pathophysiologie und Klinische Laboratoriumsdiagnostik der Justus-Liebig-Universität Gießen.

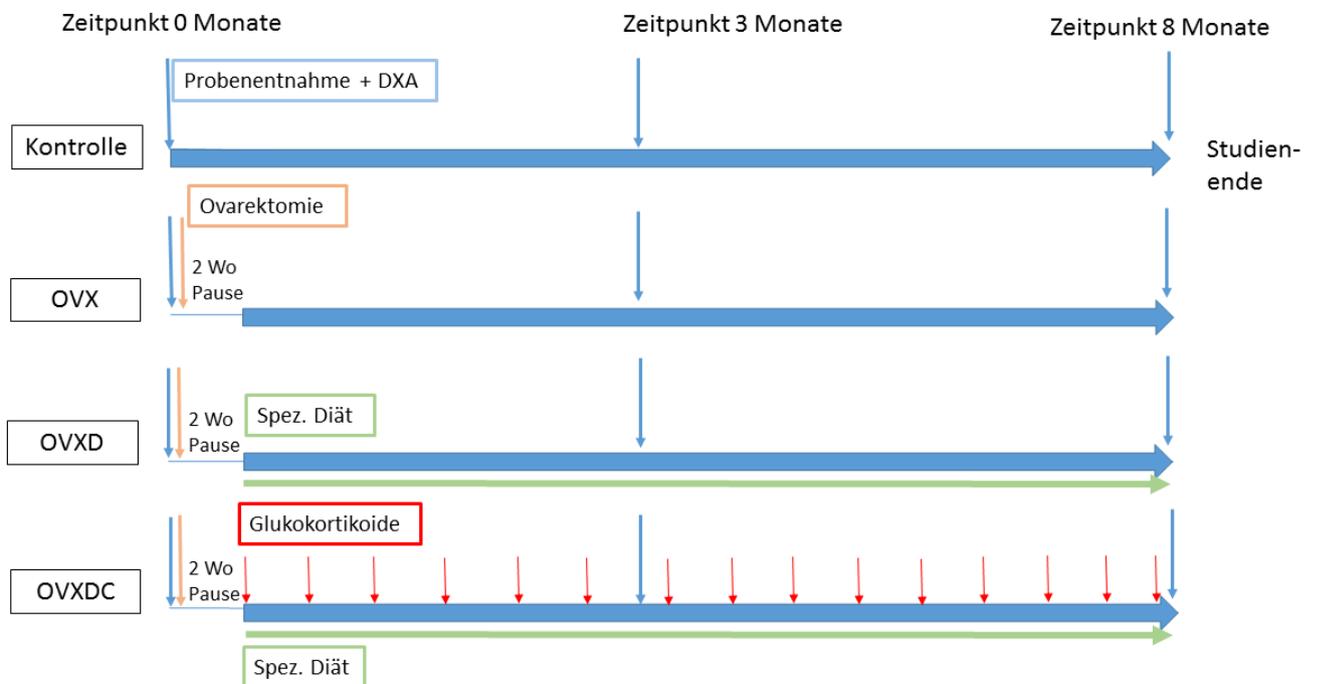


Abbildung 6: Studiendesign: Darstellung zeitlicher Abläufe der tierexperimentellen Arbeit. Es gab drei Probenentnahmezeitpunkte (Versuchsbeginn mit 0 Monaten, 3 Monate, Endzeitpunkt: 8 Monate) in allen Gruppen (blauer senkrechter Pfeil). Zu Beginn der Studie wurden die Schafe in den Gruppen OVX, OVXD und OVXDC bilateral ovariectomiert (brauner Pfeil). Es erfolgte eine zweiwöchige Ruhephase nach der Operation. Nach 2 Wochen erhielten die Schafe aus den Gruppen OVXD und OVXDC eine spezielle Mangel-Diät (grüner Pfeil). Zusätzlich erfolgte in der OVXDC Gruppe ab diesem Zeitpunkt im vierzehntägigen Abstand eine Gabe von Glukokortikoiden (rote Pfeile) bis zum Versuchsende.

Abkürzungen: DXA: Dual-Röntgen-Absorptiometrie, Kontrolle: Kontrollgruppe; OVX: Ovarektomie-Schafe; OVXD; Ovarektomie+ Diät-Schafe, OVXDC: Ovarektomie+Diät+ Glukokortikoid-Schafe, Spez. Diät: Calcium/Vitamin D-defizitäre Diät.

Schafe

Für die Studie wurden 32 weibliche Merinoschafe randomisiert von einem Schäfer aus Wiesbaden ausgewählt. Ein Tier musste aufgrund von Trächtigkeit aus der Studie ausgeschlossen werden, sodass für die tierexperimentelle Untersuchung 31 Schafe zur Verfügung standen. Die klinisch gesunden Schafe wurden nach Alter in vier verschiedene Gruppen eingeteilt, sodass ein vergleichbares medianes Alter in allen Gruppen gewährleistet war.

Die Kontrollgruppe, Gruppe 1, bestand aus 8 Schafen mit einem medianen Alter von 4,5 Jahren (Range: 3-9 Jahre). Diese Gruppe blieb unbehandelt. Gruppe 2, im folgenden OVX (Ovarektomie-Gruppe) genannt, bildeten 7 Schafe mit einem Altersmedian von 5,0 Jahren (Range: 3-9 Jahre). Sowohl die Kontrollgruppe, als auch die OVX-Gruppe wurden nach der ersten Urin- und Blut-Probenentnahme, DXA-Messung und Ovarektomie nach zwei Wochen tierärztlicher Versorgung in die Obhut eines Schäfers gebracht. Die Gruppe 3, bestehend aus 8 Schafen mit einem Altersmedian von 4,5 Jahren (Range: 3-8 Jahre) wird in der folgenden Arbeit als OVXD (Ovarektomie/Diät-Gruppe) bezeichnet. Über 32 Wochen wurde in dieser Gruppe beginnend zwei Wochen nach Ovariectomie, eine Calcium/Vitamin D-defizitäre Diät gefüttert. Das gleiche erhielt die Gruppe 4, hier als OVXDC-Gruppe (Ovarektomie/Diät/Cortikosteroid-Gruppe) bezeichnet, die zusätzlich zur Ovarektomie+ defizitärer Diät eine intramuskuläre Methylprednisolon-Suspension erhielt (alle 14 Tage 320 mg Methylprednisolon/Schaf). Der Altersmedian lag hier bei 5,5 Jahren (Range: 3-9 Jahre). Sowohl die OVXD-Gruppe, als auch die OVXDC-Gruppe wurde während der gesamten Forschungsperiode in einem mit stroheingestreuten, überdachten Außenstall mit Tageslicht in Kleingruppen in der Zentralen Forschungseinrichtung der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main gehalten.

Die folgende Tabelle zeigt die Gruppeneinteilung mit Identifikationsnummer und entsprechenden Daten der eingesetzten Schafe.

Material und Methoden

Gruppe	Eigene Nummer	Ohrmarkennummer	Alter zu Versuchsbeginn in Jahren	Altersmedian der Gruppen	Gewicht in kg
Kontrolle	K1	68489	3	4,5	58
Kontrolle	K2	83207	3		53
Kontrolle	K3	83193	4		54
Kontrolle	K4	55500	5		52
Kontrolle	K5	94902	3		81
Kontrolle	K6	83210	6		61
Kontrolle	K7	48689	7		77
Kontrolle	K8	32	9		70
OVX	O1	68484	3	5	56
OVX	O2	83205	3		53
OVX	O3	83206	4		56
OVX	O4	83211	5		60
OVX	O5	83188	6		58
OVX	O6	30	9		74
OVX	O7	5	6		81
OVXD	OD1	68483	3	4,5	47
OVXD	OD2	83186	8		55
OVXD	OD3	68488	4		54
OVXD	OD4	83214	4		65
OVXD	OD5	83209	5		59
OVXD	OD6	94901	3		86
OVXD	OD7	3	7		79
OVXD	OD8	68473	7		56
OVXDC	ODC1	83199	3	5,5	61

Material und Methoden

OVXDC	ODC2	83212	3		41
OVXDC	ODC3	83202	4		61
OVXDC	ODC4	83190	5		67
OVXDC	ODC5	83201	6		65
OVXDC	ODC6	6	7		60
OVXDC	ODC7	46	9		60
OVXDC	ODC8	83195	6		53

Tabelle 5: Gruppeneinteilung der Versuchsschafe mit entsprechender Ohrmarkennummer, Gewicht in kg, Alter zum Versuchsbeginn sowie der Altersmedian der entsprechenden Gruppen in Jahren.

Alle Schafe erhielten zu Beginn der Studie (Zeitpunkt 0) und zu jedem weiteren Messzeitpunkt (3 und 8 Monate) Gewichtskontrollen und wurden regelmäßig tierärztlich untersucht. Des Weiteren wurden die Schafe prophylaktisch mit 1 ml/ 5 kg KGW Fenbantel (Rintal 2,5% ad us. vet. Bayer AG, Leverkusen) entwurmt.

3.2 Induktion der Osteoporose:

3.2.1 Ovariectomie

Vorbereitung und Anästhesie

Zwölf Stunden vor der geplanten Operation wurden jeweils zwei Schafe gemeinsam in eine Innenbox des Forschungsinstituts verbracht, wo diese, soweit dies bei Wiederkäuern möglich ist, nüchtern blieben. Wasser hatten die Tiere zu jeder Zeit zur Verfügung.

Die Prämedikation erfolgte im Stall mit einer intramuskulären Gabe in die Hintergliedmaße. Die Medikation bestand aus 10mg/kg Ketaminhydrochlorid (Ketavet® 10 mg/ml, Bela- Pharm GmbH und Co.KG, Vechta), 0,01 ml/kg Xylazin (Rompun® 2%, Bayer AG, Leverkusen), 0,3 mg/kg Midazolam (Midazolam

Material und Methoden

Rotexmedica 5 mg/ml, ROTEXMEDICA GmbH, Trittau) und 0,01 mg/kg Atropin (Atropinsulfat B. Braun 0,5 mg/ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen).

Nach wenigen Minuten setzte die sedierende Wirkung ein und die Schafe konnten gewogen sowie am ventralen Abdomen geschoren werden. Weiterhin erfolgte zu jedem Messzeitpunkt eine Adspektion der Klauen und bei Bedarf eine Klauenpflege.

Anschließend wurde im Vorbereitungsraum zu den Zeitpunkten 0 und 3 Monate ein peripherer Venenzugang mit einer sterilen Venenverweilkanüle (Vasofix® 17G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) in die *Vena cephalica antebrachii* gelegt und mit Pflastern fixiert.

Die Schafe am Versuchsende (Zeitpunkt 8 Monate) erhielten einen zentralen Venenkatheter (Ein-Lumen-ZVK, 14 G., ARROW Deutschland GmbH, Erding) in die *Vena jugularis*. Dieser wurde mit Hautnähten fixiert.

Gleichzeitig wurde die restliche Wolle auf den freigeschorenen Stellen mittels Enthaarungscreme (Pilca Enthaarungscreme, DMV Diedrichs Markenvertrieb GmbH & Co. KG) entfernt.

Es erfolgte die intravenöse Narkoseeinleitung mit 2 mg/kg Propofol (Propofol 2% (20mg/1ml), Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg). Jedes Schaf erhielt zur Analgesie intravenös 2 µg/kg Fentanyl (Fentanyl-Hameln 50µg/ml, hameln pharmaceuticals GmbH, Hameln). Nach eintretender Muskelrelaxation wurden die Tiere intubiert und bei Bedarf eine Pansensonde eingeführt. Die weitere Narkoseerhaltung erfolgte während der Knochendichtebestimmung mit einem Propofol-Dauerperfusor mit 50ml/h (entspricht ca. 0,3 ml/kg/min Propofol).

Jedes Schaf (mit Ausnahme der Kontrollschafe) erhielt zu allen drei Zeitpunkten eine prophylaktische Antibiotikagabe von 0,1 ml/kg Penicillin (Veracin® RS, Albrecht GmbH, Aulendorf) sowie ein Opiat zur Analgesie von 0,01 mg/kg Buprenorphinhydrochlorid (TEMGESIC® Ampullen 0,3 mg, RB Pharmaceuticals GmbH, Mannheim) subkutan.

Operation

Alle Gruppen wurden mit Ausnahme der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 0 Monate im Anschluss an die Knochendichtemessung (im folgenden beschrieben) in den Operationsaal transportiert, dort in Rückenlage verbracht und an die Inhalationsnarkose mit Isofluran angeschlossen. Vereinzelt Tiere erhielten, je nach Kreislaufzustand (erhöhte/ verminderte Atemfrequenz, verzögerte kapilläre Rückfüllungszeit) zur besseren Überwachung, eine invasive arterielle Blutdruckmessung am Ohr. Es erfolgte eine Fixierung aller vier Gliedmaßen mit Mullbinden. Das Operationsfeld wurde gereinigt, desinfiziert und steril abgedeckt. Es erfolgte ein ca. 15 cm Hautschnitt kranial des Euters. Die darunterliegende Fettschicht wurde freipräpariert und die *Linea alba* dargestellt. Es erfolgte eine Stichinzision durch die *Linea alba* und das Peritoneum.

Der Uterus wurde in situ aufgesucht und die Ovarien nacheinander dargestellt. Die Ovarien wurden mit einem resorbierbaren Faden abgebunden und ligiert (Vicryl 4-0, Ethicon Johnson und Johnson Medical GmbH, Norderstedt). Anschließend konnten diese von den Ovargefäßen und Mesoovar abgesetzt werden. Es erfolgte eine Kontrolle möglicher Blutungen und eine Reposition des Uterus. Der Operationssitus wurde mehrschichtig verschlossen.

Nach der Operation wurden die Schafe zunächst alleine in eine Box gebracht, wo sie wieder zu vollem Bewusstsein kamen. Nach tierärztlicher Einschätzung wurden die Tiere zum Weidegang (OVX-Gruppe) bzw. in Außenstallungen in Kleingruppen (OVXD- und OVXDC-Gruppe) auf dem Gelände der Zentralen Forschungseinrichtung Frankfurt entlassen.

Nachsorge

In der Zeit nach der Operation wurden die Tiere analgetisch behandelt. Zunächst bekamen sie zweimal täglich 0,01 mg/kg Buprenorphinhydrochlorid subkutan (TEMGESIC® Ampullen 0,3 mg RB Pharmaceuticals GmbH, Mannheim) sowie einmalig ein nicht-steroidales Antiphlogistikum: 0,5 mg/kg Meloxicam intramuskulär (Metacam® 20 mg/ml ad. us. vet., Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH,

Material und Methoden

Ingelheim/Rhein) verabreicht. Nach Einschätzung der Tierärzte wurde das Opiat mit der Zeit reduziert und die Tiere entwöhnt.

In den ersten fünf Tagen post-OP wurden die Tiere zudem antibiotisch mit 0,1 ml/kg eines Penicillins (Veracin® RS, Albrecht GmbH, Aulendorf) alle 48 Stunden behandelt. Die Injektion erfolgte intramuskulär.

3.2.2 Fütterung

Die Gruppe OVXD und die Gruppe OVXDC erhielten zwei Wochen nach der Ovariectomie eine Spezial-Diät der Firma SNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest (Nr. S6189-S010, Sondermischung Schaf, 4 mm Pellet) mit reduziertem Calciumgehalt und ohne Vitamin D₃.

Dieses Futter erhielten die Schafe in den beiden genannten Versuchsgruppen morgens und abends, wobei die exakte Menge pro Schaf nicht bestimmt wurde. Wasser stand den Tieren zu jeder Zeit ad libitum zur Verfügung. Neben der Diät-Fütterung in Pelletform hatten die Tiere immer Zugang zu Stroh, da sie ganztägig in einer überdachten Außenbox mit Stroheinstreu in Gruppen gehalten wurden.

Die Fütterung blieb während der gesamten Studienperiode gleich.

Futterbestandteile	Standard-Diät (%)	Spezial-Diät (%)
Trockensubstanz	90,0	87,0
Rohprotein	18,0	14,7
Rohöle und Fette	3,8	4,9
Rohfaser	12,8	11,8
Rohasche	8,2	5,3
Stärke	19,4	28
Zucker	4,6	3,1
Calcium	1,10	0,16
Phosphor	0,55	0,76

Material und Methoden

Calcium/ Phosphor	2	0,21
Natrium	0,18	0,26
Magnesium	0,20	0,26
Kalium	2,10	1,10
Vitamin A	12.000 IE/kg	12.000 IE/kg
Vitamin D ₃	1.100 IE/kg	-
Vitamin E	105 mg/kg	85 mg/kg

Tabelle 6: Analytische Bestandteile und Ernährungszusätze der verwendeten Futtermittel: Standardfuttermittel für die Schafe der Gruppen Kontrolle und OVX, Spezial-Diät für die Schafe der Gruppen OVXD und OVXDC (beide Diäten: Firma SNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest).

Die Schafe der Kontroll- und OVX-Gruppe wurden in den Wintermonaten mit einer nicht genau bestimmten Menge eines Standardfutters (siehe Tabelle, ebenfalls Firma SNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest) gefüttert. Im Frühjahr erfolgte für beide Gruppen der Weidegang, wobei auch hier die exakte aufgenommene Futtermenge nicht bekannt ist.

Standardfutter und Spezialdiät weisen energetisch keine Unterschiede auf und decken den üblichen Tagesbedarf eines ausgewachsenen Schafes ab.

3.2.3 Glukokortikoidgabe

Zwei Wochen nach Ovariectomie erhielt jedes Schaf der Gruppe OVXDC zusätzlich zur Diät im vierzehntägigen Abstand eine Gabe von 320 mg Methylprednisolon/Schaf (Depot- Medrate® ad us. vet 40 mg/ml Injektionssuspension, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin). Das entspricht auf eine Woche umgerechnet 160 mg/Schaf. Jedes Schaf erhielt somit 8 ml, die auf zwei Injektionsstellen aufgeteilt wurden. Die Verabreichung erfolgte abwechselnd intramuskulär in die Vorder- und Hintergliedmaße. Diese Dosierung wurde während der gesamten Versuchsperiode beibehalten.

3.3 Knochendichtebestimmung (DXA)

Bei allen 31 Schafen wurden zu den Zeitpunkten 0, 3 und 8 Monaten eine Knochendichtemessung durchgeführt. Hierfür wurde die Methode der Dual- Röntgen-Absorptiometrie (DXA) verwendet.

Die Rohdaten der DXA-Messung wurden in Zusammenarbeit mit den Doktoranden des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie (Leiterin Prof. Dr. Katrin Susanne Lips) und der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie (Leiter: Prof. Dr. Christian Heiß), Fachbereich 11, Justus-Liebig-Universität Gießen ermittelt. Die Knochendichtebestimmung erfolgte mithilfe der DXA-Messung.

Für das Erlangen scharfer Bilder war eine vorherige Anästhesie notwendig (siehe Vorbereitung und Anästhesie). Jedes Schaf wurde möglichst gerade in Brust-Bauch Lage gelagert und fixiert. Der gesamte Körper wurde anschließend mit dem DXA-Gerät (Lunar Prodigy, GE Healthcare GmbH, Solingen) gescannt und mit der dazugehörigen Messsoftware unter Berücksichtigung des Körpergewichtes (enCORE software, GE Healthcare GmbH, Solingen, Version 13.40) ausgewertet.

Für die Analyse der ermittelten zweidimensionalen Bilder wurden verschiedene *Regions of Interest (ROIs)* festgelegt. Diese ROIs haben eine definierte und konstante Fläche, die auf die verschiedenen Skelettanteile des Schafs projiziert wurden. In der vorliegenden Studie diente das ROI: „*abdominal width*“ als Referenzmethode. Hierzu erfolgte nach jeder Messung die manuelle Analyse durch Ausrichtung der ROIs auf das Abdomen inklusive der Lendenwirbel L1 bis L6 des Schafes. Die Software ermittelte daraufhin folgende einzelne Messwerte:

- bone mineral density (BMD) in g/cm^2
- bone mineral content (BMC) in g
- Körperfettanteil in % und g

Vor jeder Messung wurde zur Qualitätssicherung eine Kalibrierung durchgeführt.



Abbildung 7: Schaf bei Knochendichtebestimmung mittels Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DXA)

Z-Score

Für die Beurteilung der Effektivität der verwendeten Induktionsmaßnahmen bezüglich der Osteoporose wurde der Z-Score für die verschiedenen Gruppen (OVX, OVXD, OVXDC) für die Zeitpunkte 3 und 8 Monate mit folgender Formel errechnet:

Z-Score:

$$\frac{\text{BMD Osteoporosegruppe} - \text{BMD altersgleicher, gesunder Kontrollgruppe}}$$

$$\text{Standardabweichung altersgleicher Kontrollgruppe}$$

Zum Zeitpunkt 0 ermittelte Werte aller 31 Schafe dienten hier als alters- und geschlechtsgleiche Vergleichsgruppe zur Errechnung des Z-Score. Vergleichbar mit dem Vorgehen in der Humanmedizin wurde hier ein Z-Score > -1 als alterstypische, physiologische Knochendichte angesehen.

3.4 Probenentnahme für Laboruntersuchungen

Die Blutprobengewinnung erfolgte unter Berücksichtigung des zirkadianen Rhythmus zu jedem Messzeitpunkt morgens im Stall der Zentralen Forschungseinrichtung. Hierzu wurde die *Vena jugularis* mit einer sterilen Kanüle (20G, Firma Becton Dickinson, Spanien) punktiert und das venöse Blut mit einer 10 ml Spritze (Firma Becton Dickinson, Spanien) abgezogen. Die Schafe waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht sediert. Die Vollblutproben wurden nach ca. 30 min bei 3460-facher Erdbeschleunigung (G) für 10 Minuten zentrifugiert (EBA 20, Hettich GmbH & Co., Tuttlingen) und das gewonnene Serum in 2 ml fassende Mikroröhrchen mit Schraubverschluss (Firma Sarstedt, Nümbrecht) aliquotiert. Anschließend wurden die Serumproben bis zur Lagerung bei – 80°C auf Trockeneis gelegt.

Die Uringewinnung erfolgte mittels Katheterisierung der Schafe. Dazu wurden die bereits prämedizierten Schafe zu den jeweiligen Zeitpunkten 0, 3 und 8 Monate in Brust-Bauch Lage gelagert und die Vulva gereinigt. Anschließend konnte unter digitaler Kontrolle ein steriler Katheter (Rüsch-Ernährungssonde, Größe 4, Willy Rüsch GmbH, Kernen) vorgeschoben und der Urin in sterilen Röhrchen (Tube 10 ml, Firma Sarstedt, Nümbrecht) gesammelt werden. Die Urinproben wurden ebenfalls in 2 ml Serumröhrchen mit Schraubverschluss (Firma Sarstedt, Nümbrecht) aliquotiert und auf Trockeneis gelagert. Alle Proben eines Tages wurden in einer Transferbox mit Trockeneis nach Gießen transportiert und dort bei – 80°C bis zur Durchführung weiterer Untersuchungen aufbewahrt.

Am Endzeitpunkt (Zeitpunkt 8 Monate) erfolgte die Blutprobenentnahme durch einen zentralen Venenkatheter (Ein-Lumen-ZVK, 14 G., ARROW Deutschland GmbH, Erdingen). Dieser wurde mit Hautnähten fixiert und diente zur Blutentnahme größerer Probenvolumina (ca. 50 ml) und später zur Injektionsnarkose sowie Euthanasie.

3.5 Euthanasie

Nach 8 Monaten (Endzeitpunkt) wurden die Schafe nach letzter Probenentnahme im bereits narkotisierten Zustand mit 50 mg/kg Pentobarbital-Natrium (Anestesal®, Pfizer, Mexiko) intravenös schmerzlos eingeschläfert.

3.6 Laboruntersuchungen

Alle Laboruntersuchungen erfolgten im Zentrallabor, Klinikum Veterinärmedizin, Klinische Pathophysiologie und Klinische Laboratoriumsdiagnostik an der Justus-Liebig-Universität in Gießen. Die Untersuchungen umfassten die nachfolgend aufgeführten klinisch-chemischen Analysen der Serum- und Urinproben sowie die Bestimmung der enzymatischen Immunreaktivität verschiedener Parameter, deren Methoden nachfolgend beschrieben werden.

Folgende Analysegeräte wurden für die Bestimmung der klinisch-chemischen Analysen verwendet.

Analysegeräte:

- Nova CRT8 der Firma Nova Biomedical GmbH, Rödermark
- ABX Pentra 400 der Firma Horiba, Montpellier, Frankreich

Für beide Geräte wurde zweimal täglich (ca. 07:00 Uhr und ca. 12:00 Uhr) eine interne Qualitätskontrolle mit kommerziell erhältlichen Qualitätskontrollmaterialien mit jeweils einer normalen und abnormalen Kontrolle durchgeführt (für den Nova CRT 8: Nova control 1 und 2 und für den Pentra 400: Axonlab normal and abnormal, Axon Lab AG, Reichenbach). Zudem nahm das Zentrallabor an regelmäßigen externen Qualitätskontrollen teil. Diese umfassten ein humanmedizinisches Programm (RIQUAS, Randox International Quality Assessment Scheme) und ein veterinärmedizinisches Programm (Veterinary Laboratory Association, VLA, Genzyme Diagnostics). Das RIQUAS Programm wurde alle 2 Wochen durchgeführt während die Teilnahme am VLA Programm alle 3 Monate erfolgte.

3.6.1 Elektrolyte und Hormone

3.6.1.1 Calcium, Magnesium und Phosphat

Calcium und Magnesium (ionisiert)

Die Bestimmung des ionisierten Calcium und Magnesium erfolgte durch das Analysegerät Nova CRT8, Nova Biomedical GmbH. Bei dem Messprinzip handelt es sich um eine Potentiometrie, bei der das ionisierte Calcium und ionisiertes Magnesium

mithilfe einer ionenselektiven Elektrode und ionenselektiven Membran bestimmt wird. Das ionisierte Calcium und Magnesium wird in mmol/l angegeben.

Phosphat

Die Konzentration von Phosphat in Serum und Urin wurde mit dem klinisch-chemischen Analysegerät ABX Pentra 400, Horiba analysiert. Bei den verwendeten Reagenzien handelte es sich um Phosphorus CP der Firma Horiba ABX, Montpellier, Frankreich. Vor Bestimmung der Phosphatkonzentration im Urin wurde dieser zuvor für 1 Minute bei 18626-facher Erdbeschleunigung (G) (Mikro 200, Hettich GmbH & Co., Tuttlingen) zentrifugiert.

Die Messung erfolgte im Serum und Urin durch eine UV-Methode mit Phosphomolybdat.

Die Konzentration von anorganischem Phosphat in der Serumprobe wurde mittels folgender Reaktion bestimmt:



3.6.1.2 fraktionierte Elektrolytausscheidung von Phosphat (FEP)

Für die Berechnung der fraktionierten Phosphatausscheidung im Urin wurden die Phosphatmessungen im Serum und Urin wie vorher beschrieben verwendet.

Die dazugehörige quantitative Bestimmung von Kreatinin erfolgte ebenfalls durch den ABX Pentra, Horiba. Die verwendeten Reagenzien stammten von Axon Lab AG, Baden, Schweiz mit dem Handelsnamen CREA PAP.

Das Messprinzip des Kreatinins beruht auf einem enzymatischen Farbttest. Hierbei wird Kreatinin mittels des Enzyms Kreatininase zu Kreatin und weiter mit Kreatinase zu Sarcosin umgewandelt. Das Oxidationsprodukt von Sarcosin und Sarcosinoxidase ist Wasserstoffperoxid. Unter katalytischer Wirkung bildet das entstandene Wasserstoffperoxid mit 4-Aminoantipyrin (PAP) und HTIB (3-Hydroxy-2,4,6-triiodo

Material und Methoden

Benzoessäure) der Peroxidase einen roten Chinon-Farbstoff. Die Farbintensität des gebildeten Chinon-Farbstoffs ist direkt proportional zur Kreatininkonzentration und wurde fotometrisch bei 550 nm gemessen.

Für die Bestimmung von Kreatinin im Serum und Urin wurde dasselbe Messprinzip verwendet, allerdings erfolgte für die Urinuntersuchung eine 50-fache Verdünnung mit destilliertem Wasser.

Die fraktionierte Ausscheidung von Phosphat im Urin wurde wie folgt ermittelt:

Formel: $FEP (\%) = (UPhos / Phos) \times (Crea / UCrea) \times 100$

Dabei stehen UPhos und UCrea für die Phosphat- bzw. Kreatininkonzentration im Urin und Phos und Crea für die jeweilige Konzentration von Phosphat bzw. Kreatinin im Serum.

Die übrigen Parameter wurden mittels kommerziell erhältlicher kompetitiver Enzyme-Immunoassays (EIAs) oder Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) gemessen, die im nachfolgend beschrieben werden. Hierbei handelte es sich um quantitative Assays. Für die Konzentrationsbestimmung der jeweiligen Parameter war die Erstellung einer Standardkurve erforderlich. Dazu wurden Proben mit unterschiedlichen bekannten Konzentrationen (im Testkit enthalten) mitgeführt und unter den gleichen Bedingungen inkubiert wie die unbekannt Proben. Hierbei erfolgte, wenn möglich, ein Doppelansatz der Standardproben auf jeder verwendeten Mikrotiterplatte.

In der folgenden Tabelle sind die Geräte und Verbrauchsmaterialien für die durchgeführten EIAs/ELISAs aufgeführt. Diese werden somit nicht mehr gesondert angegeben.

Geräte	Hersteller
Photometer: E-Liza Mat 3000	DRG Instruments GmbH, Marburg
Photometer: iEMS Reader MF	Labsystems, Finnland
Washer: PW 40 Microplate Washer	Bio-Rad, München

Material und Methoden

Wasserbad: Typ 1012	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Vortexer: Reax control	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Horizontaler Rüttler für Mikrotiterplatten: Rüttlerelectronic, MTS2	IKA®Labortechnik, Staufen
Zentrifuge: Micro 120	Hettich GmbH und Co. KG, Tuttlingen
8-Kanal-Pipette, PIPETMAN® 8x200	Gildson International, Limburg- Offheim
Pipetten „Research“ 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen: 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nürnberg
Röhrchen-Rack für 25-OH-Vitamin D	DRG Instruments GmbH, Marburg

Tabelle 7: Geräte und Verbrauchsmaterialien zur Durchführung der EIAs/ELISAs

Die Bestimmung eines Parameters erfolgte immer am gleichen ELISA Reader (Photometer), um gerätespezifische Abweichungen zu vermeiden. Die Verwendung von jeweiligen ELISA Readern war abhängig von der Verfügbarkeit.

3.6.1.3 Vitamin D (25-OH-Vitamin D)

Die quantitative Bestimmung des 25-OH-Vitamin D (total) erfolgte durch einen humanen Festphasen-EIA der Firma DRG Instruments GmbH, Marburg.

Testprinzip:

Der Test basiert auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung.

Zuerst mussten die Proben, Standards und Kontrollen in gesonderten Gefäßen (Röhrchen-Rack für 25-OH-Vitamin D, DRG Instruments GmbH) mit Denaturationspuffer vorbehandelt werden, um ein Lösen des Vitamin D aus der Bindung des Vitamin D-Bindeproteins (VDBP) zu bewirken. Nach anschließender

Material und Methoden

Zugabe des Neutralisationpuffers wurden nacheinander biotinyliertes 25-OH Vitamin D (Enzymkonjugat) und Peroxidase-markiertes Streptavidin (Enzymkomplex) zugegeben. Die gut durchmischte Lösung wurde in Vertiefungen (Wells) der Mikrotiterplatte übertragen. Hier erfolgte nun eine Konkurrenz von endogenem 25-OH-Vitamin D und biotinyliertem 25-OH-Vitamin D um die Bindungsstelle des Vitamin D-Bindeproteins (VDBP). Dieses war auf der Mikrotiterplatte immobilisiert. Die Bindung von biotinyliertem 25-OH-Vitamin D wurde durch Peroxidase-markiertes Streptavidin nachgewiesen. Darauffolgend wurden die Mikrotiterwells nach Inkubation gewaschen, um ungebundene Substanzen zu entfernen. Die anschließende Zugabe der Substratlösung führte zu einer Farbentwicklung, die nach einer definierten Zeit gestoppt wurde. Die Intensität der gebildeten Farbe war umgekehrt proportional der 25-OH-Vitamin D-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wurde bei 450 nm mittels Photometer gemessen.

Nachfolgend wird die Zusammensetzung der im ELISA eingesetzten Lösungen (Bestandteile des Testkits) aufgeführt:

- Mikrotiterplatte, 96 Wells, 12 x 8 Wells
Mit Vitamin D-Bindeprotein (VDBP) beschichtet
- Standard (Standard 0-5)
Konzentrationen, 0 – 4 – 10 – 25 – 60 – 130 ng/mL
- Hohe und niedrige Kontrolle (Low und High Kontrolle)
Low: 11, 30 ng/ml (7, 35- 15, 26 ng/ml)
High: 65, 86 ng/ml (42, 81- 88, 91 ng/ml)
- Denaturierungspuffer
- Neutralisationspuffer
- Enzymkonjugat
Vitamin D₃ mit Biotin konjugiert
- Enzymkomplex
Streptavidin mit Peroxidase markiert
- Substratlösung
Substratlösung TMB (Tetramethylbenzidin)

Material und Methoden

- Stopplösung
Enthält 0,5 M H₂SO₄
- Waschlösung, 40x konzentriert
Zur Verwendung wurde diese 1:40 mit destilliertem Wasser verdünnt

Alle Reagenzien und Serumproben wurden vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt.

Testdurchführung:

Die Testdurchführung wird im Folgenden tabellarisch aufgezeigt.

Freisetzung und Vorbereitung:

Nr.	Arbeitsschritt	Menge (µl)	Zeit und Temperatur
1	Standard, Kontrollen und Serumproben in die entsprechenden Röhrchen geben (nicht in die Mikrotiterplatte)	25 µl	
2	Beschichtung mit Denaturierungspuffer	50 µl	30 min bei 37°C
3	Neutralisation mit Neutralisierungspuffer	200 µl	
4	Beschichtung mit Enzymkonjugat	50 µl	
7	Beschichtung mit Enzymkomplex	50 µl	
8	Alle Gefäße schütteln		10 sec

EIA-Durchführung:

Nr.	Arbeitsschritt	Menge (µl)	Zeit und Temperatur
1	Die durchgemischten Standards, Kontrollen, Proben in entsprechende Wells überführen und versiegeln	200 µl	60 min bei 37°C
2	Waschen mit verdünntem Waschpuffer (ELISA Washer)	300 µl	4-mal

Material und Methoden

3	Beschichtung der Wells mit Substratlösung	200 µl	15 min bei Raumtemperatur
4	Abstoppen	100 µl	
5	Messung bei 450 nm		

Die Messungen der Proben der 31 Schafe wurden auf zwei ELISA Platten durchgeführt. Es erfolgte eine Doppelbestimmung der Standards und Kontrollen.

3.6.1.4 Parathormon (PTH intakt)

Der Versuch der quantitativen Parathormonbestimmung beim Schaf erfolgte durch einen kommerziell erhältlichen humanen ELISA der Firma DRG Instruments GmbH, Marburg. Ein bereits für das Schaf etablierter oder laut Literatur routinemäßig verwendeter ELISA für PTH stand nicht zur Verfügung.

Bei diesem PTH-ELISA handelte es sich um einen *Solid Phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay* (EASIA) im Mikrotiterplattenformat.

Testprinzip:

Die Wells der Mikrotiterplatte sind mit polyklonalen Antikörpern (PAk, Ziege-Anti 1-34 PTH-Fragment) beschichtet. Die verwendeten Kalibratoren und Proben reagieren nach Zugabe mit diesen gebundenen polyklonalen Antikörper (Ziege-Anti 1-34 PTH-Fragment). Überschüssige Antigene werden nach Inkubation durch Waschen der Wells entfernt. Der darauffolgende hinzugegebene monoklonale Antikörper (MAk, Maus-Anti 44-68 PTH-Fragment), der mit Meerettich-Peroxidase (HRP) markiert ist, bildet nach einer Inkubationsphase einen Sandwich-Komplex: PAK- „Human“ - PTH - MAk – HRP. Die nicht gebundenen enzymgekoppelten Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Durch die gebundenen enzymgekoppelten Antikörper wird eine Farbreaktion ausgelöst, die photometrisch gemessen werden kann. Für die Detektion der Farbreaktion wird Tetramethylbenzidin (TMD) hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Hinzufügen einer Stopplösung beendet und die

Material und Methoden

Mikrotiterplatte wird bei adäquater Wellenlänge ausgewertet. Die Menge an Substratumsatz wird kolometrisch durch Messung der Absorption bestimmt. Diese ist proportional zur PTH-Konzentration.

Nachfolgend wird die Zusammensetzung der im ELISA eingesetzten Lösungen (Bestandteile des Testkits) aufgeführt:

- Mikrotiterplatte
96 Anti-PTH beschichtete Wells (PAK; Ziege-Anti 1-34 PTH-Fragment).
- Konjugat:
Meerettich Peroxidase (HRP) markierter Anti-PTH Antikörper (monoklonaler Antikörper: MAk, Maus-Anti 44-68 PTH-Fragment) in Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin, Thymol und Schafserum
- Kalibrator 0
In Humanserum und Thymol
- Kalibrator N = 1 bis 5
Werte: 31 – 70 – 310 – 980 – 1900 pg/ml
- Waschlösung
Konzentrat, NaCl-Tween 20
- Kontrollen
Niedrige Kontrolle (N1); 53,1 +/- 13,3 pg/ml
Hohe Kontrolle (N2); 250 +/- 63 pg/ml
- Inkubationspuffer
Mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Benzamidin und Azid (< 0,1%)
- Chromogenes TMB
(Tetramethylbenzidin)
- Stopplösung
HCL, 1,0 N

Die Kalibratoren wurden vor Beginn des ELISA mit 3,0 ml (Kalibrator 0), bzw. 1,0 ml (anderen Kalibratoren) destilliertem Wasser rekonstituiert. Ebenso wurden die

Material und Methoden

Kontrollen mit 1,0 ml dest. Wasser fertiggestellt. Die Waschlösung wurde 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Alle Reagenzien- und Serumproben wurden vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt.

Testdurchführung:

Die Testdurchführung wird im Folgenden tabellarisch aufgeführt:

Nr.	Arbeitsschritt	Menge (µl)	Zeit und Temperatur
1	Inkubationspuffer in alle Wells geben	50 µl	
2	Kalibratoren, Kontrollen und Probe in die entsprechenden Wells überführen. Inkubation auf horizontalem Schüttler.	200 µl	2 Stunden bei Raumtemperatur
3	Waschen mit entsprechender Waschlösung	400 µl	4-mal
4	Beschichtung mit Anti-PTH-HRP- Konjugat. Inkubation auf horizontalem Schüttler.	100 µl	60 min
7	Waschen mit entsprechender Waschlösung	400 µl	4-mal
8	Pipettieren der Substratlösung. Inkubation auf horizontalen Schüttler.	100 µl	30 min
9	Abstoppen	200µl	
10	Messung bei 450 nm		

Da es sich um einen nicht für das Schaf etablierten ELISA handelt und sich keine Erfahrungswerte für diese Tierart fanden, wurde zuerst nur eine ELISA-Platte für die zum Zeitpunkt 8 Monate entnommenen Proben verwendet, da hier viel Probenmaterial vorhanden war und zudem im Falle des gelungenen Testes deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen zu erwarten wären. Da jedoch alle gemessenen Werte außer den Resultaten der Kontrollen und der Standardkurve dem Leerwert entsprachen, erfolgte kein weiterer Test.

3.6.2 Marker der Knochenformation

3.6.2.1 Knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP)

Zur Bestimmung der knochenspezifischen Phosphatase im Serum wurde ein humaner EIA, hier MicroVue BAP der Firma TECOMedical GmbH, Bünde eingesetzt, für den von der Firma eine Kreuzreaktivität für das Schaf angegeben wurde

Testprinzip:

Die Mikrotiterwells sind mit monoklonalen Anti-BAP-Antikörpern beschichtet. Diese binden in der Probe vorliegende knochenspezifische alkalische Phosphatase. Die Enzymaktivität des gebundenen BAP wird mithilfe eines p-Nitrophenylphosphat (pNPP) Substrats nachgewiesen. Der Farbumschlag und somit die optische Dichte wird bei 405 nm Wellenlänge abgelesen.

Nachfolgend wird die Zusammensetzung der im EIA eingesetzten Lösungen aufgeführt:

Für die Durchführung eingesetzte Reagenzien (Bestandteile des Testkits):

- BAP-Standardlösungen A-F
(A=0, B=2, C=20, D=50, E=80, F= 140 E/l BAP)
Von Osteosarkomzellen hergestelltes BAP in Pufferlösung
- Kontrollen
Von Osteosarkomzellen hergestelltes BAP in Pufferlösung
Niedrige Kontrolle: 13,8 U/L (10,5 - 17,1 U/L)
Hohe Kontrolle: 60,1 U/L (46,1 – 75,2 U/L)
- Beschichte Teststreifen der Mikrotiterplatte
Gereinigte monoklonale Anti-BAP-IgG Antikörper von Mäusen absorbiert auf die Vertiefungen der Teststreifen
- Stopplösung
0,5 N NaOH
- 10-fach konzentrierter Waschlösung
Nicht ionisches Detergens in Pufferlösung mit Natriumazid (0,05%) als Konservierungsmittel

Material und Methoden

- Testpufferlösung
Gepufferte Lösung mit Magnesiumchlorid, Zinksulfat, Tensid und Natriumazid (0,05%) als Konservierungsmittel
- Substratpuffer
2-Amino-2-methyl-1-propanol-Lösung mit N-(2-Hydroxyethyl) ethylendiamintetraacetat (HEDTA), Magnesiumchlorid, Zinksulfat und Natriumazid (0,05%) als Konservierungsmittel
- Substrattabletten
p-Nitrophenylphosphat (pNPP)

Der verwendete Waschpuffer wurde im Verhältnis 1:10 mit entionisiertem Wasser verdünnt. Die Substratlösung wurde eine Stunde vor Gebrauch angesetzt. Hierzu wurde in die benötigten Substratpufferflaschen eine Substrattablette gegeben und 60 min lang unter anfänglichem Schütteln aufgelöst.

Testdurchführung:

Die Testdurchführung wird im Folgenden tabellarisch aufgeführt:

Nr.	Arbeitsschritt	Menge (µl)	Zeit und Temperatur
1	Testpufferlösung in die Wells geben	125 µl	
2	Standardlösung, Kontrolle und Proben in die entsprechenden Wells füllen, anschließend vorsichtig schwenken	20 µl	3 Stunden bei Raumtemperatur
3	Manuelles Waschen mit entsprechendem Waschpuffer	250 µl	4-mal
4	Beschichtung der Wells mit Substratlösung	150 µl	30 min bei Raumtemperatur
5	Abstoppen	100 µl	
6	Messung bei 405 nm		

Die Messungen der von den 31 Schafen zu den 3 Messzeitpunkten entnommenen Proben wurden auf zwei ELISA-Platten durchgeführt. Es erfolgte eine Doppelbestimmung der Standards und Kontrollen.

3.6.2.2 Osteocalcin (intakt)

Bei der quantitativen Bestimmung von intaktem Osteocalcin im Serum wurde ein kommerziell erhältlicher humaner EIA (MicroVue Osteocalcin EIA) der Firma TECOMedical GmbH, Bünde verwendet. Nach Angaben der Firma liegt eine Kreuzreaktivität für das Schaf vor.

Testprinzip:

Der MicroVue Osteocalcin EIA ist ein kompetitiver Immunoassay. Das Osteocalcin wird quantitativ bestimmt. Die Mikrotiterwells sind mit einem Anti-Osteocalcin-Antikörper von Mäusen und einem alkalischen Anti-Maus-Immunglobulin G (IgG)-Phosphatasekonjugat beschichtet. Nach der Bindung des vorhandenen Osteocalcin in den Standards, Kontrollen und Seren wird die Enzymaktivität des gebundenen Osteocalcin mithilfe eines p-Nitrophenylphosphat (pNPP) Substrats bestimmt.

Nachfolgend wird die Zusammensetzung der im ELISA eingesetzten Lösungen aufgeführt:

Für die Durchführung eingesetzte Reagenzien (Bestandteile des Testkit):

- Osteocalcin Standardlösungen: Standard A-F
(A = 0; B = 1,7; C = 3,5; D = 7,3; E = 14,5; F = 29,0 ng/ml)
Von humanen Knochen isoliertes, lyophilisiertes Osteocalcin mit Puffersalzen und Stabilisatoren
- Kontrollen
Von humanen Knochen isoliertes, lyophilisiertes Osteocalcin
Niedrige Kontrolle: 5,5 ng/ml (4,1 - 6,9 ng/ml)
Hohe Kontrolle: 18,5 ng/ml (14,1 - 22,9 ng/ml)
- Beschichtete Teststreifen
Von humanen Knochen isoliertes und auf die Vertiefungen der Teststreifen adsorbiertes Osteocalcin
- Stopplösung

Material und Methoden

0,5 N NaOH

- 10-fach konzentrierter Waschpuffer
Nicht ionisches Detergens in Pufferlösung mit Natriumazid (0,05%) als Konservierungsmittel
- Anti-Osteocalcin
Monoklonaler Anti-Osteocalcin-Antikörper von Mäusen in einer Pufferlösung aus nicht ionischen Detergens, Stabilisatoren und Natriumazid (0,05%) als Konservierungsmittel
- Substratpuffer
Eine Lösung aus Diethanolamin und Magnesiumchlorid mit Natriumazid (0,05%) als Konservierungsmittel
- Substratabletten
p-Nitrophenylphosphat
- Enzymkonjugat
Lyophilisierter Anti-Maus-IgG-Antikörper von Ziegen im Konjugat mit alkalischer Phosphatase

Alle Reagenzien wurden vor der Durchführung des EIAs auf eine Temperatur von 20 - 25°C gebracht und weiter vorbereitet.

Der 10-fach konzentrierte Waschpuffer wurde im Verhältnis 1:10 mit vollentsalztem Wasser verdünnt. Das Enzymkonjugat wurde 2 Stunden vor Gebrauch angesetzt. Dazu wurden alle benötigten Fläschchen des Enzymkonjugats mit 10 ml des einfach konzentrierten Waschpuffers angerührt. Die Standardlösungen wurden mit 0,5 ml 1-fach konzentriertem Waschpuffer wiederhergestellt. Die Tablette musste für mindestens 15 Minuten vollständig aufgelöst werden. Ebenfalls musste die Substratlösung innerhalb einer Stunde vor Gebrauch angesetzt werden. In jede benötigte Substratpufferflasche wurde eine Substratablette gegeben. Diese musste für 30 - 60 Minuten aufgelöst werden.

Alle vorbereiteten Reagenzien wurden kräftig geschüttelt.

Material und Methoden

Nr.	Arbeitsschritt	Menge (µl)	Zeit und Temperatur
1	Standardlösung, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Wells überführen	25 µl	
2	Anti-Osteocalcin in die Vertiefungen geben	125 µl	2 Stunden bei Raumtemperatur
3	Waschen mit entsprechendem Waschpuffer	300 µl	3-mal
4	Beschichtung der Wells mit Enzymkonjugat	150 µl	60 min bei Raumtemperatur
5	Waschen mit entsprechendem Waschpuffer	300 µl	3-mal
6	Beschichtung der Wells mit Substratlösung	50 µl	35-40 min
7	Abstoppen	50 µl	
8	Messung bei 405 nm		

Die von den Schafen entnommenen Serumproben wurden auf zwei ELISA-Platten gemessen. Es erfolgte ein Doppelansatz der Standards und Kontrollen auf beiden Platten.

3.6.3 Marker der Knochenresorption

3.6.3.1 N-terminales Telopeptid des Kollagen Typ I (NTX)

Für die Bestimmung des NTX-Serumspiegel wurde der EIA OSTEOMARK® NTX-Serum der Firma TECOMedical GmbH, Bünde verwendet, für den von der Firma eine Kreuzreaktivität für die Tierart Schaf angegeben ist.

Testprinzip:

Der Test basiert auf dem Prinzip der kompetitiven Hemmung.

NTX-Epitope sind in den Wells der Mikrotiterplatte adsorbiert. Die verdünnten Proben werden in die Mikrotiterwells gegeben und anschließend mit monoklonalen, Meerrettichperoxidase markierten Antikörpern versetzt. Das in den Patientenproben vorhandene NTX konkurriert dabei mit dem NTX-Epitop um Antikörperbindungsstellen. Die nun gebundenen, markierten Antikörper werden nach einer Waschphase

Material und Methoden

kolorimetrisch anhand der Bildung eines Peroxidsubstrats bestimmt. Die Extinktion wird spektrophotometrisch gemessen.

Nachfolgend wird die Zusammensetzung der im EIA eingesetzten Lösungen aufgeführt:

Für die Durchführung eingesetzte Reagenzien (Bestandteile des Testkit):

- Mikrotiterplatte
Mit absorbiertem, synthetischem NTX-Antigen beschichtet
- Proben Diluent
Mit ProClin™ 300 (0,05%) als Konservierungsmittel
- Antikörperkonjugat- Konzentrat
Gereinigte monoklonale Maus-Antikörper gegen NTX, mit Meerrettichperoxidase konjugiert
- Antikörperkonjugat-Diluent
Zum Verdünnen des Antikörperkonjugat-Konzentrats. Mit ProClin™ 300 (0,05 %) als Konservierungsmittel
- 30-faches Waschkonzentrat
Ionische Detergenzlösung
- Chromogen-Reagenz
3,3',5,5' - Tetramethylbenzidin in Dimethylsulfoxid
- Gepuffertes Substrat
Gepuffertes Wasserstoffperoxid
- Stopp-Reagenz
1 N Schwefelsäure
- Testkalibratoren
(0, 5, 10, 20, 40 nM Knochenkollagenäquivalent (BCE)
Gereinigtes NTX-Antigen in stabilisierten Protein-Diluent
- Kontrollen
Humanserum mit bekannter NTX-Konzentration
Niedrige Kontrolle: 9,0 nM BCE (6,7 - 11,3 nM BCE)
Hohe Kontrolle: 26,6 nM BCE (24,0 - 29, 2 nM BCE)

Alle Reagenzien wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht, wobei diese 21°C nicht überschreiten durften. Die Vorbereitung der verwendeten Reagenzien erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Der Waschpuffer wurde hierzu um eine einfach konzentrierte Lösung zu erreichen, 1:30 mit deionisiertem Wasser verdünnt.

Material und Methoden

Die Konjugatlösung wurde durch Zusammenführen des Antikörperkonjugats mit dem Antikörperkonjugat-Diluent im Verhältnis 1:101 erstellt. Des Weiteren mussten die Kalibratoren, Kontrollen und Proben mit dem Verdünnungs-Diluent in einem Verhältnis von 1:5 gemischt werden.

Durchführung:

Nr.	Arbeitsschritt	Menge (µl)	Zeit und Temperatur
1	Verdünnte Kalibratoren, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Wells geben	100 µl	
2	Beschichtung der Wells mit verdünnter Konjugatlösung, anschließend 15-20 Sekunden schwenken	100 µl	90 Minuten bei 21°C
3	Waschen mit entsprechenden Waschpuffer	350 µl	5-mal
4	Verdünnte Lösung aus Chromogen-Reagenz und gepufferter Substratlösung pipettieren	200 µl	30 min bei 21°C
5	Abstoppen, kurz schwenken	100 µl	5 min bei 21°C
6	Messung bei 450 nm		

Die 31 Schafproben wurden auf zwei ELISA-Platten gemessen. Es erfolgte ein Doppelansatz der Standards und Kontrollen.

3.6.3.2 Cathepsin K

Für die quantitative Bestimmung von Cathepsin K fand sich kein bereits etablierter oder in publizierten Studien verwendeter ELISA für die Messung beim Schaf. Die Bestimmung des Cathepsin K wurde in dieser Arbeit anhand eines humanen ELISAs der Firma Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Wien durchgeführt. Nach Angaben des Herstellers besteht eine hohe Homologie mit verschiedenen Tierarten (Maus 86%, Ratte 88%, Schwein 97%, Hase 96%).

Material und Methoden

Testprinzip:

Das Testprinzip beruht auf einem Immunabsorptionsverfahren. Die Mikrotiterplatten sind mit einem Anti-Cathepsin K Antikörper beschichtet. Daran bindet sich im Serum vorhandenes Cathepsin K, welches wiederum von einem weiteren spezifischen Antikörper, der mit Meerrettichperoxidase markiert ist, detektiert wird. Die Zugabe der Substratlösung (Tetramethylbenzidin-Lösung) bewirkt eine Konzentrationsänderung des durch die enzymatische Reaktion entstandenen Farbstoffs. Dies kann mit dem Photometer bestimmt werden.

Nachfolgend wird die Zusammensetzung der im ELISA eingesetzten Lösungen aufgeführt:

Für die Durchführung eingesetzte Reagenzien (Bestandteile des Testkist):

- Mikrotiterplatte
Mit polyklonalen Schaf-Anti-Cathepsin K Antikörper beschichtet
- Waschpuffer
20-fach konzentriert
- Assay Puffer
- Standards
(0; 11; 33; 100; 300 pmol/l)
- Kontrolle
(66,2 pmol/l (66,2 +/- 19,8 pmol/l))
- Konjugat
Anti-Cathepsin K-HRP (Meerrettich-Peroxidase)
- Substrat
(Tetramethylbenzidin (TMB Lösung))
- Stopp Lösung

Alle Reagenzien wurden vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Der konzentrierte Waschpuffer wurde 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt. Das Lysophilisat der Standards und Kontrollen musste in jeweils 1 ml Assay-Puffer bei

Material und Methoden

Raumtemperatur für 20 Minuten aufgelöst und mit einem Vortexer gründlich durchmischt werden.

Durchführung:

Nr.	Arbeitsschritt	Menge (µl)	Zeit und Temperatur
1	Standards, Kontrollen und Serumproben in entsprechende Wells pipettieren	50 µl	
2	Hinzufügen des Konjugats, anschließend vorsichtig mischen und abdecken	200 µl	24 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln
3	Waschen mit entsprechendem Waschpuffer	300 µl	5-mal
4	Substratlösung hinzufügen	200 µl	30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln
5	Abstoppen	50µl	
6	Messung bei 450 nm		

Da der Test nicht für das Schaf etabliert ist, erfolgte ein Probelauf auf einer ELISA-Platte von den Proben der Zeitpunkte 3 und 8 Monate. Die Kontrollen und Standards wurden im Doppelansatz bestimmt.

3.6.3.3 Dickkopf-1 (DKK-1)

Für die quantitative Bestimmung von DKK-1 fand sich ebenfalls kein bereits etablierter ELISA für die Messung beim Schaf. Die Bestimmung des DKK-1 wurde in dieser Arbeit ebenfalls anhand eines ELISAs der Firma Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Wien versucht.

Material und Methoden

Testprinzip:

Das Testprinzip beruht auf einem Immunabsorptionsverfahren. Die Mikrotiterplatten sind mit einem Anti-Human-DKK-1 Antikörper beschichtet. Daran bindet sich im Serum vorhandenes DKK-1, welches wiederum von einem weiteren spezifischen Antikörper, der mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase markiert ist, detektiert wird. Die Zugabe der Substratlösung (Tetramethylbenzidin-Lösung) bewirkt eine Konzentrationsänderung des entstandenen Farbstoffs (Enzym-Reaktion). Dieser kann photometrisch bestimmt werden.

Nachfolgend wird die Zusammensetzung der im ELISA eingesetzten Lösungen aufgeführt:

Für die Durchführung eingesetzte Reagenzien (Bestandteile des Testkits):

- Mikrotiterplatte
mit adsorbiertem Anti-human DKK-1-Antikörper
- Waschpuffer
20-fach konzentriert
- Assay Puffer
- Biotinylierter DKK-1 Antikörper
- Standards
(0, 10, 20, 40, 80, 160 pmol/l)
- Kontrolle
27,8 pmol/l (27,8 +/- 8,3 pmol/l)
- Konjugat
Streptavidin-HRP (Meerrettich-Peroxidase)
- Substrat Lösung
Tetramethylbenzidin-(TMB) Lösung)
- Stopp Lösung

Alle Reagenzien und Serumproben wurden vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Der Waschpuffer wurde nach Anleitung 1:20-fach mit destilliertem Wasser verdünnt. Das Lyophilisat der Standards und Kontrollen wurde mit jeweils 200 µl destilliertem Wasser bei Raumtemperatur für 15 Minuten vollständig aufgelöst.

Material und Methoden

Durchführung:

Nr.	Arbeitsschritt	Menge (µl)	Zeit und Temperatur
1	Assay Puffer in alle Wells pipettieren	50 µl	
2	Standards, Kontrollen und Serumproben in entsprechende Wells pipettieren	20 µl	
3	Zugabe von biotinyliertem DKK-1 Antikörper, gut mischen	50 µl	2 Stunden bei Raumtemperatur
4	Waschen mit entsprechendem Waschpuffer	300 µl	5-mal
5	Konjugat hinzufügen	100 µl	1 Stunde bei Raumtemperatur
6	Waschen mit entsprechendem Waschpuffer	300 µl	5-mal
7	Substrat in alle Wells pipettieren	100 µl	30 min im bei Raumtemperatur im Dunkeln
8	Abstoppen	50 µl	
9	Messung bei 450 nm		

Da der Test nicht für die Tierart Schaf etabliert ist, erfolgte ein Probelauf auf einer ELISA-Platte von den Proben der Zeitpunkte 3 und 8 Monate. Die Kontrollen und Standards wurden im Doppelansatz bestimmt.

3.6.4 Marker des Energiestoffwechsels

3.6.4.1 Fructosamine

Die Bestimmung glykierter Proteine (Fructosamine) im Serum erfolgte am Analysegerät ABX Pentra 400. Bei den Reagenzien des ABX Pentra Fructosamin handelte es sich um ein Doppeltestkit.

Dies ist ein kolorimetrischer Test, basierend auf der Fähigkeit der Ketoamine, Nitrotetrazolium-Blau (NBT) in alkalischem Medium zu reduzieren. Die Fructosaminkonzentration ist direkt proportional zur Geschwindigkeit der Formazanbildung. Mittels Photometrie kann bei einer Wellenlänge von 546 nm die Reaktionsgeschwindigkeit gemessen werden.

Fructosamin/Albumin

Hierbei handelt es sich um einen Quotienten. Dieser wird in $\mu\text{mol/l}$ angegeben. Dafür war die zusätzliche Bestimmung des Albumins nötig.

Albumin

Die quantitative Bestimmung des Albumins im Serum zur Berechnung des Fructosamin/Albumin Quotienten erfolgte ebenfalls am ABX Pentra 400 mit den dazugehörigen gebrauchsfertigen Reagenzien (ABX Pentra Albumin CP). Es handelt sich hierbei um eine kolorimetrische Bestimmung mit Bromkresylgrün (BKG). Das Testprinzip beruht auf der selektiven Bindung von Bromkresylgrün an Albumin bei einem pH-Wert von 4,2, was zu einer Blaufärbung führt, die photometrisch gemessen wird.

3.6.4.2 Insulin

Die Bestimmung des Insulins erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen „Ovine Insulin“ ELISA der Firma DRG Instruments GmbH, Marburg.

Testprinzip:

Die quantitative Bestimmung erfolgt hier über einen *Solid Phase Two-Site Enzyme Immunoassay*. Es handelt sich hierbei um einen direkten Sandwich-ELISA. Die Mikrotiterplatten sind mit monoklonalen Maus-Anti-Insulin Antikörpern beschichtet. Die im Serum vorhandenen Insulinmoleküle werden gebunden und mittels eines zweiten mit Peroxidase markierten Anti-Insulin Antikörpers detektiert. Die übrigen freien Moleküle werden durch den Waschvorgang abgewaschen. Nach Hinzufügen des Enzymkonjugats (3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin) und anschließendem Abstoppen kann die optische Dichte der entstandenen Farbreaktion photometrisch ermittelt werden.

Material und Methoden

Nachfolgend wird die Zusammensetzung der im ELISA eingesetzten Lösungen aufgeführt:

Für die Durchführung eingesetzte Reagenzien (Bestandteile des Testkits):

- Mikrotiterplatte
Mit monoklonalen Maus-Anti-Insulin Antikörpern
- Standards
Schaf Insulin (0; 0,5; 0,15; 0,5; 1,5; 3,0 µg/l)
- Kontrollen
(Diabetes Antigen Kontrolle Maus, DRG Instruments GmbH, Marburg, Deutschland;
nicht im Test erhältlich)
Niedrige Kontrolle: 0,356 µg/L (0,196 - 0,516 µg/l)
Hohe Kontrolle: 4,08 µg/L (3,10 - 5,06 µg/l)
- Enzymkonjugat
Monoklonaler Maus Anti-Insulin Antikörper mit Peroxidase
- Enzymkonjugat-Puffer
- Waschpuffer
21-fach konzentriert
- Substratlösung
Tetramethylbenzidin-(TMB) Lösung
- Stopp-Lösung
0,5 M H₂SO₄

Alle Reagenzien und Serumproben wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht. Der Waschpuffer musste zur Erstellung einer einfachen Konzentration 1:20 mit im Testkit enthaltenen redestilliertem Wasser verdünnt werden. Das Enzymkonjugat wurde im Verhältnis 1:10 mit Enzymkonjugat-Puffer versetzt und anschließend vorsichtig durchmischt.

Durchführung:

Nr.	Arbeitsschritt	Menge (µl)	Zeit und Temperatur
1	Standards, Kontrollen und Serumproben in entsprechende Wells pipettieren	25 µl	

Material und Methoden

2	Beschichtung der Wells mit Enzymkonjugat, anschließend auf horizontalen Schüttler inkubieren	100 µl	2 Stunden bei Raumtemperatur
3	Waschen mit entsprechendem Waschpuffer	700 µl	6-mal
4	Beschichtung der Wells mit Substratlösung	200 µl	15 min bei Raumtemperatur
5	Abstoppen	50 µl	
6	Messung bei 450 nm		

Die 31 Schafproben wurden auf zwei ELISA-Platten gemessen. Es erfolgte ein Doppelansatz der Standards und Kontrollen. Die Werte wurden von µg/l in µU/ml umgerechnet.

Umrechnungsformel: $\mu\text{g/l} / 0,0417 = \mu\text{U/ml}$

3.6.4.3 Unveresterte Fettsäuren (NEFA)

Als weiterer Parameter des Energiestoffwechsels wurden die unveresterten Fettsäuren mit dem ABX Pentra 400 bestimmt. Die benötigten Reagenzien stammen von der Firma Labor+Technik, Eberhard Lehmann GmbH, Berlin.

Die Messung erfolgt über eine enzymatische Endzeitpunktbestimmung. Das Testprinzip beruht auf der Acylierung von Coenzym A (CoA) bei gleichzeitiger Anwesenheit von unveresterten Fettsäuren durch eine Acyl-CoA-Synthetase. Die anschließende Oxidation des acylierten Coenzym A durch die Acyl-CoA-Oxidase führt zur Freisetzung von H₂O₂. Unter der katalytischen Wirkung der Peroxidase (POD) reagiert das H₂O₂ mit der Trinder-Substanz im Reagenz zu einem farbigen Endprodukt. Die Farbintensität ist bei 546 nm direkt proportional zur Konzentration der freien Fettsäuren in der Probe.

3.6.5 Wachstumshormone

3.6.5.1 Insulin-like growth factor (IGF-1, IGFBP-blockiert)

Das IGF-1 (IGFBP-blockiert) im Serum wurde mittels eines humanen ELISAs der Firma mediagnost® Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH, Reutlingen bestimmt. Laut Herstellerangaben kann das ELISA-Kit aufgrund guter Kreuzreaktion der Antikörper mit IGF-1 auch für das Schaf verwendet werden.

Testprinzip:

Im ersten Schritt des IGF-1 ELISA (IGFBP-blockiert) muss das IGF-1 von den Insulin-like growth factor Bindungsproteinen (IGFBPs) dissoziieren. Dazu müssen die Proben mit einem sauren Puffer verdünnt werden. Die verdünnten Proben werden dann in die Vertiefungen (Wells) pipettiert und der pH-Wert dabei neutralisiert. Das nun nach Neutralisation im hohen Überschuss vorhandene IGF-2 besetzt die IGF-Bindungsstellen der Bindungsproteine. Dies erlaubt die Messung des nun freien IGF-1. Wegen der extrem niedrigen Kreuzreaktivität des IGF-1-Antikörpers mit IGF-2 stört der hohe Überschuss an IGF-2 die Interaktion mit IGF-1 nicht. Im weiteren Verlauf wird die enzymatische Reaktion unter Verwendung eines Streptavidin-Peroxidase Konjugates nachgewiesen. Die am Ende entstehende Farbreaktion kann photometrisch bestimmt werden.

Nachfolgend wird die Zusammensetzung der im ELISA eingesetzten Lösungen aufgeführt:

Für die Durchführung eingesetzte Reagenzien (Bestandteile des Testkits):

- Mikrotiterplatte
Mit humanem IGF-1 Antikörper beschichtet
- Standards A-E
Enthalten rekombinantes humanes IGF-1 (2; 5; 15; 30; 50 ng/ml)
- Kontrollen
Niedrige Kontrolle: 98 ng/ml (79 - 118 ng/ml)
Hohe Kontrolle: 389 ng/ml (311 - 466 ng/ml)
- Probenpuffer
- Antikörperkonjugat
Enthält biotinylierten Anti-human IGF- Antikörper

Material und Methoden

- Enzymkonjugat
Enthält POD (Meerrettich-Peroxidase)-markiertes Streptavidin
- Waschpuffer
20-fach konzentriert
- Substrat
Meerrettich-Peroxidase- (POD)-Substrat, stabilisiertes H₂O₂-Tetramethylbenzidin
- Stopplösung
0,2 M Schwefelsäure

Alle verwendeten Reagenzien und Proben wurden vorher auf Raumtemperatur gebracht. Der Waschpuffer wurde vor Gebrauch 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt. Für die Rekonstitution der Standards und Kontrollen mussten jeweils 500 µl gebrauchsfertiger Probenpuffer hinzu pipettiert werden. Anschließend wurden alle Reagenzien mit dem Vortexer durchmischt.

Durchführung:

Nr.	Arbeitsschritt	Menge (µl)	Zeit und Temperatur
1	Antikörperkonjugat in alle Wells pipettieren	80 µl	
2	Standards, Kontrollen und Seren in die entsprechenden Wells überführen, Inkubation auf horizontalem Schüttler	20 µl	1 Stunde bei Raumtemperatur
3	Waschen mit entsprechenden Waschpuffer	300 µl	5-mal
4	Enzymkonjugat in alle Wells pipettieren, Inkubation auf horizontalen Schüttler	100 µl	30 min bei Raumtemperatur
5	Waschen mit entsprechendem Waschpuffer	300 µl	5-mal
6	Substratlösung hinzu pipettieren	100 µl	15min bei Raumtemperatur im Dunkeln
7	Abstoppen	100 µl	

Material und Methoden

8	Ablezen bei 450 nm		
---	--------------------	--	--

Die Proben wurden auf zwei ELISA-Platten gemessen. Es erfolgte ein Doppelansatz der Standards und Kontrollen.

3.7 Präzisionsmessungen

Um die Messgenauigkeit in Serie aller Parameter zu beurteilen, wurden 8-10 Mehrfachbestimmungen unterschiedlicher Konzentrationen (niedrig, hoch) durchgeführt. Der Mittelwert dieser Messungen wurde bestimmt und die Standardabweichung sowie der Variationskoeffizient berechnet. Die jeweilige Zahl der Wiederholungsmessungen ist für die einzelnen Parameter im Anhang aufgeführt.

3.8 Referenzbereiche

Die Berechnung der orientierenden Referenzbereiche erfolgte mithilfe des Reference Value Advisor V 2.1 Programm (GEFFRÉ et al. 2011).

Als Referenzgruppe galten die 31 Schafe zum Zeitpunkt 0. Die Werte wurden mithilfe des Anderson-Darling Tests auf Normalverteilung getestet. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$. Waren die Werte signifikant, so galten die Daten als nicht-normalverteilt. Bei nicht-normalverteilten Daten wurde eine Box-Cox Transformation durchgeführt. Handelte es sich hierbei um symmetrische Daten (Test auf Symmetrie $p > 0,05$), wurde die Robuste Methode verwendet.

In Fällen, in denen nach Anderson-Darling Test die Daten normalverteilt waren, aber der von dem Programm ebenfalls dargestellte QQ-Plot eher eine nicht-Normalverteilung anzeigte, wurden die durch Box-Cox Transformation ermittelten Referenzwerte verwendet.

Bei Daten, die zwar nach Anderson-Darling Test nicht normalverteilt waren, jedoch keine Berechnung durch das Programm möglich war (im Falle der Fructosaminmessung), wurden zur Orientierung die mittels Robuster Methode aus untransformierten Werten berechneten Ergebnisse gewählt.

3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Datenauswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm Graph Pad Prism (Graph Pad Software Version 5, San Diego, USA).

Alle Parameter wurden mit einem 2-faktoriellen ANOVA Test auf folgende Einflüsse untersucht: „Gruppe“, „Zeit“ und „Wechselwirkung“. Der Faktor „Gruppe“ beschreibt dabei den globalen Unterschied zwischen den Gruppen zu einem Zeitpunkt. Der Faktor „Zeit“ gibt die Änderungen im zeitlichen Verlauf an. Der Faktor Wechselwirkung beschreibt dabei das Verhältnis der Gruppen zueinander im zeitlichen Verlauf der verschiedenen Zeitpunkte, d.h. das unterschiedliche Verhalten der Werte der Gruppen im zeitlichen Verlauf.

Bei Signifikanzen wurde der Sidak's multiple Comparison Test als Post-Test angewendet. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

4 ERGEBNISSE

4.1 Schafe

In die Studie gingen 31 klinisch gesunde, weibliche Schafe der Rasse Merinoschaf ein. Der Untersuchungszeitraum lag zwischen Ende Oktober 2012 bis Anfang Juli 2013 (8 Monate). Es gab 3 Probenentnahmezeitpunkte (Versuchsbeginn 0 Monate, 3 Monate, Endzeitpunkt 8 Monate).

Zu den Probenentnahmezeitpunkten 0 und 3 Monaten wiesen die Tiere in den Gruppen: Kontrolle, OVX und OVXD keine klinischen Auffälligkeiten auf. In der Gruppe OVXDC musste ein Schaf (ODS7/ 46) aufgrund einer Hautverletzung zum Zeitpunkt 3 Monate genäht werden. Bei allen Schafen dieser Gruppen fielen bereits zu Zeitpunkt 3 Monate eine dünne Haut sowie ein teilweise cushingoides Erscheinungsbild (Muskelschwund, Stammfettsucht) auf.

Gegen Ende des Versuchs zu Zeitpunkt 8 Monate verstarb ein Schaf (ODS 6/ 6) in der OVXDC-Gruppe über Nacht und konnte somit nicht in die Analyse eingeschlossen werden. Es wurde keine pathologische Untersuchung eingeleitet. Des Weiteren musste aufgrund ethischer Gründe die Probenentnahme eines Glukokortikoid-behandelten Schafs (ODS 8/ 83195) mit anschließender Euthanasie 2 Wochen vor eigentlichem Versuchsende vorgezogen werden. Das Schaf war zu diesem Zeitpunkt anämisch mit deutlicher Tachypnoe. Es war weder geh- noch stehfähig, da es eine Trümmerfraktur des rechten Femurs sowie einen Abriss des *Trochanter majus* aufwies. Alle übrigen Schafe der OVXDC-Gruppe waren zum letzten Zeitpunkt von mittelgradig gestörtem Allgemeinbefinden, deutlich matt, und zeigten neben Wollverlusten ein cushingoides Erscheinungsbild.

4.1.1 Körpergewicht

Zu Versuchsbeginn wiesen die Schafe in den genannten Gruppen folgende mediane Körpergewichte auf: Kontrolle: 59,5 kg (Range: 52 - 81kg); OVX: 58 kg (Range: 53 - 81 kg); OVXD: 57,5 kg (Range: 47 - 86kg); OVXDC: 60,5 kg (41 - 67 kg). Die statistische Auswertung des Körpergewichts in kg ergab keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich. Auch im zeitlichen Verlauf über 8 Monate stellten

Ergebnisse

sich keine statistisch signifikanten Veränderungen, sowohl innerhalb der Gruppe als auch zwischen den Gruppen dar (Abb. 7 A).

4.2 Knochendichtebestimmung (DXA)

Nachfolgend sind die Referenzwerte und die Ergebnisse der verschiedenen Gruppen zu den 3 Zeitpunkten für die Parameter der DXA-Messung für das ROI „*abdominal width*“ dargestellt.

Parameter (Einheit)	Referenzbereich		90% Konfidenzintervall		Datenverteilung / Methode
	Unterer Wert:		Unterer Wert:		
BMD (g/cm ²)	Unterer Wert:	0,84	Unterer Wert:	0,81 0,87	Normalverteilt (p = 0,24)
	Oberer Wert:	1,11	Oberer Wert:	1,07 1,14	Standard
BMC (g)	Unterer Wert:	52,10	Unterer Wert:	41,47 61,95	Normalverteilt (p = 0,94)
	Oberer Wert:	128,22	Oberer Wert:	119,23 138,34	Standard
Körperfett (%) (abdominal)	Unterer Wert:	3,77	Unterer Wert:	3,43 4,41	Nicht-normalverteilt (p < 0,05)
	Oberer Wert:	47,38	Oberer Wert:	32,30 76,13	Box-Cox Transformation Robust
Körperfett (g) (abdominal)	Unterer Wert:	586,8	Unterer Wert:	566,1 640,8	Nicht-normalverteilt (p < 0,05)
	Oberer Wert:	9042,4	Oberer Wert:	5270,6 15608,6	Box-Cox Transformation Robust

Tabelle 8: Orientierende Referenzwerte für die Parameter der DXA-Messung für das ROI „*abdominal width*“ fürs Schaf. Abkürzungen: BMD: bone mineral density (%); BMC: bone mineral content (g), ROI: Region of Interest. Die p-Werte beziehen sich auf das Ergebnis des Anderson-Darling Tests.

Ergebnisse

Körpergewicht und DXA-Messung

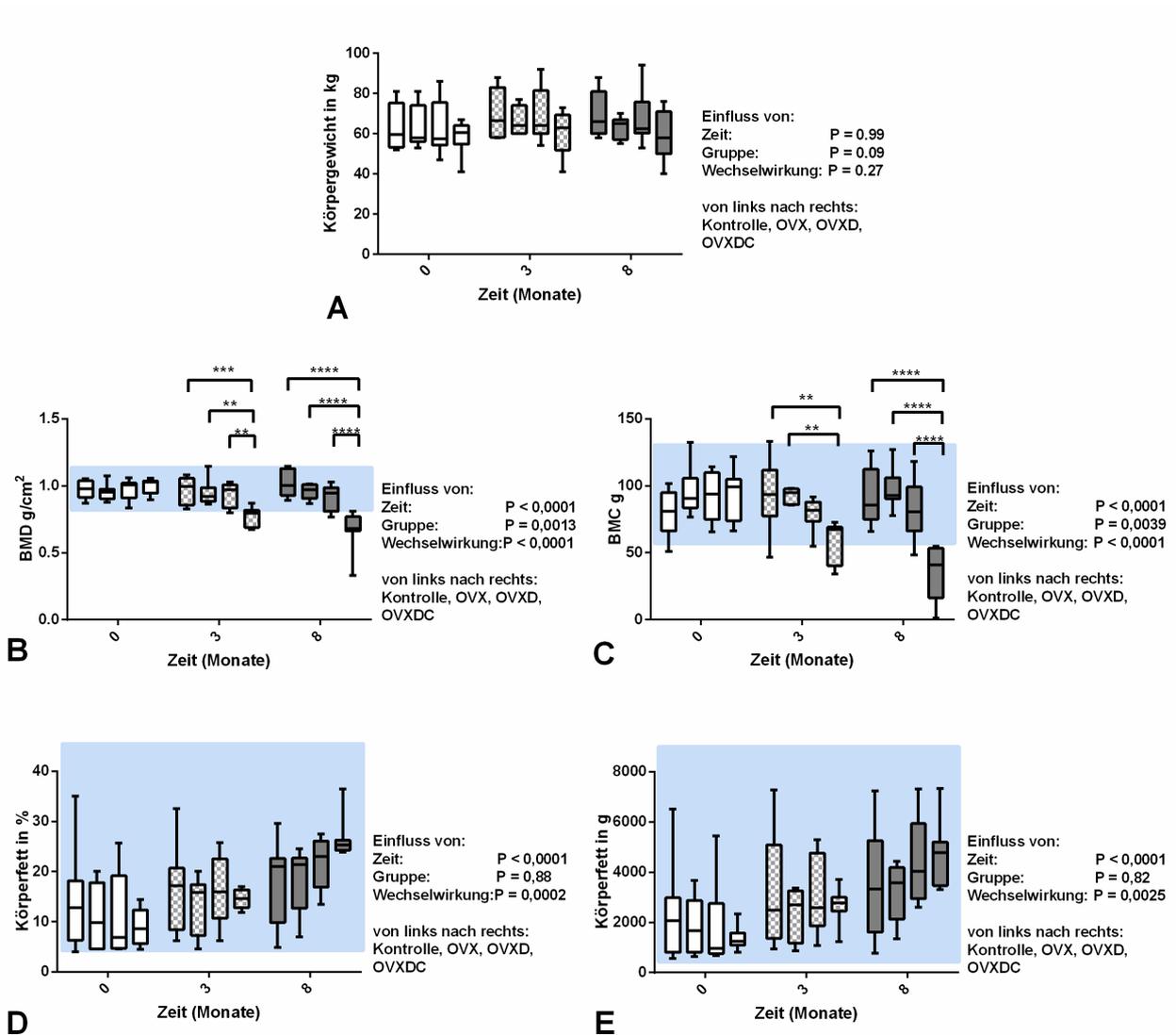


Abbildung 8: Körpergewicht und DXA-Daten (Region of Interest: „abdominal width“) zur Darstellung der Knochendichte der Wirbelkörper sowie des abdominalen Fettgehalts. Die graphische Darstellung erfolgt mit einem Box-Whisker Diagramm. Der Box-Plot entspricht dabei dem Bereich, in dem 50% der Daten liegen. Die durchgehende Linie stellt den Median der Daten dar. Die Whiskers (Antennen) zeigen den gesamten Bereich der Daten mit Minimum und Maximum an. Der hellblaue Balken zeigt die orientierenden Referenzbereiche. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$)
 Abkürzungen: OVX = Ovariectomie Gruppe, OVXD = Ovariectomie + Diät-Gruppe, OVXDC = Ovariectomie + Diät + Glukortikoidgabe, BMD: bone mineral density, BMC: bone mineral content

Ergebnisse

Die Knochendichte (BMD) (Abb. 7 B) der Wirbelkörper war zu Versuchsbeginn in allen Versuchsgruppen sowie der Kontrollgruppe vergleichbar und reichte von einem Median von 0,95 g/cm² (OVX) zu 1,02 g/cm² (OVXDC). Zu den Zeitpunkten 3 und 8 Monate stellten sich innerhalb der Gruppen zu einem Zeitpunkt, aber auch im zeitlichen Gruppenvergleich statistisch signifikante Veränderungen ein. So wies die OVXDC-Gruppe zum Probenzeitpunkt 3 Monate im Vergleich zu den anderen 3 Gruppen eine signifikant niedrigere Knochendichte auf, die bei 7/8 Schafen den unteren Referenzbereich von 0,84 g/cm² unterschritt. Die mediane Knochendichte der Glukokortikoid-behandelten Gruppe lag hier bei 0,79 g/cm² im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 1,00 g/cm² und war somit um ca. 20% niedriger. Dasselbe ließ sich auch zu Zeitpunkt 8 Monate nachvollziehen. Hier waren noch deutlichere Verluste der Knochendichte in der Gruppe OVXDC gegenüber den anderen Gruppen nachweisbar. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer medianen Knochendichte von 1,00 g/cm², zeigte die OVXDC-Gruppe mit einem medianen Wert von 0,69 g/cm² einen deutlich niedrigeren BMD und somit einen ca. 30%igen Verlust an Knochendichte gegenüber der Kontrollgruppe. In der OVXDC-Gruppe unterschritten die BMD-Werte zum Zeitpunkt 8 Monate bei allen Schafen den Referenzbereich.

Der sehr niedrige Wert zu Zeitpunkt 8 Monate stammte von dem aus tierschutzrechtlichen Aspekten frühzeitig euthanasierten Schaf (ODS8/ 83195) mit der Trümmerfraktur des Femurs. Der BMD lag hier bei 0,33 g/cm² und somit deutlich unter dem Gruppenmedian zum Endzeitpunkt von 0,69 g/cm². Somit zeigte sich bei diesem Schaf sogar im Vergleich zu der Kontrollgruppe ein Knochendichteverlust von ca. 70%.

Dieselben Veränderungen waren auch in Bezug auf den *bone mineral content* (BMC) nachvollziehbar (Abb. 7C). Auch hier wiesen die Gruppen zum Zeitpunkt 0 Monate keine signifikanten Unterschiede zueinander auf. Im zeitlichen Verlauf veränderten diese sich jedoch wieder signifikant. So wies die OVXDC-Gruppe zum Zeitpunkt 3 Monate niedrigere BMC-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe und OVX-Gruppe auf und lag bei 4/8 Schafen unterhalb des unteren Referenzbereiches von 52,2 g. Noch deutlicher wurden die Werte zum Zeitpunkt 8 Monate. Hier zeigten die Glukokortikoid-behandelten Schafe einen hochgradigen Verlust an BMC im Vergleich zur Kontroll- sowie OVX- und OVXD-Gruppe. Der mediane BMC lag zu diesem Zeitpunkt in der

Ergebnisse

OVXDC-Gruppe bei 42,9 g und betrug somit ca. die Hälfte des medianen BMCs der Kontrollgruppe. Bei 6/8 Schafen der OVXD-Gruppe unterschritt der BMC den unteren Referenzbereich. Vergleicht man das Körperfett in % (hier abdominales Körperfett), so ließen sich zu den jeweiligen Zeitpunkten keine statistisch signifikanten Veränderungen zwischen den Gruppen darstellen (Abb. 7D). Jedoch fanden sich signifikante Veränderungen im zeitlichen Verlauf aller Gruppen. So ist in der Graphik bereits ersichtlich, dass das Körperfett über die Zeit in allen Gruppen über die Monate zunahm. So wiesen die Kontrollgruppe und OVX-Gruppe zum Zeitpunkt 0 bis zum Zeitpunkt 8 Monate einen ca. doppelten Anstieg des Körperfetts in % über die Zeit auf. Ein ca. dreifacher Anstieg des Körperfetts über den gesamten Versuchszeitraum konnte dagegen in den Gruppen OVXD und OVXDC beobachtet werden. Den maximalen Körperfettanteil zeigten die Schafe in der OVXDC-Gruppe zum Zeitpunkt 8 Monate mit einem Median von ca. 26% an abdominalem Körperfett.

Auch die Körperfettanteile in g (Abb. 7E) stiegen in allen Gruppen im zeitlichen Verlauf von Zeitpunkt 0 Monate bis Zeitpunkt 8 Monate signifikant an. Besonders ausgeprägt war die Fettzunahme wie zuvor auch in den Gruppen OVXD und OVXDC mit zum Zeitpunkt 8 dreifach bis sogar vierfach erhöhten Fettgehalten in g im Vergleich zu Zeitpunkt 0.

Ergebnisse

Z-Score

Die Errechnung des Z-Scores ergab folgende Ergebnisse:

Gruppe	Zeitpunkt 3 Monate	Zeitpunkt 8 Monate
OVX	- 0,39	- 0,29
OVXD	- 0,56	- 0,96
OVXDC	- 3,29	- 4,86

Tabelle 9: Z-Score in Standardabweichungen in den verschiedenen „Osteoporose“-Gruppen zu den Zeitpunkten 3 und 8 Monaten. Mit Fettdruck markierte Werte liegen unter dem als altersphysiologisch anzusehenden Z-Score von > -1 .

Es zeigten sich deutliche Veränderungen des Z-Score der verschiedenen Gruppen zu den Zeitpunkten 3 und 8 Monate. Vergleicht man die Werte mit den Angaben der Humanmedizin (wo ein Z-Score > -1 als altersphysiologisch angesehen wird) lässt sich erkennen, dass die OVXDC-Gruppe zu den Zeitpunkten 3 und 8 Monate bereits einen hochgradigen Knochendichteverlust aufwies. Aber auch zwischen den Gruppen war zu dem jeweiligen Zeitpunkt eine Tendenz sichtbar: So zeigte die Kombination aus Diät und OVX (OVXD) deutlichere Veränderungen als eine alleinige Ovariectomie (OVX), auch wenn beide Gruppen insgesamt noch einen altersphysiologischen Z-Score aufwiesen.

4.3 Laboruntersuchungen 0, 3 und 8 Monate

Nachfolgend sind die Ergebnisse der klinisch chemischen Analysen sowie der EIAs/ELISAs dargestellt.

4.3.1 Präzisionsmessungen

Die ausführlichen Ergebnisse der Präzisionsmessung aller Parameter sind im Anhang aufgeführt. Die Analysen der biochemischen Parameter Calcium, Magnesium (ionisiert) und Phosphat sowie die Messungen von Fructosaminen und Albumin ergaben gute Wiederholbarkeiten mit niedrigen Variationskoeffizienten ($< 3\%$). Einzige

Ergebnisse

Ausnahmen waren die Messungen im niedrigen Konzentrationsbereich der Urin-Phosphat- und Urin-Kreatininkonzentration sowie der FEP mit Variationskoeffizienten von 5,4% - 12,6%. Dagegen zeigten die ELISAs insbesondere in den niedrigen Messbereichen deutliche Schwankungen mit Variationskoeffizienten zwischen 3% - 10%, selten bis zu 35% (NTX-1).

Die verwendeten Enzym-Immunoassays für die Bestimmung von Parathormon (PTH), Cathepsin K und DKK-1 mussten aufgrund der ausgeprägten Streuung der Messergebnisse (Cathepsin K) inklusive Wiederholbarkeitsmessungen oder niedrigen bis nicht validen Messergebnissen (Ergebnisse der gemessenen Schafproben entsprachen den Leerwerten trotz valider Ergebnisse für die -humanen-Standardkurven und Kontrollen) (DKK-1, PTH) aus der weiteren Beurteilung rausgenommen werden. Die ELISAs waren in diesem Fall nicht fürs Schaf geeignet.

4.3.2 Referenzbereiche

Bei den vorliegenden Daten handelt es sich um orientierende Referenzbereiche. Diese werden folgend tabellarisch angezeigt.

Ergebnisse

Parameter (Einheit)	Referenzbereich		90% Konfidenzintervall		Datenverteilung/ Methode
	Unterer Wert:		Unterer Wert:		
Calcium (mmol/l)	Unterer Wert:	0,78	Unterer Wert:	0,70 0,85	Normalverteilt ($p = 0,94$) Standard
	Oberer Wert:	1,32	Oberer Wert:	1,25 1,39	
Phosphat (mmol/l)	Unterer Wert:	0,97	Unterer Wert:	0,80 1,20	Nach QQ-Plot nicht normalverteilt ($p = 0,45$) Box-Cox Transformation Robust
	Oberer Wert:	3,29	Oberer Wert:	2,89 3,67	
Magnesium (mmol/l)	Unterer Wert:	0,34	Unterer Wert:	0,29 0,39	Normalverteilt ($p = 0,76$) Standard
	Oberer Wert:	0,71	Oberer Wert:	0,66 0,76	
UFEP (%)	Unterer Wert:	0,06	Unterer Wert:	0,05 0,08	Nicht- Normalverteilt ($p < 0,05$) Box-Cox Transformation Robust
	Oberer Wert:	4,50	Oberer Wert:	1,11 103,67	
25-OH- Vitamin D (ng/ml)	Unterer Wert:	8,14	Unterer Wert:	2,45 15,12	Normalverteilt ($p = 0,39$) Standard
	Oberer Wert:	55,71	Oberer Wert:	49,24 61,90	
BAP (U/l)	Unter Wert:	10,46	Unterer Wert:	9,07 12,51	Nicht- Normalverteilt ($p < 0,05$) Box-Cox Transformation Robust
	Oberer Wert	67,88	Oberer Wert:	51,95 84,62	
Osteocalcin (ng/ml)	Unterer Wert:	4,21	Unterer Wert:	1,17 7,22	Normalverteilt ($p = 0,31$) Standard
	Oberer Wert:	26,75	Oberer Wert:	23,86 29,63	
NTX (nM BCE)	Unterer Wert:	14,58	Unterer Wert:	11,83 17,63	Normalverteilt ($p = 0,69$) Standard
	Oberer Wert:	38,13	Oberer Wert:	35,09 41,12	

Ergebnisse

Fructosamin ($\mu\text{mol/l}$)	Unterer Wert: Oberer Wert:	159,2 239,5	Unterer Wert: Oberer Wert:	145,3 166,9 225,8 250,1	Nicht- Normalverteilt ($P < 0,05$) Allerdings ND Daher orientierend: Normalverteilt, Robust
Fructosamin/ Albumin- Quotient $\mu\text{mol/g}$	Unterer Wert: Oberer Wert:	5,98 8,70	Unterer Wert: Oberer Wert:	5,63 6,37 8,35 9,08	Normalverteilt ($p=0,45$) Standard
Albumin (g/l)	Unterer Wert: Oberer Wert:	23,20 31,73	Unterer Wert: Oberer Wert:	22,06 24,42 30,59 32,82	Normalverteilt ($p = 0,13$) Standard
Insulin ($\mu\text{U/ml}$)	Unterer Wert: Oberer Wert:	1,96 9,82	Unterer Wert: Oberer Wert:	ND 2,07 7,64 12,14	Nicht- Normalverteilt ($p < 0,05$) Standard
NEFA ($\mu\text{mol/l}$)	Unterer Wert: Oberer Wert:	46,04 1613,00	Unterer Wert: Oberer Wert:	6,58 138,00 1311,86 1910,72	Nach QQ-Plot nicht normalverteilt ($p = 0,45$) Box-Cox Transformation Robust
IGF-1 (ng/ml)	Unterer Wert: Oberer Wert:	11,58 301,74	Unterer Wert: Oberer Wert:	3,39 26,73 225,45 381,07	Nicht- Normalverteilt ($p < 0,05$) Box-Cox Transformation Robust

Table 10: Orientierende Referenzbereiche: Elektrolyte, Hormone und Marker des Knochen- und Energiestoffwechsels. Die Angabe erfolgt mit oberem und unterem Wert des jeweiligen Referenzbereichs sowie des 90% Konfidenzintervall. Die letzte Spalte gibt die Methodik, die zur Berechnung verwendet wurde, an. Abkürzungen: BAP: knochenspezifische alkalische Phosphatase; UFEP = Urin-fraktionierte Ausscheidung Phosphat, NTX = Amino-terminales Telopeptid des Typ I Kollagen, NEFA = Unveresterte Fettsäuren, IGF-1 = Insulin-like growth factor-1; ND = not determined

Ergebnisse

(vom Programm nicht berechenbar). Die angegebenen p-Werte sind das Ergebnis des Anderson-Darling Tests zur Überprüfung der Normalverteilung.

4.3.3 Elektrolyte und fraktionierte Urinausscheidung Phosphat

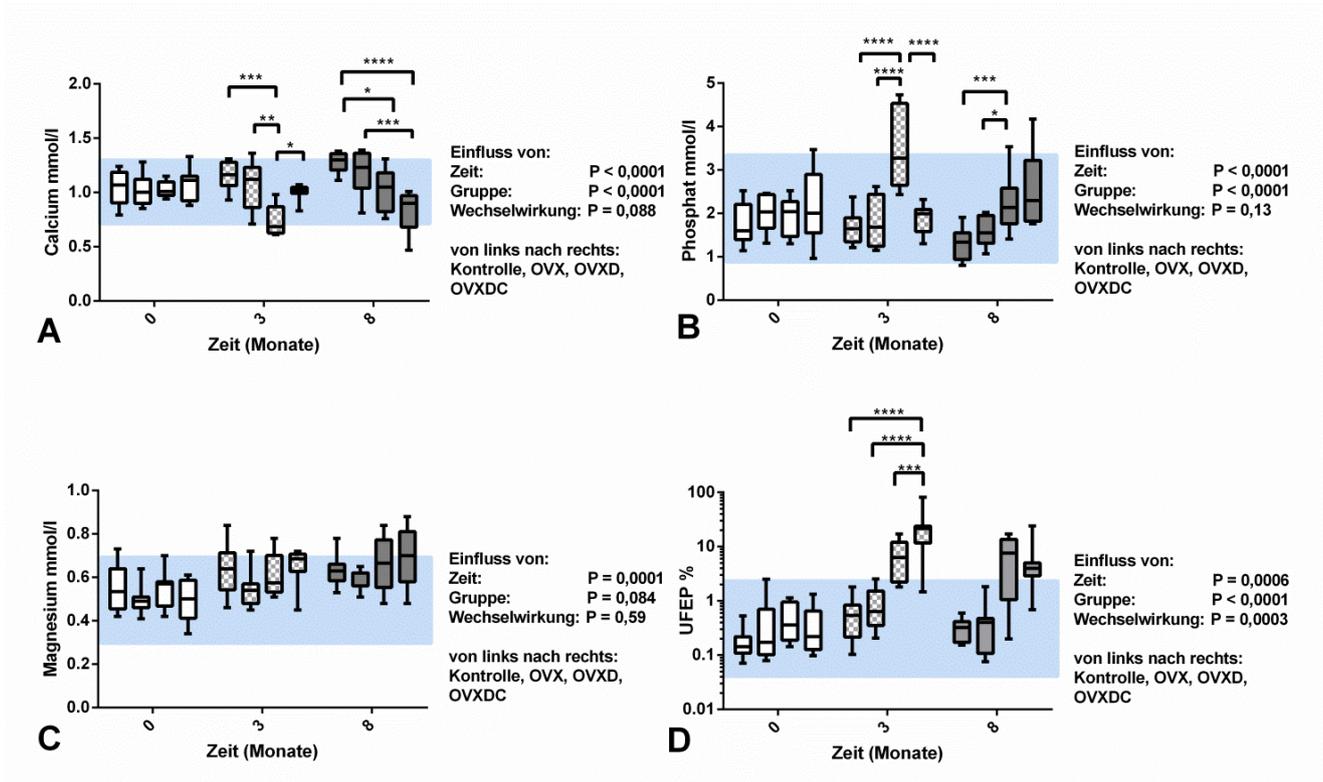


Abbildung 9: Elektrolyte und fraktionierte Urinausscheidung Phosphat im Gruppenvergleich zu den Zeitpunkten 0, 3 und 8 Monate. Die graphische Darstellung erfolgt mit einem Box-Whisker Diagramm. Der Box-Plot entspricht dabei dem Bereich, in dem 50% der Daten liegen. Die durchgehende Linie stellt den Median der Daten dar. Die Whiskers (Antennen) zeigen den gesamten Bereich der Daten mit minimalem und maximalem Wert an. Der hellblaue Balken stellt die orientierenden Referenzbereiche dar. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$) Abkürzungen: OVX = Ovariectomie Gruppe, OVXD = Ovariectomie + Diät-Gruppe, OVXDC = Ovariectomie + Diät + Glukortikoidgabe, UFEP = Urin-fraktionierte Ausscheidung Phosphat

Ergebnisse

Zu Versuchsbeginn fanden sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Serum-Calciumkonzentration (Abb. 8A). Erst im zeitlichen Verlauf waren zum Zeitpunkt 3 Monate signifikante Veränderungen nachweisbar. Hier wies die OVXD-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen, eine deutliche Hypocalcämie auf. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Serum-Calciumkonzentration 2-fach erniedrigt. Die mediane Serum-Calciumkonzentration der OVXDC-Gruppe erschien im Vergleich zu den Gruppen Kontrolle und OVX ebenfalls vermindert, allerdings war dies statistisch nicht signifikant. Erst zum Zeitpunkt 8 Monate zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigte Calciumkonzentrationen in den Gruppen OVXD und OVXDC, auch wenn die medianen Calciumkonzentrationen noch im orientierenden Referenzbereich lagen. Bei 3/7 Schafen in der OVXDC-Gruppe war zu diesem Zeitpunkt jedoch eine Hypocalcämie nachweisbar. Interessanterweise war in der OVXD-Gruppe insbesondere zum Zeitpunkt 3 Monate, aber in geringerem Grad auch zum Zeitpunkt 8 Monate, eine im Vergleich zu den anderen Gruppen deutlich erhöhte Serum-Phosphatkonzentration nachweisbar (Abb. 8B). Zum Zeitpunkt 3 Monate lag eine ca. 3-fach höhere Serum-Phosphatkonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe vor. Dabei zeigten 3/8 Schafe der OVXD-Gruppe eine deutliche Hyperphosphatämie. Am Versuchsende war in dieser Gruppe eine 2-fach höhere Serum-Phosphatkonzentration gegenüber der Kontrollgruppe nachweisbar, jedoch lagen die Werte aller Schafe im Referenzbereich. Aufgrund der breiten Streuung der Daten in der OVXDC-Gruppe zum Zeitpunkt 8 Monate, fanden sich trotz graphisch erhöhten Phosphatwerten keine Signifikanzen in Bezug auf die Kontrollgruppe. Bei 1/8 Schafen dieser Gruppe lag eine Hyperphosphatämie vor.

Insgesamt unterschied sich die Serum-Magnesiumkonzentration zwischen den Gruppen nicht signifikant (Abb. 8C). Nur im zeitlichen Verlauf des Versuches war in allen Gruppen ein geringgradiger Anstieg des ionisierten Magnesiums im Serum zu erkennen. Zu den Zeitpunkten 3 und 8 Monate zeigten jeweils 2/8 bzw. 3/8 Schafe der OVXD-Gruppe und 1/8 bzw. 2/7 Schafe der OVXDC-Gruppe eine geringgradige Hypermagnesiämie.

Die fraktionierte Ausscheidung von Phosphat im Urin (FEP) veränderte sich signifikant im zeitlichen Verlauf (Abb. 8D). Im Gruppenvergleich war die FEP zum Zeitpunkt 3

Ergebnisse

Monate in der Gruppe OVXDC hochsignifikant gegenüber der Kontrollgruppe und OVX-Gruppe gesteigert. Die Glukokortikoid-behandelten Schafe zeigten hier eine im Vergleich zu der Kontrollgruppe ca. 42-fach erhöhte Phosphatausscheidung. Im Vergleich zur OVXD-Gruppe lag eine 3,5-fach erhöhte FEP vor. Bei insgesamt 7/8 Schafen der OVXDC-Gruppe und 5/8 Schafen der OVXD-Gruppe überschritt die FEP deutlich den Referenzbereich. Zum Zeitpunkt 8 Monate zeigten 3/7 Schafe der OVXDC-Gruppe und 5/8 Schafe der OVXD-Gruppe eine FEP oberhalb des Referenzbereiches, jedoch war diese Veränderung nicht signifikant.

4.3.4 Marker des Knochenstoffwechsels

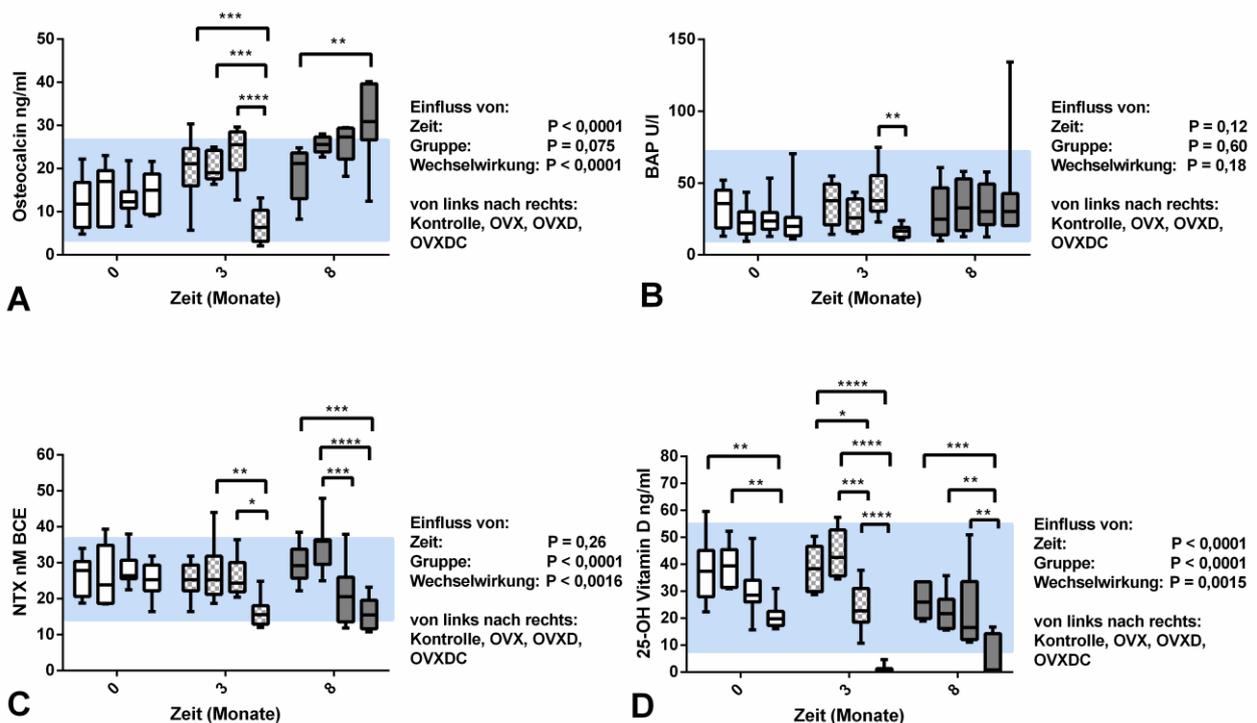


Abbildung 10: Knochenformationsmarker (Osteocalcin, BAP) und Knochenresorptionsmarker (NTX) sowie 25-OH-Vitamin D im Gruppenvergleich zu den Zeitpunkten 0, 3 und 8 Monate. Die graphische Darstellung erfolgt als Box-Whisker Diagramm. Der Box-Plot entspricht dabei dem Bereich, in dem 50% der Daten liegen.

Ergebnisse

Die durchgehende Linie stellt den Median der Daten dar. Die Whiskers (Antennen) zeigen den gesamten Bereich der Datenverteilung mit Minimum und Maximum an. Der hellblaue Balken im Hintergrund spiegelt die orientierenden Referenzbereiche wieder. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$) Abkürzungen: OVX = Ovariectomie Gruppe; OVXD = Ovariectomie + Diät-Gruppe, OVXDC = Ovariectomie + Diät + Glukortikoidgabe; BAP = bone specific phosphatase, knochenspezifische alkalische Phosphatase; NTX = Amino (N)- terminales Telopeptid des Typ I Kollagen

Die Ergebnisse der Osteocalcinkonzentration (Abb. 9A) zeigten im zeitlichen Verlauf über die 8 Monate signifikante Veränderungen. So wiesen alle Gruppen mit Ausnahme der OVXDC-Gruppe zum Zeitpunkt 3 Monate höhere Osteocalcinwerte als zu Versuchsbeginn auf. In der OVXD-Gruppe überschritt das Osteocalcin dabei bei 4/8 Schafen den Referenzbereich. Im Gegensatz dazu fanden sich zum Zeitpunkt 3 Monate in der OVXDC-Gruppe signifikant erniedrigte Werte im Vergleich zu den anderen Gruppen dieses Zeitraumes. Bei 1/8 Schafen wurde dabei der untere Referenzbereich unterschritten. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die Werte der OVXDC-Gruppe 3-fach niedriger und somit statistisch deutlich signifikant. Andersrum verhielt es sich dagegen zum Zeitpunkt 8 Monate. Hier zeigte die OVXDC-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikanten Anstieg der Osteocalcinkonzentration im Serum. Der Median der Osteocalcinkonzentration und die Resultate von 6/7 Schafen der OVXDC-Gruppe lagen hier über dem orientierenden Referenzbereich. Vergleicht man die Werte der OVXDC-Gruppe zum Zeitpunkt 3 Monate mit dem Zeitpunkt 8 Monate, so zeigte sich ein 4-facher Anstieg der Osteocalcin-Serumkonzentration innerhalb von fünf Monaten.

Die knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP) zeigte außer zum Zeitpunkt 3 Monate keine signifikanten Unterschiede, weder im Gruppenvergleich noch im zeitlichen Verlauf (Abb. 9B). Nur zum Zeitpunkt 3 Monate waren in der OVXDC-Gruppe im Vergleich zur OVXD-Gruppe signifikant erniedrigte Werte darstellbar, wobei die Werte aller Schafe im Referenzbereich lagen und insgesamt eine im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten sehr geringe Streuung aufwiesen. Auch im Vergleich zu den anderen Gruppen erschien die BAP Aktivität im Serum der OVXDC-Gruppe vermindert, auch wenn dieses statistisch nicht signifikant war. Zum Zeitpunkt 8 Monate zeigte ein Schaf (ODS 4/83190) eine sehr hohe, deutlich über dem Referenzbereich

Ergebnisse

gelegene BAP Aktivität von 136,65 U/l, welches die zu diesem Zeitpunkt sichtbare hohe Variation der Werte erklärt. Die Resultate der übrigen Schafe lagen jedoch im Referenzbereich.

Der Knochenresorptionsmarker NTX (Amino-terminales Telopeptid des Typ I Kollagen) war zum Zeitpunkt 3 und 8 Monate in der OVXDC-Gruppe signifikant erniedrigt (Abb. 9C). Hier wies die OVXDC-Gruppe zum Zeitpunkt 3 Monate im Median eine NTX-Konzentration von 15,54 nM BCE (Range: 11,96 nM – 24,83 nM BCE) gegenüber der Kontrollgruppe mit 25,88 nM BCE (Range: 14,83 – 37,77 nM BCE) auf. Noch deutlichere Abweichungen zeigten sich zum Zeitpunkt 8 Monate, wo ein 2-facher Abfall der NTX-Konzentration in der OVXDC- gegenüber der Kontrollgruppe zu verzeichnen war. Zudem wies auch die OVXD-Gruppe zum Zeitpunkt 8 Monate erniedrigte NTX-Konzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe und OVX-Gruppe auf, wobei nur der Vergleich mit der OVX-Gruppe statistisch signifikant war. Insgesamt lagen die NTX-Werte bei 3/7 Schafen der OVXDC-Gruppe und 2/8 Schafen der OVXD-Gruppe unterhalb des unteren Referenzbereiches. Im weiteren Vergleich zeigte die OVX-Gruppe im zeitlichen Verlauf und auch im Vergleich zu den anderen Gruppen einen Anstieg der NTX-Konzentration, wobei der Unterschied nur im Vergleich zu der OVXD- und OVXDC-Gruppe signifikant war.

Das 25-OH-Vitamin D (Abb. 9D) zeigte bereits zu Beginn der Studie (Zeitpunkt 0 Monate) Gruppenunterschiede. So wiesen die Schafe zu Beginn der Studie in der OVXDC-Gruppe eine niedrigere Vitamin D-Serumkonzentration als die Kontroll- und OVX-Gruppe auf. Im zeitlichen Verlauf stellen sich weitere hochsignifikante Unterschiede ein. So zeigte sich zum Zeitpunkt 3 Monate und 8 Monate ein deutlicher Vitamin D Mangel insbesondere in der OVXDC-Gruppe, wobei zum Zeitpunkt 3 Monate die Werte am niedrigsten waren. Zum Zeitpunkt 3 Monate zeigte sowohl die OVXD- als auch die OVXDC-Gruppe signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur OVX-Gruppe. Hier lagen die Werte der OVXDC-Gruppe deutlich unter dem orientierenden Referenzbereich. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wies die OVXDC-Gruppe aufgrund einer bei allen Schafen unterhalb des Referenzbereiches gelegenen nicht messbar niedrigen Konzentration (gegen 0 gehend) eine 38-fach niedrigere Vitamin D Konzentration auf. Diese Verteilung

Ergebnisse

spiegelte sich auch zum Zeitpunkt 8 Monate wider, wobei hier nur die OVXDC-Gruppe statistisch signifikant niedrigere Werte im Vergleich zu den anderen Gruppen aufwies. Zu diesem Zeitpunkt war bei 5/7 Schafen der OVXDC-Gruppe eine Hypovitaminose D nachweisbar. Im Vergleich zum Zeitpunkt 3 zeigten die Kontroll- sowie die OVX-Gruppe einen leichten Abfall in der Vitamin D Konzentration, jedoch lagen die Werte bei allen Schafen dieser Gruppen noch im orientierenden Referenzbereich.

Ergebnisse

4.3.5 Marker des Energiestoffwechsels und IGF-1

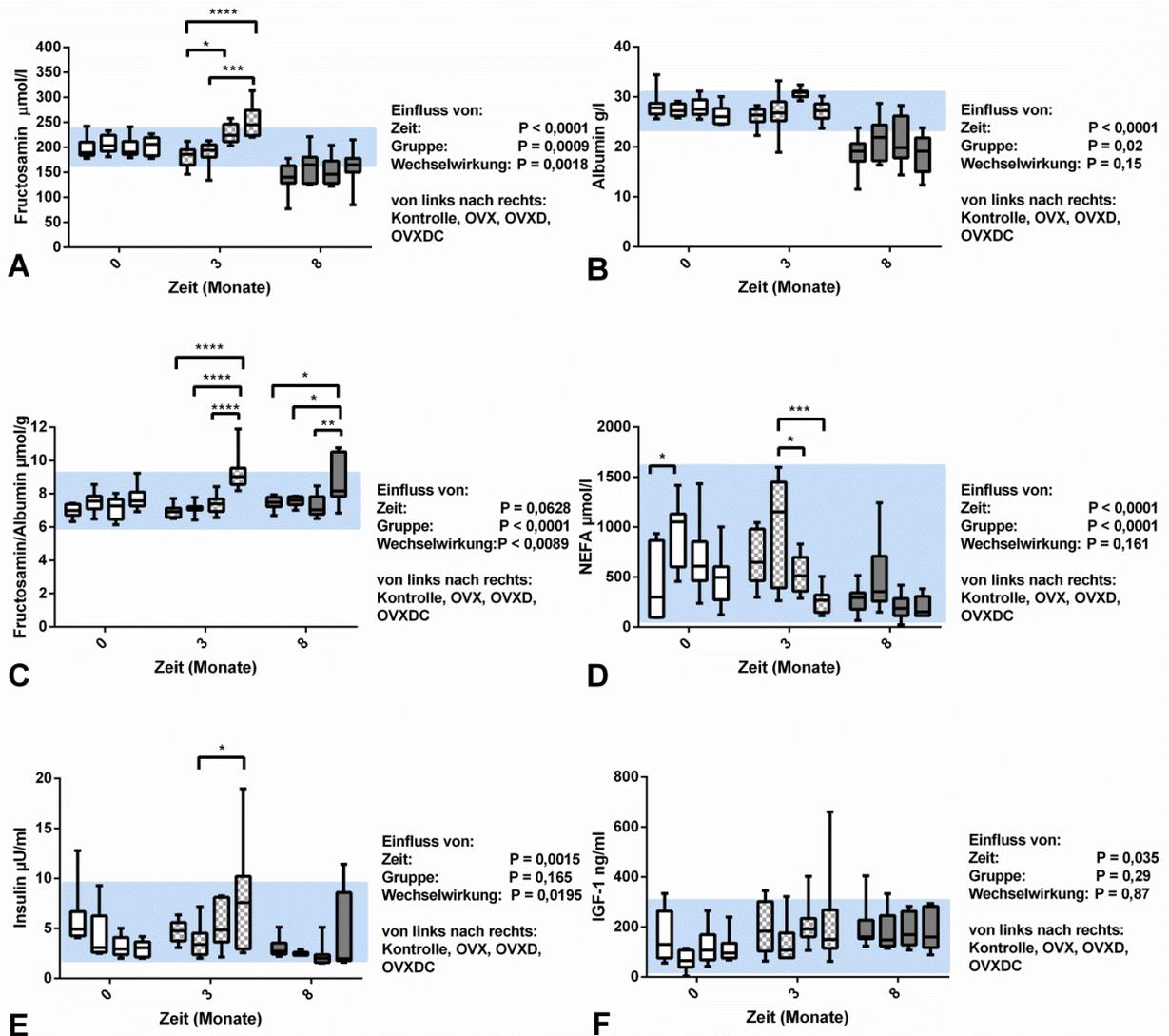


Abbildung 11: Marker des Energiestoffwechsels und IGF-1. Die graphische Darstellung erfolgt als Box-Whisker Diagramm. Der Box-Plot entspricht dabei dem Bereich, in dem 50% der Daten liegen. Die durchgehende Linie stellt den Median der Daten dar. Die Whiskers (Antennen) zeigen den gesamten Bereich der Datenverteilung mit Minimum und Maximum an. Der hellblaue Balken im Hintergrund spiegelt die orientierenden Referenzbereiche wider. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$) Abkürzungen: NEFA = unveresterte Fettsäuren, IGF-1 = Insulin-like growth factor

Die Fructosaminkonzentration im Serum (Abb. 10A) war zu Studienbeginn in allen Gruppen miteinander vergleichbar und es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Erst zum Zeitpunkt 3 Monate wiesen die Gruppen OVXD und OVXDC

Ergebnisse

gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhte Serumwerte auf, wobei sich bei der OVXDC-Gruppe eine höhere Fructosamin-Serumkonzentration fand als in der OVXD-Gruppe. Dies spiegelte sich auch in der Insulinmessung (eine relative Hyperinsulinämie) zu diesem Zeitpunkt in der OVXDC-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe wider. Insgesamt zeigten 2/8 bzw. 3/8 Schafe der OVXCD-Gruppe eine oberhalb des Referenzbereiches gelegene Insulin- und Fructosaminkonzentration. Zum Zeitpunkt 8 Monate dagegen, zeigte sich im zeitlichen Verlauf eine signifikante Veränderung. Hier wiesen alle Gruppen gleichermaßen niedrigere Fructosaminwerte im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten auf. Zwischen den Gruppen selbst war kein signifikanter Unterschied der Fructosamin-Serumkonzentration nachweisbar. Die Kontrollgruppe und die OVXD-Gruppe lagen im Median unterhalb des orientierenden Referenzbereiches. Die Albuminkonzentration (Abb. 10B) wies im zeitlichen Verlauf statistisch signifikante Veränderungen auf. Wie in der Abbildung ersichtlich, sank die Albuminkonzentration bei allen Schafen zum Zeitpunkt 8 Monate im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten deutlich. Im Median wiesen alle Schafe zum Zeitpunkt 8 Monate eine Hypoalbuminämie auf. Der Fructosamin/Albumin Quotient (Abb. 10C) stieg nach 3 Monaten in der OVXDC-Gruppe signifikant im Vergleich zur Kontroll-, OVX- und OVXD-Gruppe des gleichen Zeitpunktes an. Auch zum Endzeitpunkt war in dieser Gruppe ein signifikant erhöhter Fructosamin/Albumin-Quotient im Gegensatz zu den anderen Gruppen nachvollziehbar, wobei dieser im Vergleich niedriger war als zu dem Zeitpunkt davor (Median Zeitpunkt 3 Monate: 9,04 $\mu\text{mol/g}$, Median Zeitpunkt 8 Monate: 8,17 $\mu\text{mol/g}$). Insgesamt zeigten zu den Zeitpunkten 3 und 8 Monate 6/8 Schafe bzw. 3/7 Schafe der OVXDC-Gruppe einen oberhalb des oberen Referenzbereiches gelegenen Fructosamin/Albumin-Quotienten.

Bereits zu Studienbeginn war in der OVX-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine geringgradig höhere Serum-Konzentration der unveresterten Fettsäuren (NEFAs) nachweisbar (Abb.10D). Insgesamt war jedoch zu dem Zeitpunkt eine große interindividuelle Variation der NEFA-Serumkonzentration nachweisbar, was in einem sehr breiten orientierenden Referenzbereich resultierte. Im zeitlichen Verlauf veränderten sich die NEFA-Konzentrationen im Serum signifikant. So zeigte sich zum Zeitpunkt 3 Monate ein im Vergleich zur OVX-Gruppe signifikantes Absinken der NEFA-Serumkonzentration in der OVXD- und OVXDC-Gruppe. Zum Zeitpunkt 8

Ergebnisse

Monate fanden sich innerhalb der Gruppen keine signifikanten Unterschiede, jedoch war graphisch ein Absinken der NEFA-Serumkonzentration aller Gruppen im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten feststellbar.

Die Insulin-Serumkonzentration zeigte signifikante Veränderungen im zeitlichen Verlauf (Abb.10E). Zu Beginn der Studie fand sich in der Kontrollgruppe ein Schaf (K5/94902) mit einer bereits über dem orientierenden Referenzbereich gelegener Insulin-Serumkonzentration. Dieses war jedoch transient und zu den darauf folgenden Probenentnahmezeitpunkten nicht mehr nachvollziehbar. Zum Zeitpunkt 3 Monate war in der OVXDC-Gruppe im Vergleich zur OVX-Gruppe eine signifikant höhere, etwa doppelt so hohe Insulin-Serumkonzentrationen nachweisbar. Auffällig war hier eine große interindividuelle Variation der Insulin-Serumkonzentration, wobei ein Schaf der OVXDC-Gruppe (ODS5/ 83201) einen deutlich oberhalb des Referenzbereiches gelegenen Insulinwert von 18,97 $\mu\text{U/ml}$ aufwies. Zum Zeitpunkt 8 Monate ergaben sich im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede mehr, jedoch war in der OVXDC-Gruppe ähnlich wie zum Zeitpunkt 3 Monate eine große interindividuelle Variation der Insulin-Serumkonzentration und somit ein großer Range gegenüber den anderen Gruppen erkennbar, mit Insulin-Werten zwischen 1,61 - 11,42 $\mu\text{U/ml}$ und einem Median von 1,95 $\mu\text{U/ml}$.

Insgesamt unterschied sich die IGF-1-Serumkonzentration aller Gruppen und zu allen Zeitpunkten nicht signifikant. Jedoch war im zeitlichen Verlauf ein Anstieg der Konzentration in allen Gruppen zu detektieren. So stiegen die Werte der OVXDC-Gruppe vom Zeitpunkt 0 Monate mit 95,42 ng/ml (Median) über Zeitpunkt 3 Monate mit 149,58 ng/ml (Median) auf 159,44 ng/ml zum Zeitpunkt 8 Monate an. Ähnlich verhielt es sich in den anderen Gruppen. Gruppenunterschiede zum jeweiligen Zeitpunkt fanden sich nicht.

5 DISKUSSION

5.1 Orientierende Referenzbereiche

Die orientierenden Referenzbereiche sollten in dieser Studie eine Hilfestellung bezüglich der Interpretation der Konzentrationen gemessener Elektrolyte und biochemischer Marker beim Schaf geben. Obwohl die Schafe vom selben Schäfer mit den gleichen Haltungsbedingungen stammten, konnte eine hohe Spannweite innerhalb eines Referenzintervalls beobachtet werden. Sehr ausgeprägt zeigte sich dies für die ungesättigten Fettsäuren. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass die Tiere trotz ähnlicher Haltungsbedingungen eine unterschiedliche Energiebilanz aufgrund verschiedener Stoffwechselraten (z.B. kurz nach der Laktation, vorher bestehende Krankheit) aufwiesen. Eine standardisierte Haltung der Schafe mit exakt gleicher Fütterung über einen bestimmten Zeitraum war vor Beginn der Studie nicht möglich, was eine mögliche Erklärung für die hohe interindividuelle Variation einiger Parameter zu Studienbeginn ist. Vergleicht man diese orientierenden Referenzbereiche mit den fürs Schaf ermittelten Werte von Dias et al. 2008, so lassen sich in unserer Studie vor allem für Osteocalcin und BAP größere Referenzintervalle erkennen. Die Elektrolyte weisen unter Berücksichtigung des 90% Konfidenzintervalls niedrigere Referenzwerte im unteren Bereich auf als in der Vergleichsstudie angegeben (DIAS et al. 2008). In der genannten Studie wurden 18 Schafe portugisischer Herkunft mit einem Alter von 3 Jahren zur Ermittlung der Referenzbereiche (AP, BAP, OC, Calcium (total), Calcium (ionisiert), Phosphat, Magnesium) herangezogen. Aufgrund der Rasseunterschiede, des geringeren Alters der Tiere und der Verwendung unterschiedlicher Methoden im Vergleich zu dieser Arbeit, können sich unterschiedliche Referenzbereiche ergeben. Bezüglich der Methodik der Referenzwerterstellung muss kritisch angemerkt werden, dass für die Veterinärmedizin - ebenso wie für die Humanmedizin - eine Population von mindestens 40, idealerweise 120 Referenzindividuen empfohlen wird (FRIEDRICHS et al. 2012).

Die hier mit 31 gesunden Schafen erstellten Referenzintervalle und auch die bereits von Dias et al. 2008 publizierten Referenzbereiche (n = 18 Schafe) sind daher als orientierend anzusehen.

5.2 Auswertung der DXA-Daten 0, 3, 8 Monate

Als Goldstandard der Osteoporosediagnostik wurde zum Beweis eines Effektes von Ovariectomie, defizitärer Diät und Glukokortikoiden die Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DXA) verwendet. Das hier gewählte ROI „*abdominal width*“ zeigt die Veränderungen der Lendenwirbel an und gibt zusätzlich Auskunft über die abdominale Fettverteilung, die hinsichtlich einer Insulinresistenz eine Rolle spielen kann. Die Knochendichtemessungen in dieser Studie konnten einen deutlichen Effekt der Kombination OVX, defizitärer Diät und Glukokortikoide auf die Knochendichte mit durchschnittlich ca. 20%igen BMD Verlusten nach 3 Monaten und 30%igen BMD Verlusten nach 8 Monaten in der OVXDC-Gruppe aufzeigen. Dieser Kombinationseffekt konnte in wenigen anderen Studien ebenfalls beobachtet werden. Lill et al. 2002 (LILL et al. 2002b) zeigte bereits bei ovariectomierten Schafen mit einer Calcium- und Vitamin D-armen Fütterung sowie wöchentlicher Methylprednisoloninjektion von 120 mg/Woche (3 x 40 mg/Woche) eine signifikante Reduktion der BMD der Lendenwirbel, wobei dieser mit einem Verlust von ca. - 11%, im Vergleich zur Kontrollgruppe, geringer ausfiel als in der hier vorliegenden Studie. Ein Grund dafür könnte beispielweise die geringere Dosis an wöchentlich verabreichtem Methylprednisolon im Vergleich zu dieser Studie sein (umgerechnet 160 mg/Woche). Zu beachten ist dabei jedoch, dass in der zuvor publizierten Studie das μ CT und nicht die DXA zur Knochendichtebestimmung herangezogen wurde. Dieselbe Arbeitsgruppe kam durch ein ähnliches Versuchsprotokoll wie das hier vorliegende (175 mg/Schaf/Woche Methylprednisolon; Zeitraum: 6 Monate) zu der Schlussfolgerung, dass eine Kombination aller drei Methoden den größten Effekt erzielt. Hier wurde der BMD ebenfalls mithilfe des μ CT bestimmt und es konnte am Radius ein Verlust von 58% (trabekulärer Knochen) bzw. 22% (kortikaler Knochen) detektiert werden (LILL et al. 2002a).

Vergleicht man die ermittelten Werte dieser Studie mit der ebenfalls an einem Schaf-Osteoporosemodell durchgeführten Studie von Zarrinkalam et al. 2009, so zeigen sich durch Kombinationen der drei genannten Methoden ähnliche Werte. Zarrinkalam et al. konnte mittels DXA-Verfahren einen BMD-Verlust an den Lendenwirbeln von durchschnittlich 21,1% nach 3 Monaten und 29,5% nach 6 Monaten detektieren

Diskussion

(ZARRINKALAM et al. 2009) und weist somit ganz ähnliche Befunde wie in der vorliegenden Arbeit auf.

Betrachtet man die anderen Gruppen dieser Studie, so zeigte die OVX-Gruppe (primäre Osteoporose) sowie die Kombination aus Ovariectomie und Calcium- und Vitamin D-armer Diät (sekundärer Osteoporose) keine signifikanten Veränderungen der Knochendichte. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Kennedy et al. 2008. Hier konnten mittels DXA-Messungen ebenfalls keine Veränderungen der Knochendichte am Lendenwirbel von ovariectomierten Schafen nach 12 Monaten gegenüber den Kontrolltieren detektiert werden. Vorteil in dieser Studie war die im Vergleich zu unserer Studie größere Gruppengröße von jeweils 19 Schafen/Gruppe (KENNEDY et al. 2008). Interessanterweise konnte trotz unveränderter BMD eine reduzierte Biomechanik durch einen veränderten Knochenumbau nachgewiesen werden. Dieses war kein Untersuchungskriterium in der hier vorliegenden Arbeit. Die Arbeitsgruppe Sigrist et al., 2006 konnte bei Schafen innerhalb der ersten 4 Monate nach Ovariectomie einen anfänglichen Verlust der Knochendichte von -12,7% (Radius) detektieren. In den anschließenden 8 Monaten blieb der BMD-Wert weitgehend konstant. Nach 12 Monaten stieg dieser jedoch überraschenderweise wieder geringfügig an, so dass beim Schaf ein anderer Einfluss der Östrogene als bei der postmenopausalen Frau zu diskutieren ist (SIGRIST et al. 2006).

In dieser Arbeit wurde zur Verdeutlichung des Knochendichteverlustes der Z-Score bestimmt. Dieser wurde für die Versuchsgruppen OVX, OVXD und OVXDC aus der Standardabweichung der gemessenen Knochendichte vom Mittelwert einer Vergleichsgruppe mit gleichem Alter (Kontrollgruppe) ermittelt. In der Humanmedizin gilt ein Z-Score > -1 als alterstypisch. Somit konnte in der OVXDC-Gruppe zu den Zeitpunkten 3 und 8 Monate ein hochgradiger Verlust der Knochendichte nochmals aufgezeigt werden. Im Vergleich zu den BMD- und BMC-Daten der OVXD-Gruppe kann auch hier ein deutlicher Unterschied zwischen 3 und 8 Monaten dargestellt werden, auch wenn diese Werte nicht den Wert von < -1 unterschreiten. Nach Kenntnis der Autorin wurde ein Z-Score für das Schaf in bisher veröffentlichten Studien nicht publiziert, so dass für diese Tierart keine Vergleichswerte vorliegen.

Diskussion

Neben den Bestimmungen der Knochendichte durch die DXA-Messung wurde auch die abdominale Fettverteilung in % und g untersucht. Schon an den orientierenden Referenzbereichen erkennt man eine hohe Spannbreite des intraabdominalen Fettgehalts. Dennoch ist in der Studie auffällig, dass im Studienverlauf durchschnittlich jede Gruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten an abdominalem Fettgewebe in % und g zunimmt, wobei dieses im Fall der OVXDC-Gruppe am deutlichsten ist. Interessanterweise spiegelte sich dies nicht in dem durchschnittlichen Körpergewicht wider. Hier gab es in allen Gruppen keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf. Ursache für die Körperfettzunahme könnte insbesondere in der Kontroll- und OVX-Gruppe ein saisonaler Unterschied sein, da im Sommer (Zeitpunkt 8 Monate) eine energiereichere Weide als in den Wintermonaten zu finden ist. Dies erklärt jedoch nicht die Zunahme in den anderen beiden Gruppen, da diese unter Standardbedingungen gefüttert worden sind. Ursächlich könnte hier beispielweise eine erhöhte Futteraufnahme als zuvor sein. Allerdings wäre eine Zunahme des Körpergewichtes zu erwarten. Auch ein verminderter Östrogenspiegel infolge der Ovariectomie kann hier als Ursache für die abdominale Körperfettzunahme diskutiert werden. Die deutlichste Steigerung des abdominalen Fettgehaltes in % findet sich in der OVXDC-Gruppe zum Zeitpunkt 8 Monate. Hier ist aufgrund des gleichbleibenden Körpergewichtes eine Zunahme des intraabdominalen Fetts mit begleitender Muskelatrophie als Folge der Glukokortikoid-Behandlung wahrscheinlich. Die Daten zeigen, dass es durch die Glukokortikoidapplikation zu einer Umverteilung von Fettgewebe (mehr abdominales Fett) kommt, was eine Insulinresistenz infolge eines Diabetes mellitus Typ II und metabolischen Syndroms begünstigt (CARMINA et al. 2007). Dasselbe konnte bereits bei Ratten nachgewiesen werden (REBUFFÉ-SCRIVE et al. 1992).

Es ist beschrieben, dass eine hochgradige Hyperhydratation, Ödeme oder Aszites beim Menschen zu einer Überschätzung des Fettgehaltes mittels DXA-Verfahren führen können (ANDREOLI et al. 2009). Da nach Wissen der Autorin beim Schaf keine vergleichbaren Einflussfaktoren auf die Messung des Fettgehaltes mittels DXA-Verfahren untersucht wurden, ist der Einfluss von beispielweise einer Interferenz mit Pansenflüssigkeit nicht sicher abzuschätzen. In Bezug auf den BMD konnten Turner

et al. 1995 eine gute Korrelation, Präzision und Wiederholbarkeit bei der DXA-Messung am Schaf darstellen (TURNER et al. 1995).

5.3 Elektrolyte, Hormone und FEP 0, 3, 8 Monate

Insgesamt zeigten die Ergebnisse der Elektrolyte, dass die defizitäre Diät deutliche Elektrolytveränderungen zur Folge hatte, wobei diese insbesondere zum Zeitpunkt 3 Monate in der OVXD-Gruppe und zum Zeitpunkt 8 Monate in der OVXDC-Gruppe ausgeprägt waren.

In der OVXD-Gruppe zeigte sich zum Zeitpunkt 3 Monate eine Hypocalcämie, die zum einen auf die verminderte Calciumaufnahme infolge defizitärer Diät, zum anderen aber auch - wie hier ebenfalls wahrscheinlich - durch einen sekundären Hyperparathyreodismus hervorgerufen wurde. Ein sekundärer Hyperparathyreodismus ist typischerweise charakterisiert durch eine Hypocalcämie und erhöhte PTH-Konzentration (PREMAOR und COMPSTON 2012). Dieser wird vor allem durch einen Vitamin D-Mangel hervorgerufen, der sich auch in dieser Studie in den Gruppen OVXD und besonders OVXDC zum Zeitpunkt 3 Monate manifestiert. Die Folge ist eine verminderte Calciumabsorption im Darm und verminderte Calciumrückresorption in der Niere mit folglich niedrigen Serum-Calcium-Konzentrationen. Regulatorisch wird daraufhin PTH ausgeschüttet. Obwohl aus methodischen Gründen keine PTH-Messung in dieser Studie für das Schaf möglich war, zeigten sich Effekte einer Parathormonwirkung, die das Vorliegen eines sekundären Hyperparathyreoidismus weiter untermauern. Hierzu zählen insbesondere die hochgradig gesteigerte Phosphatausscheidung im Urin zum Zeitpunkt 3 Monate in den Gruppen OVXD und, noch stärker ausgeprägt, OVXDC. Dieser Effekt der Vitamin D- und Calcium-armen Diät konnte auch im Vorgänger-Rattenmodell dargestellt werden (BAUER et al. 2015), wobei durch die bei der Ratte möglichen PTH-Messungen der sekundäre Hyperparathyreodismus bewiesen werden konnte.

Ein sekundärer Hyperparathyreodismus gilt als Ursache für eine sekundäre Osteoporose (LIPS und VAN SCHOOR 2011b) oder führt zu einer Osteomalazie. Die Osteomalazie geht mit einer verminderten Knochenmineralisierung einher und stellt,

Diskussion

insbesondere bei Vitamin D- und Calcium-Mangel eine der wichtigsten Differentialdiagnosen der Osteoporose dar. Beide Formen (Osteoporose und Osteomalazie) gehen mit einer verringerten Knochendichte mittels DXA-Messverfahren einher und können zu spontanen Frakturen führen (BRAUN und PFEILSCHIFTER 2010). Somit kann in dieser präklinischen Studie anhand der Marker und DXA-Messungen keine sichere Unterscheidung beider Formen getroffen werden. Da sich jedoch Therapie und Frakturversorgung beider Erkrankungen überlappen, gilt dieses Modell als geeignet für weitere Studien bezüglich Frakturheilungsprozessen an osteoporotisch erkrankten Knochen sowie Testung verschiedener Biomaterialien. Auch das Vorgänger-Rattenmodell des Teilprojekts T1 zeigte ähnliche Ergebnisse (EL KHASSAWNA et al. 2013).

Die ausgeprägte Hyperphosphatämie in der OVXD-Gruppe zum Zeitpunkt 3 Monate gegenüber der OVXDC-Gruppe kann sekundär, d.h. gegenregulatorisch zu einer Hypocalcämie auftreten oder ebenfalls im Rahmen eines sekundären Hyperparathyreodismus erfolgen. Da die Phosphatausscheidung in dieser Gruppe zwar erhöht war, aber nicht so ausgeprägt wie in der OVXDC-Gruppe, kann es sich um ein Anfangsstadium des PTH-Effektes handeln, in dem noch keine physiologische Phosphatkonzentration wiederhergestellt wurde. Zum Zeitpunkt 8 Monate war zwar im Vergleich zur Kontroll- und OVX-Gruppe immer noch eine Hyperphosphatämie feststellbar, jedoch war diese nicht mehr so stark ausgeprägt und die mediane Phosphatkonzentration lag im ermittelten orientierenden Referenzbereich.

Durch die Ergebnisse der fraktionierten Phosphatausscheidung im Urin lassen sich neben dem PTH-Effekt in den Gruppen OVXD und OVXDC, der durch eine verstärkte Phosphatausscheidung charakterisiert ist, zeigen, dass Glukokortikoide ebenfalls einen fördernden Effekt auf die Urinausscheidung haben müssen. Insbesondere zum Zeitpunkt 3 Monate zeigte diese Gruppe auch gegenüber der OVXD-Gruppe eine hochgradig gesteigerte Phosphatausscheidung. Ursächlich hierfür kann ein - in Studien bereits beschriebener - stimulierender Effekt der Glukokortikoide auf die PTH-Synthese und -Sekretion aus der Parathyreoidea angenommen werden (PERALDI et al. 1990). Gleichzeitig finden sich in der Literatur Angaben über eine erhöhte PTH-Sensitivität durch Glukokortikoid-induzierte Steigerung der PTH-Rezeptoren. Diese

Diskussion

vermehrte Expression tritt aber vor allem auch am Knochen auf (PAZ-PACHECO et al. 1995; PATSCHAN et al. 2001).

Eine Studie von Wilkens et al. (2010) konnte alleinig durch eine calciumarme Diät keine gesteigerte Phosphatausscheidung im Urin bei Schafen herbeiführen, so dass in dieser Studie angenommen werden kann, dass insbesondere der hochgradige Vitamin D-Mangel dafür verantwortlich ist (WILKENS et al. 2010).

Betrachtet man die Elektrolytkonzentrationen im zeitlichen Verlauf, so zeigte sich zum Zeitpunkt 8 Monate im Vergleich zum Probenzeitraum 3 Monate ein stärkerer Effekt bei der Glukokortikoid-behandelten Gruppe. Hier fand sich eine deutlichere Hypocalcämie im Vergleich zur OVXD-Gruppe und eine geringgradige, wenn auch nicht statistisch signifikante, erhöhte Phosphatkonzentration. Ursächlich hierfür kann ein Langzeiteffekt durch Glukokortikoide diskutiert werden. Obwohl der genaue Mechanismus noch unbekannt ist, ist in der Humanmedizin beschrieben, dass Glukokortikoide eine verminderte renale Absorption von Calcium in den Nierentubuluszellen bewirken und somit die Hypocalcämie verstärken können (REID und IBBERTSON 1987).

Vergleicht man Vitamin D mit den anderen Parametern wie den Elektrolyten, so zeigte sich bereits zu Beginn der Studie (Zeitpunkt 0 Monate) im Gruppenvergleich eine signifikanter Unterschied. Dies lässt trotz ähnlicher Haltungsbedingungen eine ausgeprägte Variation durch die Ernährung vermuten. Vitamin D, genauer das 25-OH-Vitamin D als regulatorisches Hormon zeigte zum Zeitpunkt 3 Monate in der OVXD- und OVXDC-Gruppe sowie zum Zeitpunkt 8 Monate in der OVXDC-Gruppe eine signifikante Erniedrigung, d.h. eine Hypovitaminose D. Einerseits spricht dies für die Effektivität des verwendeten Diätfutters, zum anderen zeigt es, dass auch hier Glukokortikoide einen stärkeren Effekt auf den Vitamin D-Metabolismus haben müssen, als eine Vitamin D-defizitäre Diät alleine. Insbesondere zum Zeitpunkt 3 Monate waren in der OVXDC-Gruppe Vitamin D Konzentrationen nahe 0 nachweisbar. Der Einfluss von Glukokortikoiden auf Vitamin D wird in der Literatur bereits diskutiert, jedoch finden sich, nach Kenntnisstand der Autorin, keine Angaben für das Schaf. Wenige humanmedizinische Studien konnten eine Verringerung der 25-OH-Vitamin D Konzentration bei Langzeit-Glukokortikoid Anwendungen zeigen (CHESNEY et al.

1978; SEARING et al. 2010), so dass dies hier auch beim Schaf angenommen werden kann. Die Pathogenese ist jedoch nicht genau bekannt. Vitamin D wird, wie bereits beschrieben, beim Schaf zu einem Teil in der Haut durch UV-Strahlung synthetisiert, jedoch ließ sich innerhalb der Kontroll- und OVX-Gruppe von Zeitpunkt 3 Monate (Januar/Februar) bis zu den Sommermonaten (Zeitpunkt 8 Monate) kein Anstieg detektieren. Hier zeigte sich sogar ein geringer Abfall der Vitamin D Konzentration. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass die Tiere in den Sommermonaten nicht mehr mit den gleichen Mengen des Standardfutters zugefüttert wurden und die beim Schaf höchste Vitamin D-Aufnahme alimentär bedingt ist.

5.4 Marker des Knochenstoffwechsel 0, 3 und 8 Monate

Die Knochenaufbaumarker Osteocalcin (intakt), knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP) und der Knochenresorptionsmarker NTX sollten die Stoffwechselprozesse in den drei Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe darstellen.

Osteocalcin zählt zu den nicht-kollagenen Proteinen und wird von aktiven Osteoblasten in der Matrix-Mineralisationsphase gebildet. Die Synthese wird von 1,25-Dihydroxyvitamin D stimuliert. Es gilt neben der Bezeichnung als Knochenformationsmarker auch als Knochenumbaumarker. Hierfür müssen die Prozesse Formation und Resorption gekoppelt ablaufen. In dieser Studie zeigte Osteocalcin zum Zeitpunkt 3 Monate in der OVXDC-Gruppe einen signifikanten Abfall im Vergleich zu den anderen Gruppen. In Zusammenhang mit den niedrigen NTX- und BAP-Werten weist dies auf eine stark verminderte Knochenumbauaktivität hin, was sich auch in den DXA-Daten widerspiegelt. Eine mögliche Ursache für die geringere Synthese von Osteocalcin kann neben der Glukokortikoidgabe die hochgradige Hypovitaminose D sein. Zum Zeitpunkt 8 Monate kam es jedoch in der OVXDC-Gruppe zu einer gesteigerten Knochenformation, wobei die OVX- und OVXD-Gruppe auch graphisch leicht erhöhte Osteocalcin-Werte im Vergleich zum Zeitpunkt 3 Monate aufwiesen. Auch der Formationsmarker BAP, ein Enzym welches von Osteoblasten im Rahmen der Formation und Mineralisation gebildet wird, zeigte zum Zeitpunkt 3 Monate eine verminderte Aktivität in der OVXDC- Gruppe, was den verminderten

Diskussion

Knochenaufbau innerhalb der ersten Monate unterstreicht. Zum Zeitpunkt 8 Monate finden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich BAP mehr zwischen den Gruppen. Nur ein Schaf (ODS4/83190) wies stark erhöhte Werte von > 100 U/I BAP auf. Dabei handelte es sich aber nicht um das Schaf mit der Trümmerfraktur. Eine mögliche Ursache hierfür ist nicht genau erkennbar.

Die hier beobachtete Glukokortikoid-induzierte Suppression der Knochenformationsmarker zum Zeitpunkt 3 Monate konnte auch in anderen humanmedizinischen oder experimentellen Schafstudien beobachtet werden (FORTUNE et al. 1989; VAN STRAALLEN et al. 1991; O'CONNELL et al. 1993). Chavassieux et al. (1993) konnte nach 3- monatiger Behandlung mit Glukokortikoiden bei Schafen einen signifikanten Abfall der Osteocalcin-Konzentration im Serum nachweisen. Die Ursache liegt darin, dass Glukokortikoide die Osteoblastenapoptose steigern und die Osteoblastenaktivität hemmen (CHAVASSIEUX et al. 1993). Jedoch finden sich im Vergleich zu dieser Arbeit auch Studien, in denen die Suppression noch nach 7- monatiger Glukokortikoidgabe nachvollzogen werden konnte und ein Anstieg des Osteocalcins nur durch Absetzen der Glukokortikoide erreicht wurde (DING et al. 2010). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Andreasen et al. (2015), bei denen ovariectomierte Schafe unter Glukokortikoidtherapie nach 7 Monaten immer noch erniedrigte Osteocalcinwerte aufwiesen (ANDREASEN et al. 2015). So erscheint der Anstieg des Osteocalcins in der OVXDC-Gruppe zum Zeitpunkt 8 Monate ungewöhnlich. Erhöhte Werte von Osteocalcin sind jedoch ebenfalls als pathologisch zu werten. Vereinzelt Studien beim Menschen zeigen, dass sich erhöhte Osteocalcinwerte vor allem bei *High-turnover*-Osteoporose finden, wohingegen erniedrigte Werte eher bei einer *Low-turnover*-Osteoporose zu finden sind. Jedoch wird dies kontrovers diskutiert, da vereinzelt humanmedizinische Studien keine Korrelation zwischen *Low-* und *High-turnover*-Osteoporose und Knochenstoffwechselmarkern finden konnten (MEHL et al. 2002). Die hohen Osteocalcinwerte zum Endzeitpunkt weisen auf einen gesteigerten Knochenumbau hin und somit auf eine erhöhte Aktivität oder Anzahl an Osteoblasten, der aber aufgrund der niedrigen BMD Daten anscheinend keinen positiven Einfluss auf die Knochenquantität zeigt, sodass eine Mineralisationstörung weiterhin angenommen werden kann. Um diese Behauptung zu unterstützen müssen weitere

Diskussion

immunhistologische Untersuchungen erfolgen. Da Osteocalcin über die Niere und die Leber abgebaut wird, können erhöhte Konzentrationen auch auf eine verminderte renale Clearance oder eine/n Leberfunktionstörung/Leberzellschaden hinweisen (HLAING und COMPSTON 2014). Ein Leberzellschaden erscheint durch die Langzeit-Glukokortikoide gegenüber einer Nierenerkrankung wahrscheinlicher. Eine weitere Verifizierung fand hier jedoch nicht statt.

Die Humanmedizin beschreibt eine biphasische Wirkung der Glukokortikoide auf den Knochen mit einer anfänglichen schnellen Resorptionsphase, der sich in unserer Studie vor allem durch die niedrigen Aufbaumarker darstellte und einer späteren Phase mit verminderter Knochenqualität, die durch eine verminderte Mineralisation charakterisiert ist (VAN STAA et al. 2000).

Einen signifikanten Anstieg von Osteocalcin wie ihn Newton et al. nach drei Monaten post-Ovarektomie beschreibt, konnte in den anderen Gruppen ohne Glukokortikoidgabe (OVX, OVXDC) zu keinem Zeitpunkt nachvollzogen werden (NEWTON et al. 2004).

Betrachtet man die Serumkonzentration des Resorptionsmarkers NTX, der durch Osteoklasten-vermittelte Degradation des Kollagen Typ I entsteht, so zeigte sich ein Abfall zum Zeitpunkt 3 Monate in der OVXDC-Gruppe und erst zum Zeitpunkt 8 Monate auch noch in der Gruppe OVXD. Daraus lässt sich herleiten, dass Glukokortikoide einen schnelleren Effekt auf die Resorptionsvorgänge im Knochen haben als die Diät alleine. Aufgrund des niedrigen BMD in der Gruppe OVXDC zu beiden Zeitpunkten, was einen deutlichen Knochendichteverlust beweist, wären hier theoretisch erhöhte Resorptionsmarker zu erwarten. Allerdings konnte auch schon Zarrinkilam 2009 zeigen, dass die Crosslinks (in diesem Fall CTX) bei Schafen mit Ovarektomie, Calcium-armer Diät und Steroidinjektionen nach einem anfänglichen Anstieg nach 5 Wochen, bereits wieder zum Basalwert absanken, obwohl die Versuchsperiode noch andauerte (ZARRINKALAM et al. 2009). Auch eine aktuelle Studie aus dem Jahr 2015 konnte bei Osteoporose-induzierten Schafen (Ovarektomie + Glukokortikoide) nach einem anfänglichen Anstieg des Serum-markers CTX einen leichten Abfall um den 3. Monat detektieren (ANDREASEN et al. 2015). Somit ist zu überlegen, ob die NTX-Werte zu Anfang dieser Studie (zwischen 0 und 3 Monaten) höher waren und zum

Zeitpunkt 3 Monate bereits stark abnahmen. Weiterhin ist eine verminderte Osteoklastenaktivität oder verminderter Gehalt des Knochens an zu degradierenden Kollagen Typ I als Ursache für verminderte NTX-Werte möglich, obwohl ersteres hier unwahrscheinlicher erscheint, da Glukokortikoide durch verminderte Expression von Osteoprotegerin und Überexpression von RANKL einen positiven Effekt auf die Osteoklastengnese haben (SIVAGURUNATHAN et al. 2005). Weiterhin ist in Zusammenhang mit den erhöhten Osteocalcinwerten zum Zeitpunkt 8 Monate eine verminderte Anzahl an Osteoklasten und somit eine verminderte Konzentration von NTX möglich. Auch diese Annahme müsste durch Immunhistologie bestätigt werden. Der Knochendichteverlust, der durch die Knochendichtebestimmung bestätigt wurde, kann somit auch Folge einer starken Mineralisationstörung sein.

Eine Bestimmung von NTX aus dem Urin und weiteren Resorptionsmarkern wie den Pyridinolinen erfolgte in dieser Studie nicht, wäre jedoch eine Hilfestellung bezüglich der Interpretation.

Da die Marker NTX und CTX einer starken zirkadianen Rhythmik unterlegen sind, wurde versucht, die Probenentnahme zur gleichen Zeit morgens zwischen 8:00 und 9:00 Uhr im Stall durchzuführen, um diesen Einflussfaktor zu umgehen. Des Weiteren ist beschrieben, dass eine Futteraufnahme zu erniedrigten Werten führen kann. Alle Tiere aus den vier Versuchsgruppen wurden jedoch vor der Operation insofern es möglich war Nüchtern gehalten, sodass sich die Veränderung bei allen Gruppen einstellen müsste.

5.5 Marker des Energiestoffwechsel 0, 3 und 8 Monate

Die Marker des Energiestoffwechsels sollten eine potentielle Veränderung im Kohlenhydratstoffwechsel und Fettstoffwechsel aufzeigen, da diese insbesondere bei Erkrankungen wie Diabetes mellitus und metabolischem Syndrom betroffen sind. In der Literatur ist häufig beschrieben, dass Übergewicht oder die Zunahme an abdominalem Fettgewebe als hoher Risikofaktor für die Entwicklung einer Insulinresistenz gilt (KAHN und FLIER 2000). Zudem können diese Krankheitsbilder zu sekundärer Osteoporose führen.

Diskussion

Um den Kohlenhydratstoffwechsel in den verschiedenen „Osteoporose“-Gruppen zu evaluieren, wurden die Fructosamine als „Langzeitgedächtnis“ der Glukose bestimmt. Eine Glukosebestimmung war aus arbeitstechnischen Bedingungen nicht möglich, um einen repräsentativen Glukosegehalt darstellen zu können. Glukose wird nach der Blutprobenentnahme sehr schnell von Erythrozyten verbraucht und Lagerung führt somit zu falsch niedrigen Ergebnissen. Die Fructosaminbestimmung in dieser Studie zeigte auffällige Veränderungen zum Zeitpunkt 3 Monate in der OVXDC-Gruppe. Da es sich bei Fructosaminen um glykierte Proteine (hier Albumin) handelt und eine Hypoalbuminämie infolge beispielweise Leberinsuffizienz, Malabsorption, Kachexie, Entzündung oder Blutverlust zu falsch niedrigen Fructosamin-Werten führen können, wurde in dieser Studie zusätzlich der Fructosamin/Albumin-Quotient ermittelt. Dieser zeigte hier nicht nur zum Zeitpunkt 3 Monate eine signifikante Erhöhung der Werte in der OVXDC-Gruppe, sondern auch zum Zeitpunkt 8 Monate im Vergleich zu den anderen Gruppen. Somit ist bei den OVXDC-Schafen eine Insulinresistenz sehr wahrscheinlich, da die Glukosespiegel über einen längeren Zeitraum (in der Regel > 3 Wochen) erhöht sein müssen, um eine vermehrte Fructosaminbildung zu induzieren. In Ergänzung zu dieser Annahme, konnten zum Zeitpunkt 3 Monaten geringgradig signifikant erhöhte Insulinwerte in der OVXDC-Gruppe dargestellt werden. Zum Zeitpunkt 8 Monate zeigten sich durch eine breite Streuung der Werte zwar keine statistisch erhöhten Insulinkonzentrationen im Serum, jedoch ließen sich im Gruppenvergleich graphisch höhere Werte in der OVXDC-Gruppe erkennen.

Es ist bekannt, dass Glukokortikoide einen negativen Einfluss auf den Kohlenhydratstoffwechsel haben. In der Humanmedizin sind einige Wirkmechanismen der Glukokortikoide beschrieben, die sekundär zu metabolischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ II und /oder dem metabolischen Syndrom führen können. Glukokortikoide stören die insulinvermittelte Hemmung der hepatischen Glukosefreisetzung, vermindern den Glukoseverbrauch im Gewebe und führen zu einer Senkung der Insulinrezeptoraffinität (MEYER und BADENHOOP 2003; VAN RAALTE et al. 2010). Durch die Fructosamin- und Insulinbestimmung konnte dieser negative Einfluss auch beim Schaf dargestellt werden.

Diskussion

Der Fettstoffwechsel wird in dieser Studie durch die Bestimmung der unveresterten Fettsäuren (NEFA) beurteilt. Diese zeigen zu Beginn der Studie bereits eine breite Streuung der Werte innerhalb der verschiedenen Gruppen, was auf unterschiedliche Futteraufnahme oder unterschiedliche Stoffwechsellagen hindeuten kann. Niedrige NEFA-Konzentrationen deuten in der Regel auf eine gute Energieversorgung bei Wiederkäuern hin, da eine energetische Unterversorgung zu einer gesteigerten Lipolyse mit hohen Werten führt. Zum Zeitpunkt 3 Monate fanden sich in der OVXDC-Gruppe aber auch in der OVXD-Gruppe, im Vergleich zu den anderen Gruppen, signifikant niedrigere Werte gegenüber der Kontroll- und OVX-Gruppe. Obwohl Glukokortikoide die Lipolyse stimulieren, kam es während der Behandlung zu einem Abfall der NEFA-Konzentration bei den Schafen. Studien bei Kühen, die jeweils nur mit einer Einzeldosis an Glukokortikoiden behandelt wurden, führten ebenfalls zu keinem sichtbaren lipolytischen Effekt in Bezug auf das Verhalten der unveresterten Fettsäuren (Jorritsma et al. 2004), sondern wie hier eher zu einer Verminderung der Werte.

Eine Studie aus dem Jahr 2009 (CITIL et al. 2009) untersuchte bei Schafen ebenfalls den Effekt einer einzelnen Gabe von Glukokortikoiden (hier Dexamethason) auf den Energiemetabolismus. Die Studie konnte ähnliche Ergebnisse wie die vorliegende Studie mit Langzeitbehandlung von Methylprednisolon zeigen. Bei Citil et al. kam es innerhalb eines Tages zu einem Anstieg von Glukose, Insulin und Cholesterol, wobei die unveresterten Fettsäuren (NEFA) eher eine verminderte Konzentration innerhalb der ersten 7 Tage nach Injektion aufwiesen. Es ist zu beachten, dass die Ergebnisse sich nur auf eine einmalige Injektion beziehen und nicht wie in unseren Fall eine Langzeitbehandlung stattfand. Allerdings scheint – wie unsere Ergebnisse zeigen - auch eine Langzeitbehandlung mit den bereits für eine Kurzzeitbehandlung bekannten Ergebnissen übereinzustimmen.

In der Humanmedizin ist beschrieben, dass erhöhte NEFA-Werte zu einem Diabetes mellitus Typ II infolge einer erhöhten Insulinresistenz führen können. In unserer Studie konnten sich keine erhöhten Werte finden, so dass die Insulinresistenz eher durch den primären Glukokortikoideffekt hervorgerufen wurde (RODEN et al. 1996; BODEN und SHULMAN 2002).

Diskussion

Die Ovariectomie alleine und die damit einhergehenden niedrigen Östrogenwerte hatten in der vorliegenden Studie keinen Einfluss auf den Energiestoffwechsel. Zu erwarten gewesen wäre, dass durch eine geringere Anwesenheit von Östrogen, ein erhöhtes Auftreten von abdominalem Fettgewebe und Hinweise auf eine Insulinresistenz in der OVX-Gruppe nachweisbar sind (MAYES und WATSON 2004).

Das Wachstumshormon Insulin-like growth factor (IGF-1) zeigte in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei dem Ausreißer zum Zeitpunkt 3 Monate in der OVXDC-Gruppe handelt es sich um dasselbe Schaf, welches auch einen extrem hohen Insulinwert aufwies (ODS5/83201). Erhöhte Spiegel an IGF-1 sprechen gleichzeitig für erhöhte Growth-Hormon (GH) Konzentrationen, da es als Vermittler von GH gilt. Eine zugrunde liegende Ätiologie, des hier über dem Referenzbereich liegenden Wertes, lässt sich nicht sicher nachvollziehen. In der Humanmedizin finden sich vor allem erhöhte Konzentrationen bei endokrin aktiven Hypophysenadenomen oder durch eine ektopische GH-Bildung (THOMAS 2012). Da dies allerdings zum Zeitpunkt 8 Monate nicht mehr nachgewiesen werden konnte erscheint es sehr unwahrscheinlich. Andere Einflussgrößen wie Alter, Adipositas oder Östrogene können die IGF-1-Werte positiv beeinflussen (CLEMMONS 2011). Als weitere Ursache kann eine falsch hohe Messung (Artefakt) nicht ausgeschlossen werden, da der Effekt nur bei einem Schaf auftrat. Vergleicht man die Ergebnisse dieser Arbeit mit anderen Studien in der Literatur, so erscheint es ungewöhnlich, dass IGF-1 keine Veränderungen zeigte. In der Humanmedizin werden niedrige IGF-1-Werte bereits als Frühmarker für einen erniedrigten BMD bei postmenopausalen Frauen beschrieben (LIU et al. 2008). In unserer Studie lässt sich beim Schaf kein Zusammenhang mit der Osteoporoseentwicklung erkennen. Auch Glukokortikoide hatten hier keinen sichtbaren Effekt auf die IGF-1-Transkription. In vitro Studien konnten dagegen zeigen, dass Glukokortikoide die Transkription von IGF-1 in Osteoblasten hemmen (DELANY et al. 2001). Auch eine Schafstudie konnte den negativen Effekt von Glukokortikoiden zeigen. Hierbei wurde Schafen gegen Ende der Trächtigkeit mehrmals Glukokortikoide i.m. injiziert. Dadurch konnte eine verminderte Zirkulation von IGF-1 im Fetus und auch noch im frühen postnatalen Stadium gegenüber der Kontrollgruppe induziert werden (GATFORD et al. 2008). In der vorliegenden Studie konnte jedoch weder eine Ovariectomie noch die defizitäre Diät

oder eine langfristige Glukokortikoidgabe eine signifikante Veränderung der IGF-1-Synthese adulter Schafe induzieren.

5.6 Limitationen der Studie

Die Studie konnte vor allem aufzeigen, dass eine Kombination aus Ovariectomie, Multi-defizitärer Diät sowie hochdosierten Glukokortikoiden einen sichtbaren Effekt auf Knochendichte, Elektrolyte und bestimmbare Knochenstoffwechsel- sowie Energiemarker hat.

Eine Limitation in dieser Studie ist jedoch das Futtermanagement. Die unkontrollierte Futteraufnahmemenge/Schaf bezüglich Diät- als auch Standardfutter sowie der zusätzliche Weidegang der Kontroll- und OVX-Gruppe lässt keinen standardisierten Vergleich zu. Eine Fütterung durch Futterautomaten sowie die gleiche Aufstallung während der gesamten Versuchsperiode für die Kontroll- und OVX-Schafe wären zu bevorzugen gewesen.

Eine weitere wesentliche Limitation der vorliegenden Arbeit ist der Einsatz von hochdosierten Methylprednisolon, welches mit beschriebenen Nebenwirkungen wie Haarausfall, dünne Haut und Mattigkeit bei Schafen einhergeht (EGERMANN et al. 2008). Um ein möglichst stressfreies Milieu für die Tiere zu schaffen, wurden die Injektionsintervalle von Beginn an auf eine vierzehntägige Gabe im Vergleich zu anderen Studien reduziert (DING et al. 2010; ANDREASEN et al. 2015). Die angewendete Dosis ergab für eine Woche errechnet somit 160 mg/Schaf/Woche. Im Vergleich dazu verwendeten Andreassen et al. (2015) neben der Diät eine Dosis von 0,6 mg/kg/Tag Methylprednisolon fünfmalig in der Woche. Das entspricht mit einem Durchschnittsgewicht der Schafe von 75 kg einer Wochendosis von 225 mg und liegt damit deutlich über der hier verwendeten Dosis. Nachteil der zuvor publizierten Studie ist zudem die Applikation von Methylprednisolon in häufigen Injektionsintervallen, die einen hohen Stressfaktor für die Tiere bedeuten (ANDREASEN et al. 2015). Die Arbeitsgruppe von Ding et al. verwendete die gleiche Dosis im gleichen Intervall über 7 Monate (DING et al. 2010). Studien von Lill et al. (2002) verwendeten eine anfängliche Dosis von 120 mg/Woche/Schaf. Hierbei wurden 3 x 40 mg pro Woche injiziert (LILL et al. 2002b). Eine weitere Studie von Goldmann et al. (2005) setzte ein

Diskussion

Schema mit größeren Injektionsintervallen ein (500 mg/Schaf alle 3 Wochen), was einer Wochendosis von ca. 167 mg/Schaf entspricht (GOLDHAHN et al. 2005). In allen dieser genannten Studien wurden Nebenwirkungen beobachtet. Egermann et al. (2008) kommt zu der Schlussfolgerung, dass hohe Dosen Prednisolon mit wenigen Injektionsintervallen, den gleichen Effekt auf den Knochen ausüben wie niedrigere Dosen Prednisolon pro Tag und dafür häufigeren Intervallen, wobei ersteres Schema mit geringeren Auftreten von Nebenwirkungen und weniger Stress einhergeht (EGERMANN et al. 2008). In unserer Studie kam es trotz großer Injektionsintervalle und im Vergleich zu den anderen Studien, moderater Dosis Methylprednisolon bei einigen Schafen in der OVXDC-Gruppe zu deutlichen Nebenwirkungen wie Ausfall der Wolle, cushingoides Erscheinungsbild, spontanem Versterben (n = 1) sowie pathologischen Frakturen (n = 1). Letzteres Schaf wurde aus tierschutzrechtlichen Aspekten vorzeitig euthanasiert. Vorteil an dem gewählten Regime war das geringe Injektionsintervall mit weniger Stress für die Tiere. Es ist anzunehmen, dass niedrigere Dosen Methylprednisolon ausreichen, um einen signifikanten Knochendichteverlust herbeizuführen und gleichzeitig die Nebenwirkungen zu reduzieren. Eine aktuelle Studie konnte durch intramuskuläre Gabe von 150 mg/Schaf Methylprednisolon alle 20 Tage für insgesamt 80 Tage ebenfalls einen signifikanten Knochenverlust (bestätigt durch Untersuchung einer Knochenbiopsie mittels quantitativer CT) darstellen. Von Nebenwirkungen wurde in dieser Studie nicht berichtet, allerdings lag der Fokus der Arbeit ausschließlich auf den Ergebnissen der Biopsieuntersuchungen und klinische Resultate wurden von den Autoren nicht berichtet (KIEŁBOWICZ et al. 2015).

In der Humanmedizin sind bereits einige Knochenmarker etabliert und können gut aus Serum oder Urin bestimmt werden. Beim Schaf sind jedoch noch nicht viele kommerzielle Tests verfügbar, die eine gute Kreuzreaktivität versprechen. So wurden in der vorliegenden Studie einige Biomarker getestet, die bisher noch keine routinemäßige Anwendung beim Schaf fanden. Dazu zählen hier insbesondere PTH, sowie weitere aktuelle Marker des Knochenstoffwechsels Cathepsin K und DKK-1. Diese konnten aufgrund keiner oder nur geringer Kreuzreaktivität mit den in den ELISAs verwendeten Antikörpern nicht weiter bestimmt werden, obwohl sie wichtige ergänzende Auskunft hätten geben können. Eine mögliche Ursachen für die fehlgeschlagene PTH-Bestimmung könnte eine fehlende Kreuzreaktivität mit dem

Diskussion

verwendeten polyklonalen Ziegen-Antikörper darstellen (gleich den Leerwerten). Die Bestimmung von Cathepsin K erfolgte mit einem polyklonalen Schaf-Antikörper, der in den Mikrotiterplatten fixiert war. Die ausgeprägte Streuung der Messergebnisse (insbesondere der Messungen für Wiederholbarkeit) lassen annehmen, dass der Test für Cathepsin K nicht funktioniert, da es nur zu unspezifischen Bindungen kam. Der ELISA für DKK-1 musste ebenfalls aufgrund einer zu geringen Kreuzreaktivität mit Anti-Human Antikörpern ausgeschlossen werden. Insgesamt lagen die Messergebnisse hier deutlich unter dem vom Hersteller angegebenen Referenzbereich des Menschen, so dass eine geringe Kreuzreaktivität mit Schaf-DKK-1 vermutet werden kann. Somit bedarf es noch weiterer Tests, die ein einfaches und schnelles Bestimmen von neuen Biomarkern auch beim Schaf als Osteoporosemodell erlauben. Neben den Enzym-Immunoassays können beispielweise für Insulin und IGF-1 andere genauere Messverfahren wie Radio-Immunoassays (RIA) herangezogen werden.

Des Weiteren sind bei der Interpretation der Ergebnisse die Intra- und Inter-Assay Variationen zu berücksichtigen. Aus diesem Grund wurden zu jedem Parameter Mehrfachbestimmungen durchgeführt. Diese Ergebnisse zeigen insbesondere in niedrigen Messbereichen einen erhöhten Variationskoeffizienten, was bedeutet, dass es - wie bereits in der Literatur bekannt - in den unteren Messwerten zu deutlicheren Messungenauigkeiten kommen kann (GUIDANCE FOR INDUSTRY 2001).

Eine wichtige Kenntnis beim Umgang mit biochemischen Markern ist das Wissen über die biologische Varianz. Die biologische Varianz kann nach einer Österreichischen Arbeitsgruppe (2012) in zwei große Kategorien unterteilt werden (BIEGLMAYER et al. 2012). Auch wenn es sich hierbei um einen humanmedizinischen Leitfaden handelt, ist dieser auch auf das Schaf übertragbar. Zum einen handelt es sich um die unkontrollierbaren Faktoren wie Alter (häufig höhere Werte im juvenilen Alter), Geschlecht, Trächtigkeit, Laktation, physische Aktivität und Krankheit und zum anderen um die kontrollierbaren Einwirkungen wie Medikamente (Hormonersatz, antiresorptive Therapie, anabole Therapie) und vor allem saisonale und zirkadiane Variationen der Knochenmarker. Um unkontrollierte Faktoren möglichst gering zu halten, wurden nur Schafe der gleichen Rasse mit ungefähr gleichem Altersmedian

Diskussion

(Gruppe) in die Studie eingeschlossen. Um die zirkadiane Rhythmik zu umgehen wurde versucht, die Blut- und Urinproben in den Morgenstunden zu gewinnen. Die saisonalen Schwankungen waren in dieser Studie nicht zu beeinflussen, da die Studiendauer 8 Monate betrug. Eine Studie von Arens et al. (2007) untersuchte die saisonalen Einflüsse beim Schaf bezüglich Knochendichte, Biomarker und Hormone und konnte beim Knochenaufbaumarker BAP keine signifikanten saisonalen Unterschiede bei Schafen detektieren, obwohl es in den Sommermonaten zu einem leichten Anstieg kam (ARENS et al. 2007). Als Knochenresorptionsmarker wurden hier die beiden Pyridinoline (PYD, DPD) im Urin untersucht. Auch hier fand sich kein statistisch signifikanter saisonaler Unterschied, wenn auch wieder die Werte im Frühjahr gegenüber den Herbstmonaten leicht erhöht waren. Obwohl NTX in der Studie von Arens et al. nicht bestimmt wurde, ist aufgrund der Ergebnisse der anderen Resorptionsmarker nicht von einem signifikanten saisonalen Unterschied bei NTX auszugehen. Jedoch müsste diese Annahme weiter überprüft werden. Interessanterweise konnte auch beim Schaf ein saisonaler Unterschied bezüglich der Knochendichte festgestellt werden. So zeigten die Schafe in den Wintermonaten im Vergleich zu den anderen Jahreszeiten niedrigere BMD-Werte von bis zu - 5,6%. In der vorliegenden Arbeit stellte sich in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 0 Monate (Oktober/November) mit einem BMD (Median) von 0,98 g/cm² bis zum Zeitpunkt 8 Monate (Juni/Juli) mit einem BMD (Median) von 1,00 g/cm² kein erkennbarer Unterschied ein. Da hier die Vergleiche zwischen den Gruppen nur zu einem Messzeitpunkt, jeweils in Bezug auf die Ergebnisse der Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt durchgeführt wurden, ist hier zudem der Einfluss einer möglichen saisonalen Varianz als gering anzusehen.

Die Vorteile der Bestimmung biochemischer Marker liegt in der nicht-invasiven Methodik, jedoch sind diese, wie aufgeführt, vor allem präanalytischen Schwankungen unterlegen und es bedarf einer sicheren Interpretation. Die Knochendichtebestimmung eignet sich gut, um einen Effekt auf den Knochen sichtbar zu machen, jedoch kann eine Unterscheidung zwischen Osteoporose und Mineralisationsstörung infolge einer Osteomalazie nicht unterschieden werden. Auch die Untersuchung zur Aktivität und Anzahl eingelagerter Zellen wie Osteoblasten und Osteoklasten, die hinsichtlich einer

korrekten Interpretation der Knochenserum-marker nötig wäre, kann nur durch immunhistologische Untersuchungsverfahren erfolgen.

Im Zusammenhang mit der Interaktion zwischen Knochen- und Energiestoffwechsel wäre eine Bestimmung des untercarboxylierten Osteocalcins weiterhin interessant gewesen. Das von Osteoblasten gebildete untercarboxylierte Osteocalcin konnte bereits in Mausmodellen zeigen, dass es nicht nur einen Effekt auf den Knochenstoffwechsel hat, sondern auch auf den Glukose- und Fettstoffwechsel (FERRON et al. 2008). Auch Adipozytokine wie Adiponectin, das in subkutanem und viszeralem Fett exprimiert wird, könnte weitere Erkenntnisse über die Interaktion zwischen Knochen- und Energiestoffwechsel beim Schaf bringen, da es neben der Regulation der Energiestoffwechsels und Insulinsensitivität auch eine Rolle in der Osteoblastenproliferation und Differenzierung spielt (KANAZAWA et al. 2011).

5.7 Schlussfolgerung

Insgesamt konnte beim Schaf durch die Kombinationsinduktion einer Osteoporose mittels Ovariectomie, defizitärer Diät (Calcium und Vitamin D) und Glukokortikoiden ein Osteoporose-ähnliches Krankheitsbild mit deutlichen Veränderungen des Knochen- und Energiestoffwechsels induziert werden. Die Studie ist somit eine Grundlage für weitere Forschungen wie z.B. dem Einsatz neuartiger Biomaterialien zur Frakturversorgung am Tiermodell Schaf.

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass eine sichere Unterscheidung zwischen Osteoporose und Osteomalzie durch einen hervorgerufenen sekundären Hyperparathyreosismus auch mittels DXA-Messung nicht unterschieden werden kann.

Die Elektrolyte und biochemischen Knochenmarker zeigen deutliche Veränderungen im Knochenstoffwechsel an, sowie eine Interaktion zwischen Knochen- und Energiestoffwechsel im Sinne einer transienten Insulinresistenz. Dabei sind die frühesten und ausgeprägtesten Veränderungen in der OVXDC-Gruppe nachweisbar, was darauf schließen lässt, dass Glukokortikoide beim Schaf einen schnelleren Effekt

Diskussion

auf den Knochen- und Energiestoffwechsel haben als eine Ovariectomie und Diät alleine.

Anders als im Vorgänger-Rattenmodell (EL KHASSAWNA et al. 2013) zeigt sich insgesamt nur ein geringer Effekt auf die Knochendichte durch eine Ovariectomie und Diät alleine, sodass für präklinische Studien für neue Biomaterialien ein Kombinations-Schema inklusive Glukokortikoidgabe empfohlen wird. Jedoch ist die Menge an Methylprednisolon noch anzupassen, um starke Nebenwirkungen bei den Tieren zu vermeiden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen des Sonderforschungsbereichs/ Transregio 79 (2010-2014): „Werkstoffe für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen“ Teilprojekt T1: „Etablierung und Qualitätssicherung osteoporotischer Tiermodelle“. Die Versuche am Tier wurden in der Zentralen Forschungseinrichtung der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main durchgeführt. Der Tierversuchsantrag (GE: F31/36) wurde durch das Regierungs-präsidium Darmstadt am 27.09.2012 genehmigt. Serum und Urinproben, die für diese Arbeit relevant waren, wurden am Klinikum Veterinärmedizin, Klinische Pathophysiologie und Klinische Laboratoriumsdiagnostik der Justus-Liebig-Universität Gießen analysiert. Ziel dieses interdisziplinären Forschungsprojektes war es, neue Knochenersatzmaterialien und Implantatwerkstoffe für den systemisch erkrankten Knochen des Menschen zu generieren. Für die dafür nötigen präklinischen Studien ist die Etablierung eines Tiermodells, welches die Prozesse am menschlichen Knochen in ähnlicher Weise widerspiegeln kann, unerlässlich.

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion zwischen Knochen- und Energiestoffwechsel im Osteoporose-induzierten Schafmodell zu evaluieren, die beim Schaf bisher wenig bekannt ist.

Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich auf 8 Monate mit drei verschiedenen Probenentnahmezeitpunkten (0, 3, 8 Monate). Hierzu wurden 31 adulte, gesunde weibliche Merino-Schafe in vier Gruppen mit vergleichbarem Alter eingeteilt. Der Altersmedian lag in den Gruppen um die 4,5 - 5,5 Jahre. Eine nicht - Sham operierte Gruppe (n = 8) diente als Kontrollgruppe. Die Osteoporoseinduktion erfolgte nach 3 Schemata: Die erste Gruppe sollte die postmenopausale Osteoporose der Frau imitieren. Dazu wurde die erste Gruppe (n = 7) ovariectomiert („OVX-Gruppe“). Die zweite Gruppe (n = 8) erhielt neben einer Ovariectomie eine Calcium/Vitamin D-defizitäre Diät („OVXD-Gruppe“) und stellte somit eine Form der sekundären Osteoporose dar. Die letzte Gruppe (n = 8) erhielt eine Kombination aus Ovariectomie, defizitärer Diät und Glukokortikoiden („OVXDC-Gruppe“, 320 mg/Schaf Methylprednisolon alle 14 Tage i.m.) und repräsentierte somit ebenfalls eine häufige sekundäre Osteoporoseform. Um einen Effekt auf den Knochenstoffwechsel zu

Zusammenfassung

beweisen, erfolgte in dieser Arbeit die Knochendichtebestimmung mittels Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DXA) mit der *Region of Interest* „abdominal width“, in der die Veränderungen in den Lendenwirbelkörpern nachgewiesen werden konnten. Neben der Knochendichte (BMD) und dem Knochenmineralgehalt (BMC) wurden dabei das abdominale Fett und der Z-Score, d.h. die Abweichungen des BMDs in Standardabweichungen vom altersphysiologischen Mittelwert (hier die Werte aller Schafe zum Zeitpunkt 0) bestimmt. Ein Z-Score < -1 gilt nach Angaben in der Humanmedizin als pathologisch.

Als Marker des Knochenstoffwechsels dienten die Elektrolyte Calcium, Magnesium und Phosphat sowie die fraktionierte Phosphatausscheidung (FEP) im Urin und die den Knochenstoffwechsel beeinflussenden Hormone Vitamin D (25-OH-Vitamin D), Parathormon (PTH) und Insulin-like growth Faktor 1 (IGF-1). Als Marker der Knochenformation wurden die knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP) und Osteocalcin (intaktes Osteocalcin) bestimmt. Die Marker der Knochenresorption umfassten N-terminales Telopeptid des Kollagen Typ I (NTX), Cathepsin K und Dickkopf-1 (DKK-1). Die Fructosamin-Serumkonzentration, der Fructosamin/Albumin - Quotient, unveresterte Fettsäuren (NEFAs) und die Insulin-Konzentration im Serum spiegelten den Energiestoffwechsel wider.

Die Blutprobengewinnung erfolgte an der *Vena jugularis* Morgens im Stall der Zentralen Forschungseinrichtung. Zu diesem Zeitpunkt wurden auch eine DXA-Messung am narkotisierten Schaf und eine Uringewinnung mittels Katheterisierung der Schafe durchgeführt. Nach 8 Monaten (Endzeitpunkt) wurden die Schafe nach der letzten Probenentnahme im bereits narkotisierten Zustand mit 50 mg/ kg Pentobarbital-Natrium intravenös schmerzlos eingeschlüpfert.

Die Elektrolyte Calcium und Magnesium wurden mittels isoelektrischer Elektrode am Analysegerät Nova CRT8 (Nova) bestimmt. Für die Messung der Phosphat-, Albumin- und Fructosaminkonzentration sowie der NEFAs fand das automatische Analysegerät Pentra 400 ABX (Horiba) Einsatz. Die übrigen Analysen erfolgten mittels kommerziell erhältlicher Enzym-Immunoassays (EIA/ELISAs), wobei es sich um humane Testkits handelte, deren Kreuzreaktivität für das Schaf im Falle von Vitamin D, PTH, Cathepsin K, DKK-1 und IGF-1 nicht bekannt war.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die humanen Tests für PTH, Cathepsin K und DKK-1 aufgrund nicht ausreichender Kreuzreaktion beim Schaf nicht verwendet werden können.

Die klinische Untersuchung zeigte bei den Schafen der OVXDC-Gruppe deutliche cushingoide Nebenwirkungen und 1/8 Schafen musste aufgrund einer pathologischen Trümmerfraktur 14 Tage vor Versuchsende euthanasiert werden.

Die Induktion der Osteoporose führte zum Zeitpunkt 3 Monate zu einem signifikanten Absinken der Knochendichte (BMD) und des Knochenmineralgehalts (BMC) in der OVXDC-Gruppe. In der OVXD-Gruppe sanken die medianen Werte ebenfalls, jedoch war diese Veränderung nicht signifikant. Zu den Zeitpunkten 3 und 8 Monate zeigten die Schafe der OVXDC-Gruppe einen Z-Score von -3,3 bzw. -4,9 Standardabweichungen. In der OVX- und OVXD-Gruppe betrug der Z-Score zum Zeitpunkt 8 Monate -0,29 und -0,96 und war somit als altersphysiologisch zu interpretieren. Im zeitlichen Verlauf kam es in allen Gruppen zu einem signifikanten Anstieg des mittels DXA detektierbaren abdominalen Fettes. Dabei zeigte die OVXDC-Gruppe zum Zeitpunkt 8 Monate die höchsten Medianwerte, jedoch war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant.

Insgesamt zeigten sich die frühesten Veränderungen der Marker des Knochen- und Energiestoffwechsels zum Zeitpunkt 3 Monate in der OVXDC-Gruppe und erst später in der OVXD-Gruppe. Zum Zeitpunkt 3 Monate war in der OVXDC-Gruppe ein signifikantes Absinken der Serum-Calcium Konzentration nachweisbar. Die OVXD-Gruppe zeigte zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Hyperphosphatämie. In beiden Gruppen war eine deutlich erhöhte FEP nachweisbar, jedoch war der Befund nur für die OVXDC-Gruppe signifikant. Die OVXDC-Gruppe zeigte zum Zeitpunkt 8 Monate eine signifikante Erhöhung der Osteocalcin-Serumkonzentration, die von einer signifikanten Erniedrigung der NTX-Konzentration begleitet war. Die Gabe einer defizitären Diät führte zum Zeitpunkt 3 Monate bei OVXDC-Gruppe und in geringerem Maße bei der OVXD-Gruppe zu einer signifikanten Erniedrigung der Vitamin D-Serumkonzentration. Bei der OVXDC-Gruppe blieb dies auch bis zum Zeitpunkt 8 Monate signifikant, wobei die Werte zu beiden Zeitpunkten nahe 0 lagen. In der OVXDC-Gruppe konnte zu den Zeitpunkten 3 und 8 Monaten eine signifikante

Zusammenfassung

Erhöhung des Fructosamin/Albumin-Quotienten festgestellt werden, der zum Zeitpunkt 3 Monate von einer signifikanten Hyperinsuliämie begleitet war. Die IGF-1-Serum-Konzentration veränderte sich nicht signifikant.

Insgesamt lassen sich der niedrige BMD in der OVXDC-Gruppe in Zusammenhang mit den niedrigen NTX-Werten dieser Gruppe als Mineralisationsstörung und Hinweis auf eine erniedrigte Osteoklastenzahl interpretieren. Letzteres muss durch histologische Untersuchungen bestätigt werden.

Die Induktion einer sekundären Osteoporose - wie in diesem Modell durch Ovariectomie, Calcium/Vitamin D-defizitärer Diät und Glukokortikoiden - zeigt deutlichere Veränderungen im Vergleich zur primären Osteoporose, die alleine durch Ovariectomie dargestellt wurde. Insgesamt zeigte die OVXDC-Gruppe die deutlichsten Veränderungen im Knochenstoffwechsel, die sich auch in den Knochendichtemessungen widerspiegeln. Neben der deutlichen Hypocalcämie und der gesteigerten Phosphatausscheidung im Urin sowie der hochgradigen Hypovitaminose D konnten die Knochenformationsmarker Osteocalcin und BAP einen gestörten Knochenumsatz aufzeigen.

Schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass diese Studie durch die Kombinationsinduktion einer Osteoporose mittels Ovariectomie, defizitärer Diät (Calcium und Vitamin D) und Glukokortikoiden eine Basis für weitere Forschungen wie z.B. dem Einsatz neuartiger Biomaterialien zur Frakturversorgung am Tiermodell Schaf darstellt.

In diesem Modell waren deutliche Veränderungen im Knochenstoffwechsel sowie eine Interaktion zwischen Knochen- und Energiestoffwechsel im Sinne einer transienten Insulinresistenz induzierbar, wobei jedoch die frühesten und ausgeprägtesten Veränderungen in der OVXDC-Gruppe auftraten, was darauf schließen lässt, dass Glukokortikoide beim Schaf einen schnelleren Effekt auf den Knochen- und Energiestoffwechsel haben als eine Ovariectomie und Diät alleine.

Daher ist für präklinische Studien ein Kombinations-Schema inklusive Glukokortikoidgabe empfehlenswert, wobei jedoch die Menge an Methylprednisolon noch anzupassen ist, um starke Nebenwirkungen bei den Schafen zu vermeiden.

7 SUMMARY

The investigations were conducted within the scope of the sub-project T1: "Establishment and Quality Assurance in Osteoporotic Animal Models" of the Collaborative Research Centre/Transregio 79 (2010-2014): "Materials for Tissue Regeneration in Systemically Diseased Bones". The animal experiments were conducted in the Central Research Facility of the Goethe University of Frankfurt. The study was ethically approved by the Darmstadt Regional Council on 27/09/2012 (GE: F31/36). Serum and urine samples that were relevant to this study were analysed at the Faculty of Veterinary Medicine, Clinical Pathophysiology and Clinical Laboratory Diagnostics of the Justus Liebig University Gießen, Germany. The goal of this interdisciplinary research project was to develop new synthetic materials as surrogate for bones and materials for implants for systemically diseased human bones. For the required pre-clinical studies, it is essential to establish an animal model capable to reflect the processes in human bones in a similar way.

The goal of this study was to evaluate the interaction between bone and energy metabolism in a sheep model with induced osteoporosis for which hitherto only scarce knowledge is existent.

The investigation period covered eight months with three different sampling times (0, 3, 8 months). For this, 31 healthy adult female Merino sheep were divided into four groups of comparable age. The median age in the groups ranged from 4.5 - 5.5 years. A non-sham operated group (n=8) served as control. The osteoporosis was induced in three ways: the first group was intended to imitate the osteoporosis in post-menopausal woman. Thus, the first group (n=7) was ovariectomised ("OVX group"). The second group (n=8) received in addition to an ovariectomy a calcium/vitamin D-deficient diet ("OVXD group"), thereby representing a form of secondary osteoporosis. The last group (n=8) received a combination of ovariectomy, deficient diet and glucocorticoids ("OVXDC group", 320 mg/sheep methylprednisolone every 14 days on average), thus also representing a frequent form of secondary osteoporosis. To demonstrate an effect on the bone metabolism, bone density was measured in this study by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) with "abdominal width" as region of interest in which the changes in the lumbar vertebral bodies could be detected. Apart

Summary

from bone density (BMD) and bone mineral content (BMC), the abdominal fat and Z-Score, i.e. the deviation of the BMD in standard deviations from the age-related mean value (here the value of all sheep at time 0), were determined. A Z-Score < -1 is considered to be pathological in human medicine.

The electrolytes calcium, magnesium and phosphate as well as the fractional excretion of phosphate (FEP) in urine and the bone-metabolism influencing hormones vitamin D (25-OH Vitamin D), parathyroid hormone (PTH) and Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) were used as markers of bone metabolism. The bone-specific alkaline phosphatase (BAP) and osteocalcin (intact osteocalcin) served as markers of bone formation. The markers of bone resorption included N-terminal telopeptide of the collagen type 1 (NTX), Cathepsin K and Dickkopf-1 (DKK-1). Serum concentrations of fructosamines, fructosamine/albumin ratio, non-esterified fatty acids (NEFA) and insulin reflected the energy metabolism.

The blood samples were taken from the *Vena jugularis* in the morning in the barn of the Central Research Facility. At this time point, a DXA measurement was also carried out in the anaesthetised sheep and urine samples taken by catheterisation of the sheep. After eight months (i.e., the end of the study), the already anaesthetised sheep were euthanized painlessly with 50 mg/kg sodium pentobarbital given intravenously after the last sampling

The electrolytes calcium and magnesium were determined by means of isoelectric electrodes with a Nova CRT8 analyser (Nova). The automatic analyser Pentra 400 ABX (Horiba) was used to measure the phosphate, albumin and fructosamine concentrations as well as the NEFAs. The other analyses were conducted with commercially available enzyme immunoassays (EIA/ELISA) which were human test kits with unknown cross reactivity for the sheep in the case of vitamin D, PTH, Cathepsin-K, DKK-1, and IGF-1.

During the course of the study, it could be shown that the human tests for PTH, Cathepsin-K and DKK-1 cannot be used for sheeps due to inadequate cross reactivity.

Summary

The physical examination showed significant cushingoid side effects in the sheep in the OVXDC group and 1/8 sheeps had to be euthanized 14 days before the end of the experiment due to a pathological comminuted fracture.

After three months, the induction of osteoporosis resulted in a significant decrease in bone density (BMD) and bone mineral content (BMC) in the OVXDC group. The median values also dropped in the OVXD group, but this change was not significant. At the time points three and eight months, there was a Z-Score of -3.3 and -4.9 standard deviations respectively in the sheeps of the OVXDC group. In the OVX and OVXD groups, the Z-Scores at eight months were -0.29 and -0.96 respectively, and thus interpretable as age-related. There was a significant increase in DXA-detectable abdominal fat in all groups over time. The OVXDC group had the highest median at eight months, but this difference was not statistically significant.

Overall, the markers of the bone and energy metabolism showed the earliest changes at the time point three months in the OVXDC group and only later in the OVXD group. After three months, there was a significant decline in the serum calcium concentration in the OVXDC group. The OVXD group demonstrated a significant hyperphosphatemia at this point of time. A considerably higher FEP was detectable in both groups, although the result was only significant for the OVXDC group. The OVXDC group demonstrated a significant increase in osteocalcin serum concentration, accompanied by a significant decline in NTX concentration, at the time point eight months. Administration of a deficient diet led at time point three months to a significant decline in the vitamin D serum concentration in the OVXDC group, and to a lesser extent also in the OVXD group. In the OVXDC group, this remained significant until time point eight months, although the values at both points in time were close to 0. A significant increase in the fructosamine/albumin quotient was seen in the OVXDC group at time points three and eight months, which was accompanied by a significant hyperinsulinaemia at time point three months. The IGF-1 serum concentration did not change significantly.

Generally, the low BMD in the OVXDC group in combination with the low NTX values in this group can be interpreted as mineralisation disorder and are indicative of a low number of osteoclasts. The latter has to be confirmed with histological examinations.

Summary

The induction of a secondary osteoporosis - as in this model performed through ovariectomy and a diet deficient in calcium/vitamin D and glucocorticoids - shows clearer changes compared to primary osteoporosis induced solely by ovariectomy. Generally, the OVXDC group showed the severest changes in bone metabolism as also reflected by the bone density measurements. Apart from the marked hypocalcaemia and increased excretion of phosphate in urine as well as the severe hypovitaminosis D, the bone formation markers osteocalcin and BAP indicated impaired bone turnover.

Overall, it can be concluded that osteoporosis in the sheep can be induced by a combination of ovariectomy, deficient diet (calcium and vitamin D) and glucocorticoids, so that the study is a useful basis for further research, e.g. use of novel biomaterials for fracture treatment in a sheep animal model.

In this model, it was possible to induce significant abnormalities of the bone metabolism and the interaction between bone and energy metabolism consistent with a transient insulin resistance, whereby the earliest and most severe changes occurred in the OVXDC group, which suggests that glucocorticoids have a quicker effect on bone and energy metabolism in sheep than an ovariectomy and diet alone.

A combined scheme including glucocorticoids is therefore recommendable for pre-clinical studies, although the dosage of methylprednisolone still needs to be adjusted to avoid strong clinical side effects in the sheep.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ADLER, R. A. (2010): Glucocorticoid-induced osteoporosis: management update. *Current Osteoporosis Reports* 8 (1), 10–14.
- AHMED, L.; JOAKIMSEN, R.; BERNTSEN, G.; FØNNEBØ, V.; SCHIRMER, H. (2006): Diabetes mellitus and the risk of non-vertebral fractures: The Tromsø study. *Osteoporosis International* 17 (4), 495–500.
- ALAGÖL, F.; SHIHADDEH, Y.; BOZTEPE, H.; TANAKOL, R.; YARMAN, S.; AZIZLERLI, H.; SANDALCI, Ö. (2000): Sunlight exposure and vitamin D deficiency in Turkish women. *Journal of Endocrinological Investigation* 23 (3), 173–177.
- ALLEN, M. J. (2003): Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Veterinary Clinical Pathology* 32 (3), 101–113.
- ANDERSON, P. H.; IIDA, S.; TYSON, J. H. T.; TURNER, A. G.; MORRIS, H. A. (2010): Bone CYP27B1 gene expression is increased with high dietary calcium and in mineralising osteoblasts. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 121 (1-2), 71–75.
- ANDREASEN, C. M.; DING, M.; OVERGAARD, S.; BOLLEN, P.; ANDERSEN, T. L. (2015): A reversal phase arrest uncoupling the bone formation and resorption contributes to the bone loss in glucocorticoid treated ovariectomised aged sheep. *Bone* 75, 32–39.
- ANDREOLI, A.; SCALZO, G.; MASALA, S.; TARANTINO, U.; GUGLIELMI, G. (2009): Body composition assessment by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). *La Radiologia medica* 114 (2), 286–300.
- ARDAWI, M.-S. M.; AKHBAR, D. H.; ALSHAIKH, A.; AHMED, M. M.; QARI, M. H.; ROUZI, A. A. et al. (2013): Increased serum sclerostin and decreased serum IGF-1 are associated with vertebral fractures among postmenopausal women with type-2 diabetes. *Bone* 56 (2), 355–362.
- ARENS, D.; SIGRIST, I.; ALINI, M.; SCHAWALDER, P.; SCHNEIDER, E.; EGERMANN, M. (2007): Seasonal changes in bone metabolism in sheep. *The Veterinary Journal* 174 (3), 585–591.
- ATKINS, G. J.; ANDERSON, P. H.; FINDLAY, D. M.; WELLDON, K. J.; VINCENT, C.; ZANNETTINO, A. C. W. et al. (2007): Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: evidence for autocrine and paracrine activities of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3. *Bone* 40 (6), 1517–1528.

- AUGAT, P.; SCHORLEMMER, S.; GOHL, C.; IWABU, S.; IGNATIUS, A.; CLAES, L. (2003): Glucocorticoid-treated sheep as a model for osteopenic trabecular bone in biomaterials research. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 66A (3), 457–462.
- BAIM, S.; MILLER, P. D. (2009): Perspective: Assessing the clinical utility of serum CTX in postmenopausal osteoporosis and its use in predicting risk of osteonecrosis of the jaw. *Journal of Bone and Mineral Research* 24 (4), 561–574.
- BALDOCK, P. A.; THOMAS, G. P.; HODGE, J. M.; BAKER, S. U. K.; DRESSEL, U.; O'LOUGHLIN, P. D. et al. (2006): Vitamin D action and regulation of bone remodeling: suppression of osteoclastogenesis by the mature osteoblast. *Journal of Bone and Mineral Research* 21 (10), 1618–1626.
- BALLANTI, P.; MINISOLA, S.; PACITTI, M. T.; SCARNECCHIA, L.; ROSSO, R.; MAZZUOLI, G. F.; BONUCCI, E. (1997): Tartrate-resistant acid phosphate activity as osteoclastic marker: Sensitivity of cytochemical assessment and serum assay in comparison with standardized osteoclast histomorphometry. *Osteoporosis International* 7 (1), 39–43.
- BARKHEM, T.; CARLSSON, B.; NILSSON, Y.; ENMARK, E.; GUSTAFSSON, J.-Å.; NILSSON, S. (1998): Differential response of estrogen receptor α and estrogen receptor β to partial estrogen agonists/antagonists. *Molecular Pharmacology* 54 (1), 105–112.
- BARTL, R.; GRADINGER, R. (2009): Aktuelle Diagnostik und Therapie der Osteoporose auf der Basis der „European Guidance 2008“. *Orthopäde* 38 (4), 365–380.
- BATEMAN, S. (2012): Disorders of magnesium: Magnesium deficit and excess. In: Stephen P. DiBartola (Hg.): *Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice. Disorders of calcium: Hypercalcemia and hypocalcemia*. 4th ed. Saunders/Elsevier, St. Louis, Mo.
- BAUER, N. B.; KHASSAWNA, T. E.; GOLDMANN, F.; STIRN, M.; LEDIEU, D.; SCHLEWITZ, G. et al. (2015): Characterization of bone turnover and energy metabolism in a rat model of primary and secondary osteoporosis. *Experimental and Toxicologic Pathology* 67 (4), 287–296.
- BELLAHCÈNE, A.; CASTRONOVO, V. (1997): Expression of bone matrix proteins in human breast cancer: potential roles in microcalcification formation and in the genesis of bone metastases. *Bulletin du Cancer* 84 (1), 17–24.

Literaturverzeichnis

- BERTRAM, C. E.; HANSON, M. A. (2001): Animal models and programming of the metabolic syndrome Type 2 diabetes. *British Medical Bulletin* 60 (1), 103–121.
- BIANCO, P.; FISHER, L.; YOUNG, M.; TERMINE, J.; ROBEY, P. (1991): Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcified Tissue International* 49 (6), 421–426.
- BIEGLMAYER, C.; DIMAI, H. P.; GASSER, R. W.; KUDLACEK, S.; OBERMAYER-PIETSCH, B.; WOLOSZCZUK, W. et al. (2012): Biomarkers of bone turnover in diagnosis and therapy of osteoporosis. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 162 (21-22), 464–477.
- BILEZIKIAN; J. P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. (Hg.) (2002): Principles of bone biology. 2nd ed. Academic Press, San Diego.
- BINKLEY, N.; DREZNER, M. K.; HOLLIS, B. W. (2006): Laboratory reporting of 25-hydroxyvitamin D results: potential for clinical misinterpretation. *Clinical Chemistry* 52 (11), 2124–2125.
- BINKLEY, N.; KIEBZAK, G. M.; LEWIECKI, E. M.; KRUEGER, D.; GANGNON, R. E.; MILLER, P. D. et al. (2005): Recalculation of the NHANES database SD improves T-Score agreement and reduces osteoporosis prevalence. *Journal of Bone and Mineral Research* 20 (2), 195–201.
- BLEIBLER, F.; BENZINGER, P.; LEHNERT, T.; BECKER, C.; KÖNIG, H.-H. (2014): Frakturkosten im deutschen Krankenhaussektor-Welche Rolle spielt die Osteoporose? *Gesundheitswesen (Bundesverband der Ärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (Germany))* 76 (3), 163–168.
- BLÜHER, M.; KRATZSCH, J.; PASCHKE, R. (2001): Plasma levels of tumor necrosis factor- α , angiotensin II, growth hormone, and IGF-I are not elevated in insulin-resistant obese individuals with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 24 (2), 328–334.
- BODEN, G.; SHULMAN, G. I. (2002): Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction. *European Journal of Clinical Investigation* 32 (s3), 14–23.
- BOISCLAIR, Y. R.; RHOADS, R. P.; UEKI, I.; WANG, J.; OOI, G. T. (2001): The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system. *Journal of Endocrinology* 170 (1), 63–70.

Literaturverzeichnis

- BONEWALD, L. F.; MUNDY, G. R. (1990): Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (250), 261–276.
- BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. (2003): Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423 (6937), 337–342.
- BRAIDMAN, I.; BARIS, C.; WOOD, L.; SELBY, P.; ADAMS, J.; FREEMONT, A.; HOYLAND, J. (2000): Preliminary evidence for impaired estrogen receptor- α protein expression in osteoblasts and osteocytes from men with idiopathic osteoporosis. *Bone* 26 (5), 423–427.
- BRAUN, J.; PFEILSCHIFTER, J. (2010): Leitliniengerechte Diagnostik und Therapie der Osteoporose 2010. *Zeitschrift für Rheumatologie* 69 (4), 327–339.
- BRODSKY, B.; PERSIKOV, A. V. (2005): Molecular structure of the collagen triple helix. *Advances in Protein Chemistry* 70, 301–339.
- BRONNER, F. (1994): Calcium and osteoporosis. *The American Journal of Clinical Nutrition* 60 (6), 831–836.
- CAETANO-LOPES, J.; CANHÃO, H.; FONSECA, J. E. (2007): Osteoblasts and bone formation. *Acta reumatológica portuguesa* 32 (2), 103–110.
- CANALIS, E.; MCCARTHY, T.; CENTRELLA, M. (1988): Growth factors and the regulation of bone remodeling. *The Journal of Clinical Investigation* 81 (2), 277–281.
- CAPLAN, A. I. (1991): Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 9 (5), 641–650.
- CARMINA, E.; BUCCHIERI, S.; ESPOSITO, A.; DEL PUENTE, A.; MANSUETO, P.; ORIO, F. et al. (2007): Abdominal fat quantity and distribution in women with polycystic ovary syndrome and extent of its relation to insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92 (7), 2500–2505.
- ÇELIKER, R.; ARSLAN, S. (2000): Comparison of serum insulin-like growth factor-1 and growth hormone levels in osteoporotic and non-osteoporotic postmenopausal women. *Rheumatology International* 19 (6), 205–208.
- CHANG, I.-C.; CHIANG, T.-I.; YEH, K.-T.; LEE, H.; CHENG, Y.-W. (2010): Increased serum osteopontin is a risk factor for osteoporosis in menopausal women. *Osteoporosis International* 21 (8), 1401–1409.

Literaturverzeichnis

- CHANG-QUAN, H.; BI-RONG, D.; PING, H.; ZHEN-CHAN, L.; XIAO-DONG, P. (2008): Insulin resistance, renal injury, renal 1-alpha hydroxylase, and bone homeostasis in aged obese rats. *Archives of Medical Research* 39 (4), 380–387.
- CHAPURLAT, R.; GARNERO, P.; BRÁRT, G.; MEUNIER, P.; DELMAS, P. (2000): Serum type I collagen breakdown product (serum CTX) predicts hip fracture risk in elderly women. *Bone* 27 (2), 283–286.
- CHAVASSIEUX, P.; PASTOUREAU, P.; CHAPUY, M. C.; DELMAS, P.; MEUNIER, P. J. (1993): Glucocorticoid-induced inhibition of osteoblastic bone formation in ewes: a biochemical and histomorphometric study. *Osteoporosis International* 3 (2), 97–102.
- CHESNEY, R.; HAMSTRA, A.; MAZESS, R.; DELUCA, H.; O'REAGAN, S. (1978): Reduction of serum-1,25-Dihydroxyvitamin-D3 in children receiving glucocorticoids. *The Lancet* 312 (8100), 1123–1125.
- CHOPIN, F.; BIVER, E.; FUNCK-BRENTANO, T.; BOUVARD, B.; COIFFIER, G.; GARNERO, P.; THOMAS, T. (2012): Prognostic interest of bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis. *Joint Bone Spine* 79 (1), 26–31.
- CHRISTGAU, S. (2000): Circadian variation in serum CrossLaps concentration is reduced in fasting individuals. *Clinical Chemistry* 46 (3), 431.
- CITIL, M.; UZLU, E.; KARAPEHLIVAN, M.; YAPAR, K. (2009): Effect of single dose dexamethasone administration on metabolism related parameters in lactating fat tailed sheep. *Acta Veterinaria* 59 (2-3), 147–156.
- CLARKE, B. (2008): Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 3 Suppl 3, S131-9.
- CLEMENS, T. L.; KARSENTY, G. (2011): The osteoblast: An insulin target cell controlling glucose homeostasis. *Journal of Bone and Mineral Research* 26 (4), 677–680.
- CLEMMONS, D. R. (2011): Consensus Statement on the Standardization and Evaluation of Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor Assays. *Clinical Chemistry* 57 (4), 555–559.
- CLEVERS, H. (2006): Wnt/ β -Catenin signaling in development and disease. *Cell* 127 (3), 469–480.

Literaturverzeichnis

- CLORE, J. N.; THURBY-HAY, L. (2009): Glucocorticoid-induced hyperglycemia. *Endocrine Practice: Official Journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* 15 (5), 469–474.
- COE, F., L., FAVUS, M., J. (Hg.) (1992): Disorders of bone and mineral metabolism: Intestinal absorption of calcium, magnesium and phosphorus. Raven Press, New York.
- COHEN, M. M. (2006): The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 140 (23), 2646–2706.
- COHICK; W., S.; CLEMMONS, D. R. (1993): The insulin-like growth factors. *Annual Review of Physiology* 55, 131–153.
- COMPSTON, J. (2009): Clinical and therapeutic aspects of osteoporosis. *European Journal of Radiology* 71 (3), 388–391.
- COOPER, C. (1997): The crippling consequences of fractures and their impact on quality of life. *The American Journal of Medicine* 103 (2), S12-S19.
- COOPER, C. (2010): Osteoporosis: disease severity and consequent fracture management. *Osteoporosis International* 21 (2), 425–429.
- COSTA, A. G.; WYMAN, A.; SIRIS, E. S.; WATTS, N. B.; SILVERMAN, S.; SAAG, K. G. et al. (2013): When, Where and How Osteoporosis-Associated Fractures Occur: An Analysis from the Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women (GLOW). *PLOS ONE* 8 (12), e83306.
- DACHVERBAND OSTEOLOGIE e.V. (2014): DVO- Leitlinie 2014 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen.
- DAOUSSIS, D.; ANDONOPOULOS, A. P. (2011): The emerging role of Dickkopf-1 in bone biology: is it the main switch controlling bone and joint remodeling? *Seminars in arthritis and rheumatism* 41 (2), 170–177.
- DATTA, N. S.; ABOU-SAMRA, A. B. (2009): PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cellular Signalling* 21 (8), 1245–1254.
- DELAISSÉ, J.-M.; ANDERSEN, T. L.; ENGSIG, M. T.; HENRIKSEN, K.; TROEN, T.; BLAVIER, L. (2003): Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microscopy Research and Technique* 61 (6), 504–513.

Literaturverzeichnis

- DELANY, A. M.; AMLING, M.; PRIEMEL, M.; HOWE, C.; BARON, R.; CANALIS, E. (2000): Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation* 105 (7), 915.
- DELANY, A. M.; DURANT, D.; CANALIS, E. (2001): Glucocorticoid suppression of IGF I transcription in osteoblasts. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 15 (10), 1781–1789.
- DELMAS, P. D.; SCHLEMMER, A.; GINEYTS, E.; RIIS, B.; CHRISTIANSEN, C. (1991): Urinary excretion of pyridinoline crosslinks correlates with bone turnover measured on iliac crest biopsy in patients with vertebral osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 6 (6), 639–644.
- DENNISON, E. M.; COMPSTON, J. E.; FLAHERTY, J.; SIRIS, E. S.; GEHLBACH, S. H.; ADACHI, J. D. et al. (2012): Effect of co-morbidities on fracture risk: findings from the Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women (GLOW). *Bone* 50 (6), 1288–1293.
- DIAS, I. R.; VIEGAS, C. A.; AZEVEDO, J. T. d.; COSTA, E. M.; LOURENÇO, P.; RODRIGUES, A.; CABRITA, A. S. (2008): Assessment of markers of bone formation under controlled environmental factors and their correlation with serum minerals in adult sheep as a model for orthopaedic research. *Laboratory Animals* 42 (4), 465–472.
- DIBARTOLA, S., P. (Hg.) (2012): Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice. Disorders of Calcium: Hypercalcemia and hypocalcemia. 4th ed. Saunders/Elsevier, St. Louis, Mo.
- DING, M.; CHENG, L.; BOLLEN, P.; SCHWARZ, P.; OVERGAARD, S. (2010): Glucocorticoid induced osteopenia in cancellous bone of sheep: validation of large animal model for spine fusion and biomaterial research. *Spine* 35 (4), 363–370.
- DODDS, R. A.; EMERY, R.; KLENERMAN, L.; CHAYEN, J.; BITENSKY, L. (1989): Comparative metabolic enzymatic activity in trabecular as against cortical osteoblasts. *Bone* 10 (4), 251–254.
- DUCY, P.; AMLING, M.; TAKEDA, S.; PRIEMEL, M.; SCHILLING, A. F.; BEIL, F. T. et al. (2000): Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: A central control of bone mass. *Cell* 100 (2), 197–207.
- DUQUE, G.; TROEN, B. R. (2008): Understanding the mechanisms of senile osteoporosis: new facts for a major geriatric syndrome. *Journal of the American Geriatrics Society* 56 (5), 935–941.

Literaturverzeichnis

- EGERMANN, M.; GOLDHAHN, J.; HOLZ, R.; SCHNEIDER, E.; LILL, C. A. (2008): A sheep model for fracture treatment in osteoporosis: benefits of the model versus animal welfare. *Laboratory Animals* 42 (4), 453–464.
- EGHBALI-FATOURECHI, G.; KHOSLA, S.; SANYAL, A.; BOYLE, W. J.; LACEY, D. L.; RIGGS, B. L. (2003): Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *Journal of Clinical Investigation* 111 (8), 1221–1230.
- EL KHASSAWNA, T.; BÖCKER, W.; GOVINDARAJAN, P.; SCHLIEFKE, N.; HÜRTER, B.; KAMPSCHULTE, M. et al. (2013): Effects of multi-deficiencies-diet on bone parameters of peripheral bone in ovariectomized mature rat. *PloS One* 8 (8), e71665.
- ELEFTERIOU, F.; AHN, J. D.; TAKEDA, S.; STARBUCK, M.; YANG, X.; LIU, X. et al. (2005): Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 434 (7032), 514–520.
- ERNST, M.; HEATH, J. K.; RODAN, G. A. (1989): Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-I, and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. *Endocrinology* 125 (2), 825–833.
- ETUK, E. U. (2010): Animals models for studying diabetes mellitus. *Agriculture and Biology Journal of North America* 1 (2), 130–134.
- FASSHAUER, M.; PASCHKE, R. (2003): Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia* 46 (12), 1594–1603.
- FERNANDEZ-TRESGUERRES HERNANDEZ-GIL, I.; ALOBERA-GRACIA, M. A.; DEL-CANTO-PINGARRON, M.; BLANCO-JEREZ, L. (2006): Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* 11 (2), 151-157.
- FERRON, M.; HINOI, E.; KARSENTY, G.; DUCY, P. (2008): Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (13), 5266–5270.
- FERRON, M.; WEI, J.; YOSHIZAWA, T.; DEL FATTORE, A.; DEPINHO, R. A.; TETI, A. et al. (2010): Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 142 (2), 296–308.

Literaturverzeichnis

- FISHER, L. W.; WHITSON, S. W.; AVIOLI, L. V.; TERMINE, J. D. (1983): Matrix sialoprotein of developing bone. *Journal of Biological Chemistry* 258 (20), 12723–12727.
- FORTUNE, C. L.; FARRUGIA, W.; TRESHAM, J.; SCOGGINS, B. A.; WARK, J. D. (1989): Hormonal regulation of osteocalcin plasma production and clearance in sheep. *Endocrinology* 124 (6), 2785–2790.
- FRIEDRICHS, K. R.; HARR, K. E.; FREEMAN, K. P.; SZLADOVITS, B.; WALTON, R. M.; BARNHART, K. F.; BLANCO-CHAVEZ, J. (2012): ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology* 41 (4), 441–453.
- FROLIK, C. A.; BLACK, E. C.; CAIN, R. L.; SATTERWHITE, J. H.; BROWN-AUGSBURGER, P. L.; SATO, M.; HOCK, J. M. (2003): Anabolic and catabolic bone effects of human parathyroid hormone (1-34) are predicted by duration of hormone exposure. *Bone* 33 (3), 372–379.
- FULZELE, K.; RIDDLE, R. C.; DIGIROLAMO, D. J.; CAO, X.; WAN, C.; CHEN, D. et al. (2010): Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell* 142 (2), 309–319.
- GANNAGÉ-YARED, M.; CHEMALI, R.; YAACOUB, N.; HALABY, G. (2000): Hypovitaminosis D in a sunny country: Relation to lifestyle and bone markers. *Journal of Bone and Mineral Research* 15 (9), 1856–1862.
- GARNERO, P.; CLOOS, P.; SORNAY-RENDU, E.; QVIST, P.; DELMAS, P. D. (2002): Type I collagen racemization and isomerization and the risk of fracture in postmenopausal women: The OFELY prospective study. *Journal of Bone and Mineral Research* 17 (5), 826–833.
- GARNERO, P.; DELMAS, P. (1993): Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 77 (4), 1046–1053.
- GARNERO, P.; SORNAY-RENDU, E.; CHAPUY, M. C.; DELMAS, P. (1996a): Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 11 (3), 337–349.
- GARNERO, P.; SORNAY-RENDU, E.; DELMAS, P. D. (2000): Low serum IGF-1 and occurrence of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *The Lancet* 355 (9207), 898–899.

Literaturverzeichnis

- GARNERO, P.; SORNAY-RENDU, E.; CHAPUY, M.; DELMAS, P. D. (1996): Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 11 (3), 337–349.
- GARNERO, P.; VERGNAUD, P.; HOYLE, N. (2008): Evaluation of a fully automated serum assay for total N-terminal propeptide of type I collagen in postmenopausal osteoporosis. *Clinical Chemistry* 54 (1), 188–196.
- GATFORD, K. L.; OWENS, J. A.; LI, S.; Moss, Timothy J. M.; NEWNHAM, J. P.; Challis, John R. G.; SLOBODA, D. M. (2008): Repeated betamethasone treatment of pregnant sheep programs persistent reductions in circulating IGF-I and IGF-binding proteins in progeny. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 295 (1), E170-E178.
- GEFFRÉ, A.; CONCORDET, D.; BRAUN, J.-P.; TRUMEL, C. (2011): Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Veterinary Clinical Pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology* 40 (1), 107–112.
- GELB, B. D.; SHI, G.-P.; CHAPMAN, H. A.; DESNICK, R. J. (1996): Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* 273 (5279), 1236–1238.
- GERRITS, M. I.; THIJSEN, J. H.; VAN RIJN, H. J. (1995): Determination of pyridinoline and deoxypyridinoline in urine, with special attention to retaining their stability. *Clinical Chemistry* 41 (4), 571–574.
- GIANNINI, S.; NOBILE, M.; SELLA, S.; DALLE CARBONARE, L. (2005): Bone disease in primary hypercalciuria. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 42 (3), 229–248.
- GIMBLE, J. M.; NUTTALL, M. E. (2012): The relationship between adipose tissue and bone metabolism. *Clinical Biochemistry* 45 (12), 874–879.
- GIMBLE, J. M.; ZVONIC, S.; FLOYD, Z. E.; KASSEM, M.; NUTTALL, M. E. (2006): Playing with bone and fat. *Journal of Cellular Biochemistry* 98 (2), 251–266.
- GIUSTINA, A.; MAZZIOTTI, G.; CANALIS, E. (2008): Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factors, and the Skeleton. *Endocrine Reviews* 29 (5), 535–559.
- GOLDHAHN, J.; JENET, A.; SCHNEIDER, E.; LILL, C. A.; CHRISTOPH, A. L. (2005): Slow rebound of cancellous bone after mainly steroid-induced osteoporosis in ovariectomized sheep. *Journal of Orthopaedic Trauma* 19 (1), 23–28.

Literaturverzeichnis

- GONCIULEA, A.; BEUR, S. J. de (2015): The dynamic skeleton. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*.
- GRANT, F. D.; CONLIN, P. R.; BROWN, E. M. (1990): Rate and concentration dependence of parathyroid hormone dynamics during stepwise changes in serum ionized calcium in normal humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 71 (2), 370–378.
- GUGLIELMI, G.; MUSCARELLA, S.; BAZZOCCHI, A. (2011): Integrated imaging approach to osteoporosis: state-of-the-art review and update. *Radiographics: a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 31 (5), 1343–1364.
- GUIDANCE FOR INDUSTRY – BIONALYTICAL METHOD VALIDATION (2001) U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM)
- HAASTERS, F.; PRALL, W. C.; HIMMLER, M.; POLZER, H.; SCHIEKER, M.; MUTSCHLER, W. (2015): Prävalenz und Management der Osteoporose in der Unfallchirurgie. *Unfallchirurg* 118 (2), 138–145.
- HABENER, J. F.; POTTS, J. T., JR (1978): Biosynthesis of parathyroid hormone (first of two parts). *The New England Journal of Medicine* 299 (11), 580–585.
- HADJI, P.; KLEIN, S.; GOTHE, H.; HÄUSSLER, B.; KLESS, T.; SCHMIDT, T. et al. (2013): The Epidemiology of Osteoporosis—Bone Evaluation Study (BEST): An Analysis of Routine Health Insurance Data. *Deutsches Ärzteblatt International* 110 (4), 52.
- HAHN, T. J.; HALSTEAD, L. R.; BARAN, D. T. (1981): Effects off short term glucocorticoid administration on intestinal calcium absorption and circulating vitamin D metabolite concentrations in man. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 52 (1), 111–115.
- HALL, J. E.; GUYTON, A. C. (2010): *Textbook of medical physiology*. Chapter 79: Parathyroid Hormone, Calcitonin, Calcium and Phopsphate Metabolism, Vitamin D, Bone, and Theeth. 12th ed., Philadelphia, Pa., London. Saunders.
- HALLEEN, J. M.; ALATALO, S. L.; JANCKILA, A. J.; WOITGE, H. W.; SEIBEL, M. J.; VÄÄNÄNEN, H. K. (2001): Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b Is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Clinical Chemistry* 47 (3), 597–600.

Literaturverzeichnis

- HAMANN, C.; KIRSCHNER, S.; GÜNTHER, K.-P.; HOFBAUER, L. C. (2012): Bone, sweet bone—osteoporotic fractures in diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology* 8 (5), 297–305.
- HANNON, R. A.; CLOWES, J. A.; EAGLETON, A. C.; AL HADARI, A.; EASTELL, R.; BLUMSOHN, A. (2004): Clinical performance of immunoreactive tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as a marker of bone resorption. *Bone* 34 (1), 187–194.
- HARRIS, H. (1990): The human alkaline phosphatases. *Clinica Chimica Acta* 186 (2), 133–150.
- HASAN, M.; SHAARAWY, M. (2001): Serum bone sialoprotein. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 61 (7), 513–521.
- HASSAGER, C.; RISTELI, J.; RISTELI, L.; CHRISTIANSEN, C. (1994): Effect of the menopause and hormone replacement therapy on the carboxy-terminal pyridinoline cross-linked telopeptide of type I collagen. *Osteoporosis International* 4 (6), 349–352.
- HAUSCHKA, P. V.; LIAN, J. B.; COLE, D. E.; GUNDBERG, C. M. (1989): Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological Reviews* 69 (3), 990–1047.
- HÄUSSLER, B.; GOTHE, H.; GÖL, D.; GLAESKE, G.; PIENKA, L.; FELSENBURG, D. (2007): Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany—the BoneEVA Study. *Osteoporosis International* 18 (1), 77–84.
- HAYES, C. E.; NASHOLD, F. E.; SPACH, K. M.; PEDERSEN, L. B. (2003): The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)* 49 (2), 277–300.
- HERRMANN, W.; QUAST, S.; HAGENBOURGER, O.; LAURER, H.; MARZI, I. (1998): The role of bone alkaline phosphatase (BAP) as diagnostic marker of fracture repair. *Clinical Laboratory* 44 (11), 855–858.
- HIDIROGLOU, M.; KARPINSKI, K. (1989): Providing vitamin D to confined sheep by oral supplementation vs ultraviolet irradiation. *Journal of Animal Science* 67 (3), 794–802.
- HILL, P. A.; REYNOLDS, J. J.; MEIKLE, M. C. (1995): Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and -II stimulation of osteoclast formation and function. *Endocrinology* 136 (1), 124–131.

Literaturverzeichnis

- HLAING, T. T.; COMPSTON, J. E. (2014): Biochemical markers of bone turnover – uses and limitations. *Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry and laboratory medicine* 51 (2), 189–202.
- HOFBAUER, L. C.; BRUECK, C. C.; SINGH, S. K.; DOBNIG, H. (2007): Osteoporosis in patients with diabetes mellitus. *Journal of Bone and Mineral Research* 22 (9), 1317–1328.
- HOFBAUER, L. C.; KHOSLA, S.; DUNSTAN, C. R.; LACEY, D. L.; SPELSBERG, T. C.; RIGGS, B. L. (1999): Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 140 (9), 4367–4370.
- HOW, K. L.; HAZEWINDEL, H. A.; MOL, J. A. (1994): Dietary vitamin D dependence of cat and dog due to inadequate cutaneous synthesis of vitamin D. *General and Comparative Endocrinology* 96 (1), 12–18.
- HUANG, C. Q.; MA, G. Z.; TAO, M. D.; MA, X. L.; LIU, Q. X.; FENG, J. (2009): The relationship among renal injury, changed activity of renal 1- α hydroxylase and bone loss in elderly rats with insulin resistance or Type 2 diabetes mellitus. *Journal of Endocrinological Investigation* 32 (3), 196–201.
- HWANG, Y.-C.; JEONG, I.-K.; AHN, K. J.; CHUNG, H. Y. (2009): The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced beta-cell function in middle-aged male subjects. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 25 (8), 768–772.
- IKI, M.; MORITA, A.; IKEDA, Y.; SATO, Y.; AKIBA, T.; MATSUMOTO, T. et al. (2006): Biochemical markers of bone turnover predict bone loss in perimenopausal women but not in postmenopausal women-the Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Cohort Study. *Osteoporosis International* 17 (7), 1086–1095.
- JEHLE, P. M.; JEHL, P.; MOHAN, S.; BOHM, B. O. (1998): Serum levels of insulin-like growth factor system components and relationship to bone metabolism in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus patients. *Journal of Endocrinology* 159 (2), 297–306.
- JOHNELL, O.; KANIS, J. A. (2006): An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporosis International* 17 (12), 1726–1733.
- JOHNELL, O.; KANIS, J. A.; ODÉN, A.; SERNBO, I.; REDLUND-JOHNELL, I.; PETTERSON, C. et al. (2004): Mortality after osteoporotic fractures. *Osteoporosis International* 15 (1), 38–42.

Literaturverzeichnis

- JONES, G. (2008): Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition* 88 (2), 582S-586S.
- JORRITSMA; R.; THANASAK, J.; HOUWELING, M.; NOORDHUIZEN, J. P.; MÜLLER, K. E. (2004): Effects of a single dose of dexamethasone-21-isonicotinate on the metabolism of heifers in early lactation. *The Veterinary Record* 155 (17), 521–523.
- JUX, C.; LEIBER, K.; HÜGEL, U.; BLUM, W.; OHLSSON, C.; KLAUS, G.; MEHLS, O. (1998): Dexamethasone impairs growth hormone (GH)-stimulated growth by suppression of local insulin-like growth factor (IGF)-I production and expression of GH- and IGF-I-receptor in cultured rat chondrocytes. *Endocrinology* 139 (7), 3296–3305.
- KAAJA, R. J. (2008): Metabolic syndrome and the menopause. *Menopause International* 14 (1), 21–25.
- KAHN, B.; FLIER, J. (2000): Obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 106 (4), 473.
- KANAZAWA, I.; YAMAGUCHI, T.; YAMAUCHI, M.; YAMAMOTO, M.; KURIOKA, S.; YANO, S.; SUGIMOTO, T. (2011): Serum undercarboxylated osteocalcin was inversely associated with plasma glucose level and fat mass in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporosis International* 22 (1), 187–194.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. (2008): Clinical biochemistry of domestic animals. Rosol TJ.; Capen CC: Calcium - regulating hormones and diseases of abnormal mineral (calcium, phosphorus, magnesium) metabolism. 6th ed., Amsterdam, Boston. Elsevier/Academic Press.
- KASSEM, M.; OKAZAKI, R.; HARRIS, S. A.; SPELSBERG, T. C.; CONOVER, C. A.; RIGGS, B. L. (1998): Estrogen effects on insulin-like growth factor gene expression in a human osteoblastic cell line with high levels of estrogen receptor. *Calcified Tissue International* 62 (1), 60–66.
- KAWAMOTO, M.; KANEKO, J. J.; HEUSNER, A. A.; FELDMAN, E. C.; KOIZUMI, I. (1992): Relation of fructosamine to serum protein, albumin, and glucose concentrations in healthy and diabetic dogs. *American Journal of Veterinary Research* 53 (5), 851–855.
- KENNEDY, O. D.; BRENNAN, O.; MAHONY, N. J.; RACKARD, S. M.; O'BRIEN, F. J.; TAYLOR, D.; LEE, C. T. (2008): Effects of high bone turnover on the biomechanical properties of the L3 vertebra in an ovine model of early stage osteoporosis. *Spine* 33 (23), 2518–2523.

- KHOSLA, S. (2001): Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology* 142 (12), 5050–5055.
- KHOSLA, S.; LUFKIN, E. G.; HODGSON, S. F.; FITZPATRICK, L. A.; MELTON, L. J. (1994): Epidemiology and clinical features of osteoporosis in young individuals. *Bone* 15 (5), 551–555.
- KIEŁBOWICZ, Z.; PIĄTEK, A.; BIEŻYŃSKI, J.; SKRZYPCZAK, P.; CHMIELEWSKA, E.; KAFARSKI, P.; KURYSZKO, J. (2015): Improvement of Large Animal Model for Studying Osteoporosis. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 59 (1), 123–128.
- KIM, J. G.; SHIN S.C.; CHOI, Y. M.; MOON, S. Y.; KIM, S. Y.; 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. *Clinical Endocrinology* 51 (3), 301–307.
- KINDBLOM, J. M.; OHLSSON, C.; LJUNGGREN, O.; KARLSSON, M. K.; TIVESTEN, A.; SMITH, U.; MELLSTRÖM, D. (2009): Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *Journal of Bone and Mineral Research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 24 (5), 785–791.
- KINI, U.; NANDEESH, B. N. (2012): Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*. Springer-Verlag Berlin.
- KLEIN, R. G.; ARNAUD, S. B.; GALLAGHER, J. C.; DELUCA, H. F.; RIGGS, B. L. (1977): Intestinal calcium absorption in exogenous hypercortisonism. Role of 25-hydroxyvitamin D and corticosteroid dose. *The Journal of Clinical Investigation* 60 (1), 253–259.
- KLOPFENSTEIN BREGGER, M. D.; SCHAWALDER, P.; RAHN, B.; ECKHARDT, C.; SCHNEIDER, E.; LILL, C. (2007): Optimization of corticosteroid induced osteoporosis in ovariectomized sheep - A bone histomorphometric study. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 20 (1), 18–23.
- KOBAYASHI, S.; TAKAHASHI, H. E.; ITO, A.; SAITO, N.; NAWATA, M.; HORIUCHI, H. et al. (2003): Trabecular minimodeling in human iliac bone. *Bone* 32 (2), 163–169.
- KOMORI, T. (2015): Animal models for osteoporosis. *European Journal of Pharmacology* 759, 287–294.

Literaturverzeichnis

- KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H.-G. (2014): Anatomie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Kapitel: Bewegungsapparat. 6. Aufl., Stuttgart. Schattauer.
- KOSHIHARA, Y.; HOSHI, K. (1997): Vitamin K2 enhances osteocalcin accumulation in the extracellular matrix of human osteoblasts in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research* 12 (3), 431–438.
- KRALL, E. A.; SAHYOUN, N.; TANNENBAUM, S.; DALLAL, G. E.; DAWSON-HUGHES, B. (1989): Effect of vitamin D intake on seasonal variations in parathyroid hormone secretion in postmenopausal women. *The New England Journal of Medicine* 321 (26), 1777–1783.
- KRASSAS, G. E. (2000): Idiopathic Juvenile Osteoporosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 900 (1), 409–412.
- KUMAR, R.; TEBBEN, P. J.; THOMPSON, J. R. (2012): Vitamin D and the kidney. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 523 (1), 77–86.
- LANN, R. F. J. M.; BUIJS, W. C. A. M.; VAN ERNING, L. J. T. O.; LEMMENS, J. A. M.; CORSTENS, F. H. M.; RUIJS, S. H. J. et al. (1993): Differential effects of glucocorticoids on cortical appendicular and cortical vertebral bone mineral content. *Calcified Tissue International* 52 (1), 5–9.
- LANDIN-WLLHELMSEN, K.; WLLHELMSEN, L.; LAPPAST, G.; ROSEN, T.; LINDSTEDT, G.; LUNDBERG, P.-A.; BENGTSSON, B.-Á. (1994): Serum insulin-like growth factor I in a random population sample of men and women. *Clinical Endocrinology* 41 (3), 351–357.
- LANGE, U.; MÜLLER-LADNER, U. (2007): Glukokortikoid-induzierte Osteoporose. *Zeitschrift für Rheumatologie* 66 (2), 129–138.
- LEE, A. J.; HODGES, S.; EASTELL, R. (2000): Measurement of osteocalcin. *Annals of Clinical Biochemistry* 37 (4), 432–446.
- LEE, N. K.; SOWA, H.; HINOI, E.; FERRON, M.; AHN, J. D.; CONFAYREUX, C. et al. (2007): Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130 (3), 456–469.
- LEHMANN, B.; MEURER, M. (2010): Vitamin D metabolism. *Dermatologic Therapy* 23 (1), 2–12.
- LERNER, U. H. (2006): Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *Journal of Dental Research* 85 (7), 584–595.

Literaturverzeichnis

- LI, J.; SAROSI, I.; CATTLEY, R. C.; PRETORIUS, J.; ASUNCION, F.; GRISANTI, M. et al. (2006): Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone* 39 (4), 754–766.
- LI, X.; OMINSKY, M. S.; WARMINGTON, K. S.; MORONY, S.; GONG, J.; CAO, J. et al. (2009): Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 24 (4), 578–588.
- LIAN, J.; STEWART, C.; PUCHACZ, E.; MACKOWIAK, S.; SHALHOUB, V.; COLLART, D. et al. (1989): Structure of the rat osteocalcin gene and regulation of vitamin D-dependent expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86 (4), 1143–1147.
- LILL, C. A.; FLUEGEL, A. K.; SCHNEIDER, E. (2002a): Effect of ovariectomy, malnutrition and glucocorticoid application on bone properties in sheep: a pilot study. *Osteoporosis International* 13 (6), 480–486.
- LILL, C. A.; GERLACH, U. V.; ECKHARDT, C.; GOLDHAHN, J.; SCHNEIDER, E. (2002b): Bone changes due to glucocorticoid application in an ovariectomized animal model for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporosis International* 13, 407–414.
- LIPS, P. (2001): Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocrine Reviews* 22 (4), 477–501.
- LIPS, P. (2007): Vitamin D status and nutrition in Europe and Asia. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 103 (3-5), 620–625.
- LIPS, P.; HACKENG, W. H.; JONGEN, M. J.; VAN GINKEL, F. C.; NETELENBOS, J. C. (1983): Seasonal variation in serum concentrations of parathyroid hormone in elderly people. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 57 (1), 204–206.
- LIPS, P.; VAN SCHOOR, N. (2005): Quality of life in patients with osteoporosis. *Osteoporosis International* 16 (5), 447–455.
- LIPS, P.; VAN SCHOOR, N. M. (2011): The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. Best practice & research. *Clinical Endocrinology & Metabolism* 25 (4), 585–591.

Literaturverzeichnis

- LIU, J.-m.; ZHAO, H.-y.; NING, G.; CHEN, Y.; ZHANG, L.-z.; SUN, L.-h. et al. (2008): IGF-1 as an early marker for low bone mass or osteoporosis in premenopausal and postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 26 (2), 159–164.
- LJUNGHALL, S.; JOHANSSON, A. G.; BURMAN, P.; KÄMPE, O.; LINDH, E.; KARLSSON, F. A. (1992): Low plasma levels of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in male patients with idiopathic osteoporosis. *Journal of Internal Medicine* 232 (1), 59–64.
- LOBO, R. A. (2008): Metabolic syndrome after menopause and the role of hormones. *Maturitas* 60 (1), 10–18.
- LORENC, R. S. (2002): Idiopathic juvenile osteoporosis. *Calcified Tissue International* 70 (5), 395–397.
- LOUET, J.-F.; LEMAY, C.; MAUVAIS-JARVIS, F. (2004): Antidiabetic actions of estrogen: Insight from human and genetic mouse models. *Current Atherosclerosis Reports* 6 (3), 180–185.
- MACDONALD, B. T.; JOINER, D. M.; OYSERMAN, S. M.; SHARMA, P.; GOLDSTEIN, S. A.; HE, X.; HAUSCHKA, P. V. (2007): Bone mass is inversely proportional to Dkk1 levels in mice. *Bone* 41 (3), 331–339.
- MACKIE, E. J. (2003): Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35 (9), 1301–1305.
- MACLAUGHLIN, J.; HOLICK, M. F. (1985): Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D₃. *The Journal of Clinical Investigation* 76 (4), 1536–1538.
- MAESTRO, B.; CAMPIÓN, J.; DÁVILA, N.; CALLE, C. (2000): Stimulation by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ of insulin receptor expression and insulin responsiveness for glucose transport in U-937 human promonocytic cells. *Endocrine Journal* 47 (4), 383–391.
- MAESTRO, B.; DÁVILA, N.; CARRANZA, M.; CALLE, C. (2003): Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 84 (2-3), 223–230.
- MANELLI, F.; CARPINTERI, R.; BOSSONI, S.; BURATTIN, A.; BONADONNA, S.; AGABITI ROSEI, E.; GIUSTINA, A. (2002): Growth hormone in glucocorticoid-induced osteoporosis. *Karger Publishers* (30).

Literaturverzeichnis

- MANOLAGAS, S. C. (1995): Role of cytokines in bone resorption. *Bone* 17 (2), 63-67.
- MANOLAGAS, S. C. (2000a): Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews* 21 (2), 115–137.
- MANOLAGAS, S. C. (2000b): Corticosteroids and Fractures: A close encounter of the third cell kind. *Journal of Bone and Mineral Research* 15 (6), 1001–1005.
- MAO, B.; WU, W.; DAVIDSON, G.; MARHOLD, J.; LI, M.; MECHLER, B. M. et al. (2002): Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 417 (6889), 664–667.
- MAYES, J. S.; WATSON, G. H. (2004): Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obesity Reviews* 5 (4), 197–216.
- MCCARTHY, T. L.; CENTRELLA, M.; CANALIS, E. (1989): Regulatory effects of insulin-like growth factors I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. *Endocrinology* 124 (1), 301–309.
- MCNAMARA, L. M. (2010): Perspective on post-menopausal osteoporosis: establishing an interdisciplinary understanding of the sequence of events from the molecular level to whole bone fractures. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 7 (44), 353–372.
- MEHL, B.; DELLING, G.; SCHLINDWEIN, I.; HEILMANN, P.; VOIA, C.; ZIEGLER, R. et al. (2002): Korrelieren biochemische Knochenstoffwechsellmarker mit einer histologisch gesicherten High- bzw. Low-Turnover-Osteoporose? *Medizinische Klinik* 97 (10), 588–594.
- MEIER, U.; GRESSNER, A. M. (2004): Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clinical Chemistry* 50 (9), 1511–1525.
- MEYER, G.; BADENHOOP, K. (2003): Glukokortikoidinduzierte Insulinresistenz und Diabetes mellitus. Rezeptor-, Postrezeptormechanismen, lokale Cortisolwirkung und neue Aspekte in der antidiabetischen Therapie. *Medizinische Klinik (Munich, Germany)* 98 (5), 266–270.
- MISHAL, A. A. (2001): Effects of different dress styles on vitamin D levels in healthy young Jordanian women. *Osteoporosis International* 12 (11), 931–935.

Literaturverzeichnis

- MOCHIZUKI, H.; HAKEDA, Y.; WAKATSUKI, N.; USUI, N.; AKASHI, S.; SATO, T. et al. (1992): Insulin-like growth factor-I supports formation and activation of osteoclasts. *Endocrinology* 131 (3), 1075–1080.
- MORIN, S.; LIX, L. M.; AZIMAE, M.; METGE, C.; CAETANO, P.; LESLIE, W. D. (2011): Mortality rates after incident non-traumatic fractures in older men and women. *Osteoporosis International* 22 (9), 2439–2448.
- MOSEKILDE, L. (2005): Vitamin D and the elderly. *Clinical Endocrinology* 62 (3), 265–281.
- MUSCOGIURI, G.; SORICE, G. P.; AJJAN, R.; MEZZA, T.; PILZ, S.; PRIOLETTA, A. et al. (2012): Can vitamin D deficiency cause diabetes and cardiovascular diseases? Present evidence and future perspectives. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 22 (2), 81–87.
- NENONEN, A.; CHENG, S.; IVASKA, K. K.; ALATALO, S. L.; LEHTIMÄKI, T.; SCHMIDT-GAYK, H. et al. (2005): Serum TRACP 5b is a useful marker for monitoring alendronate treatment: comparison with other markers of bone turnover. *Journal of Bone and Mineral Research* 20 (10), 1804–1812.
- NEWMAN, E.; TURNER, A. S.; WARK, J. D. (1995): The potential of sheep for the study of osteopenia: Current status and comparison with other animal models. *Bone* 16 (4), S277–S284.
- NEWTON, B.; COOPER, R.; GILBERT, J.; JOHNSON, R.; ZARDIACKAS, L. (2004): The ovariectomized sheep as a model for human bone loss. *Journal of Comparative Pathology* 130 (4), 323–326.
- NORDIN, B. (1997): Calcium and osteoporosis. *Nutrition* 13 (7-8), 664–686.
- OBERMAYER-PIETSCH, B. (2013): Die Bedeutung des Knochenstoffwechsel-Biomarker in der Osteologie 2012. *Journal für Mineralstoffwechsel* 20 (1), 4–9.
- O'BRIEN, C. A.; JIA, D.; PLOTKIN, L. I.; BELLIDO, T.; POWERS, C. C.; STEWART, S. A. et al. (2004): Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology* 145 (4), 1835–1841.
- O'CONNELL, S. L.; TRESHAM, J.; FORTUNE, C. L.; FARRUGIA, W.; MCDUGALL, J. G.; SCOGGINS, B. A.; WARK, J. D. (1993): Effects of prednisolone and deflazacort on osteocalcin metabolism in sheep. *Calcified Tissue International* 53 (2), 117–121.

Literaturverzeichnis

- OHEIM, R.; AMLING, M.; IGNATIUS, A.; POGODA, P. (2012): Large animal model for osteoporosis in humans: the ewe. *European Cells and Materials* 24, 372–385.
- OHEIM, R.; BEIL, F. T.; KÖHNE, T.; WEHNER, T.; BARVENCIK, F.; IGNATIUS, A. et al. (2013): Sheep model for osteoporosis: Sustainability and biomechanical relevance of low turnover osteoporosis induced by hypothalamic–pituitary disconnection. *Journal of Orthopaedic Research* 31 (7), 1067–1074.
- OHLSSON, C.; MELLSTRÖM, D.; CARLZON, D.; ORWOLL, E.; LJUNGGREN, Ö.; KARLSSON, M. K.; VANDENPUT, L. (2011): Older men with low serum IGF-1 have an increased risk of incident fractures: The MrOS Sweden study. *Journal of Bone and Mineral Research* 26 (4), 865–872.
- OHNAKA, K.; TANIGUCHI, H.; KAWATE, H.; NAWATA, H.; TAKAYANAGI, R. (2004): Glucocorticoid enhances the expression of dickkopf-1 in human osteoblasts: novel mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318 (1), 259–264.
- OMINSKY, M. S.; VLASSEROS, F.; JOLETTE, J.; SMITH, S. Y.; STOUCH, B.; DOELLGAST, G. et al. (2010): Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and bone strength. *Journal of Bone and Mineral Research* 25 (5), 948–959.
- OOMS, M. E.; LIPS, P.; ROOS, J. C.; van der Vijgh, Wim J. F.; POPP-SNIJDERS, C.; BEZEMER, P. D.; BOUTER, L. M. (1995): Vitamin D status and sex hormone binding globulin. *Journal of Bone and Mineral Research* 10 (8), 1177–1184.
- ORCHARD, T. S.; LARSON, J. C.; ALGHOTHANI, N.; BOUT-TABAKU, S.; CAULEY, J. A.; CHEN, Z. et al. (2014): Magnesium intake, bone mineral density, and fractures: results from the Women's Health Initiative Observational Study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 99 (4), 926–933.
- PADHI, D.; STOUCH, B.; JANG, G.; FANG, L.; DARLING, M.; GLISE, H. et al. (2007): Anti-sclerostin antibody increases markers of bone formation in healthy postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 22 (37).
- PARFITT, A. M. (1982): The coupling of bone formation to bone resorption: A critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metabolic Bone Disease and Related Research* 4 (1), 1–6.
- PARFITT, A. M. (1986): Bone and plasma calcium homeostasis. *Bone* 8 (1), 1-8.

Literaturverzeichnis

- PARFITT, A. M. (1994): Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *Journal of Cellular Biochemistry* 55 (3), 273–286.
- PARFITT, A. M.; MUNDY, G. R.; ROODMAN, G. D.; HUGHES, D. E.; BOYCE, B. F. (1996): Theoretical perspective: A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. *Journal of Bone and Mineral Research* 11 (2), 150–159.
- PATSCHAN, D.; LODDENKEMPER, K.; BUTTGEREIT, F. (2001): Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone* 29 (6), 498–505.
- PATTI, M. E. (1999): Nutrient modulation of cellular insulin action. *Annals of the New York Academy of Sciences* 892 (1), 187–203.
- PAZ-PACHECO, E.; FULEIHAN, G. E.; LEBOFF, M. S. (1995): Intact parathyroid hormone levels are not elevated in glucocorticoid-treated subjects. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 10 (11), 1713–1718.
- PERALDI, M. N.; RONDEAU, E.; JOUSSET, V.; M' Selmi, A. E. L.; LACAVE, R.; DELARUE, F. et al. (1990): Dexamethasone increases preproparathyroid hormone messenger RNA in human hyperplastic parathyroid cells in vitro. *European Journal of Clinical Investigation* 20 (4), 392–397.
- PERETZ, A.; MORIS, M.; WILLEMS, D.; BERGMANN, P. (1996): Is bone alkaline phosphatase an adequate marker of bone metabolism during acute corticosteroid treatment? *Clinical chemistry* 42 (1), 102–103.
- PERIS BERNAL, P. (2010): Osteoporosis in young individuals. *Reumatología Clínica (English Edition)* 6 (4), 217–223.
- PETERSONS, C. J.; MANGELSDORF, B. L.; JENKINS, A. B.; POLJAK, A.; SMITH, M. D.; GREENFIELD, J. R. et al. (2013): Effects of low-dose prednisolone on hepatic and peripheral insulin sensitivity, insulin secretion, and abdominal adiposity in patients with inflammatory rheumatologic disease. *Diabetes Care* 36 (9), 2822–2829.
- PFÜTZNER, A.; KUNT, T.; HOHBERG, C.; MONDOK, A.; PAHLER, S.; KONRAD, T. et al. (2004): Fasting intact proinsulin is a highly specific predictor of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27 (3), 682–687.
- PIETSCHMANN, P.; PETERLIK, M. (1999): Pathophysiologie und Therapie der Osteoporose. *Radiologe* 39 (3), 228–234.

Literaturverzeichnis

- PINZONE, J. J.; HALL, B. M.; THUDI, N. K.; VONAU, M.; QIANG, Y.-W.; ROSOL, T. J.; SHAUGHNESSY, J. D. (2009): The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *Blood* 113 (3), 517–525.
- PISCHON, T.; RIMM, E. B. (2006): Adiponectin: A promising marker for cardiovascular disease. *Clinical Chemistry* 52 (5), 797–799.
- PLAYFORD, M. P.; BICKNELL, D.; BODMER, W. F.; MACAULAY, V. M. (2000): Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of β -catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (22), 12103–12108.
- PLOTKIN, L. I.; AGUIRRE, J. I.; KOUSTENI, S.; MANOLAGAS, S. C.; BELLIDO, T. (2005): Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (8), 7317–7325.
- PLOTKIN, L. I.; MANOLAGAS, S. C.; BELLIDO, T. (2002): Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (10), 8648–8657.
- PREMAOR, M. O.; COMPSTON, J. E. (2012): Diagnostik der sekundären Ursachen von Osteoporose. *PRAXIS* 101 (1), 51–54.
- PRICE, P. A.; PARTHMORE, J. G.; DEFTOS, L. J. (1980): New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone GLA protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *The Journal of Clinical Investigation* 66 (5), 878–883.
- QIN, L.; RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. (2004): Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 15 (2), 60–65.
- QUARLES, L. D. (2012): Skeletal secretion of FGF-23 regulates phosphate and vitamin D metabolism. *Nature reviews. Endocrinology* 8 (5), 276–286.
- RACHNER, T. D.; KHOSLA, S.; HOFBAUER, L. C. (2011): Osteoporosis. *The Lancet* 377 (9773), 1276–1287.
- RAUCH, F.; TRAVERS, R.; NORMAN, M.; TAYLOR, A.; PARFITT, A.; GLORIEUX, F. (2002): The bone formation defect in idiopathic juvenile osteoporosis is surface-specific. *Bone* 31 (1), 85–89.

Literaturverzeichnis

- REBUFFÉ-SCRIVE, M.; WALSH, U. A.; MCEWEN, B.; RODIN, J. (1992): Effect of chronic stress and exogenous glucocorticoids on regional fat distribution and metabolism. *Physiology & Behavior* 52 (3), 583–590.
- REDDY, S. V. (2004): Regulatory mechanisms operative in osteoclasts. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 14 (4), 255–270.
- REES, D. A.; ALCOLADO, J. C. (2005): Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association* 22 (4), 359–370.
- REGINSTER, J.-Y.; COLLETTE, J.; NEUPREZ, A.; ZEGELS, B.; DEROISY, R.; BRUYERE, O. (2008): Role of biochemical markers of bone turnover as prognostic indicator of successful osteoporosis therapy. *Bone* 42 (5), 832–836.
- REGINSTER, J.-Y.; HENROTIN, Y.; CHRISTIANSEN, C.; GAMWELL-HENRIKSEN, E.; BRUYERE, O.; COLLETTE, J.; CHRISTGAU, S. (2001): Bone resorption in post-menopausal women with normal and low BMD assessed with biochemical markers specific for telopeptide derived degradation products of collagen type I. *Calcified Tissue International* 69 (3), 130–137.
- REID, I. R.; EVANS, M. C.; COOPER, G. J.; AMES, R. W.; STAPLETON, J. (1993): Circulating insulin levels are related to bone density in normal postmenopausal women. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 265 (4), 655-659.
- REID, I. R.; IBBERTSON, H. K. (1987): Evidence for decreased tubular reabsorption of calcium in glucocorticoid-treated asthmatics. *Hormone Research* 27 (4), 200–204.
- REINWALD, S.; BURR, D. (2008): Review of nonprimate, large animal models for osteoporosis research. *Journal of Bone and Mineral Research* 23 (9), 1353–1368.
- REUSCH, C. E.; LIEHS, M. R.; HOYER, M.; VOCHEZER, R. (1993): Fructosamine. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 7 (3), 177–182.
- RIGGS, B. L.; KHOSLA, S.; MELTON, L. J. (1998): A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *Journal of Bone and Mineral Research* 13 (5), 763–773.
- RIGGS, B. L.; KHOSLA, S.; MELTON, L. J. (2002): Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocrine Reviews* 23 (3), 279–302.

Literaturverzeichnis

- RIGGS, B. L.; MELTON, L. J. (1986): Involutional osteoporosis. *The New England Journal of Medicine* 314 (26), 1676–1686.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT (2012): Ergebnisse der Studie "Gesundheit in Deutschland aktuell 2012" Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Osteoporose. Faktenblätter des RKI.
- RODEN, M.; PRICE, T. B.; PERSEGHIN, G.; PETERSEN, K. F.; ROTHMAN, D. L.; CLINE, G. W.; SHULMAN, G. I. (1996): Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *Journal of Clinical Investigation* 97 (12), 2859.
- RODRÍGUEZ-SINOVAS, A.; CABESTRERO, A.; LÓPEZ, D.; TORRE, I.; MORENTE, M.; ABELLÁN, A. et al. (2007): The modulatory effects of connexin 43 on cell death/survival beyond cell coupling. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 94 (1–2), 219–232.
- ROGERS, A.; SALEH, G.; HANNON, R. A.; GREENFIELD, D.; EASTELL, R. (2002): Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87 (10), 4470–4475.
- ROODMAN, G. D. (1999): Cell biology of the osteoclast. *Experimental Hematology* 27 (8), 1229–1241.
- ROSEN, C. J.; KURLAND, E. S.; VERAULT, D.; ADLER, R. A.; RACKOFF, P. J.; CRAIG, W. Y. et al. (1998): Association between serum insulin growth factor-I (IGF-I) and a simple sequence repeat in IGF-I gene: implications for genetic studies of bone mineral density. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83 (7), 2286–2290.
- ROSS, F. P.; TEITELBAUM, S. L. (2005): α v β 3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunological Reviews* 208, 88–105.
- ROSS, P. D.; KRESS, B. C.; PARSON, R. E.; WASNICH, R. D.; ARMOUR, K. A.; MIZRAHI, I. A. (2000): Serum bone alkaline phosphatase and calcaneus bone density predict fractures: A prospective study. *Osteoporosis International* 11 (1), 76–82.
- RUDE, R. K.; SINGER, F. R.; GRUBER, H. E. (2009): Skeletal and hormonal effects of magnesium deficiency. *Journal of the American College of Nutrition* 28 (2), 131–141.

Literaturverzeichnis

- SAFTIG, P.; HUNZIKER, E.; EVERTS, V.; JONES, S.; BOYDE, A.; WEHMEYER, O. et al. (2000): Functions of cathepsin K in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 477, 293–303.
- SAFTIG, P.; HUNZIKER, E.; WEHMEYER, O.; JONES, S.; BOYDE, A.; ROMMERSKIRCH, W. et al. (1998): Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (23), 13453–13458.
- SAHOTA, O.; MASUD, T.; SAN, P.; HOSKING, D. J. (1999): Vitamin D insufficiency increases bone turnover markers and enhances bone loss at the hip in patients with established vertebral osteoporosis. *Clinical Endocrinology* 51 (2), 217–221.
- SALEEM, U.; MOSLEY, T. H.; KULLO, I. J. (2010): Serum osteocalcin is associated with measures of insulin resistance, adipokine levels, and the presence of metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (7), 1474–1478.
- SARTORIO, A.; CONTI, A.; MONZANI, M.; MORABITO, F.; FAGLIA, G. (1993): Growth hormone treatment in adults with GH deficiency: Effects on new biochemical markers of bone and collagen turnover. *Journal of Endocrinological Investigation* 16 (11), 893–898.
- SCHORLEMMER, S.; GOHL, C.; IWABU, S.; IGNATIUS, A.; CLAES, L.; AUGAT, P. (2003): Glucocorticoid treatment of ovariectomized sheep affects mineral density, structure, and mechanical properties of cancellous bone. *Journal of Bone and Mineral Research* 18 (11), 2010–2015.
- SCHULTE, H. M. (1997): Osteoporose: Diagnose, Therapie und Prophylaxe. *Gynäkologe* 30 (4), 352–356.
- SEARING, D. A.; ZHANG, Y.; MURPHY, J. R.; HAUKE, P. J.; GOLEVA, E.; LEUNG, D. Y. M. (2010): Decreased serum vitamin D levels in children with asthma are associated with increased corticosteroid use. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (5), 995–1000.
- SEEMAN, E. (2003): Invited Review: Pathogenesis of osteoporosis. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985) 95 (5), 2142–2151.
- SEIBEL, M. J. (2000): Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporosis International* 11 (6), S18-S29.

Literaturverzeichnis

- SEIBEL, M. J. (2005): Biochemical markers of bone turnover Part I: biochemistry and variability. *The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists.* 26 (4), 97.
- SEIBEL, M. J.; COSMAN, F.; SHEN, V.; GORDON, S.; DEMPSTER, D. W.; RATCLIFFE, A.; LINDSAY, R. (1993): Urinary hydroxypyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption and estrogen efficacy in postmenopausal osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 8 (7), 881–889.
- SEIBEL, M. J.; WOITGE, H. W.; PECHERSTORFER, M.; KARMATSCHEK, M.; HORN, E.; LUDWIG, H. et al. (1996): Serum immunoreactive bone sialoprotein as a new marker of bone turnover in metabolic and malignant bone disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81 (9), 3289–3294.
- SHAO, J.; WANG, Z.; YANG, T.; YING, H.; ZHANG, Y.; LIU, S. (2015): Bone regulates glucose metabolism as an endocrine organ through osteocalcin. *International Journal of Endocrinology* 2015.
- SIGRIST, I. M.; GERHARDT, C.; ALINI, M.; SCHNEIDER, E.; EGGERMANN, M. (2006): The long-term effects of ovariectomy on bone metabolism in sheep. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 25 (1), 28–35.
- SILVER, J.; KILAV, R.; NAVEH-MANY, T. (2002): Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 283 (3), 367-376.
- SILVER, J.; NAVEH-MANY, T. (2009): Phosphate and the parathyroid. *Kidney International* 75 (9), 898–905.
- SIMPSON, A. H.; MURRAY, I. (2015): Osteoporotic Fracture Models. *Current Osteoporosis Reports* 13 (1), 9–15.
- SIVAGURUNATHAN, S.; MUIR, M. M.; BRENNAN, T. C.; SEALE, J. P.; MASON, R. S. (2005): Influence of glucocorticoids on human osteoclast generation and activity. *Journal of Bone and Mineral Research* 20 (3), 390–398.
- SLOVIK, D. M.; ADAMS, J. S.; NEER, R. M.; HOLICK, M. F.; POTTS, J. T. (1981): Deficient production of 1,25-dihydroxyvitamin D in elderly osteoporotic patients. *The New England Journal of Medicine* 305 (7), 372–374.
- SMITH, E.; FRENKEL, B. (2005): Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a glycogen synthase kinase-3 β -dependent and -independent manner. *Journal of Biological Chemistry* 280 (3), 2388–2394.

Literaturverzeichnis

- SODEK, J.; GANSS, B.; MCKEE, M. D. (2000): Osteopontin. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 11 (3), 279–303.
- SOKOLL, L. J.; SADOWSKI, J. A. (1996): Comparison of biochemical indexes for assessing vitamin K nutritional status in a healthy adult population. *The American Journal of Clinical Nutrition* 63 (4), 566–573.
- SRIVASTAVA, A. K.; VLIET, E. L.; LEWIECKI, E. M.; MARICIC, M.; ABDELMALEK, A.; GLUCK, O.; BAYLINK, D. J. (2005): Clinical use of serum and urine bone markers in the management of osteoporosis. *Current Medical Research and Opinion* 21 (7), 1015–1026.
- STĚPÁN, J. J.; LACHMAN, M.; ZVĚŘINA, J.; PACOVSKÝ, V.; BAYLINK, D. J. (1989): Castrated men exhibit bone loss: effect of calcitonin treatment on biochemical indices of bone remodeling. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 69 (3), 523–527.
- STRACKE, H.; SCHULZ, A.; WEBER, U.; ULLMANN, J.; SCHATZ, H. (1987): Osteocalcin und Knochenhistologie bei Osteoporose. *Klinische Wochenschrift* 65 (22), 1095–1100.
- STRAPAZZON, G.; TONI, L. de; FORESTA, C. (2011): Serum undercarboxylated osteocalcin was inversely associated with plasma glucose level and fat mass in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporosis International* 22 (5), 1643–1644.
- STUART, J. A.; PAGE, M. M. (2010): Plasma IGF-1 is negatively correlated with body mass in a comparison of 36 mammalian species. *Mechanisms of Ageing and Development* 131 (9), 591–598.
- SZULC, P.; CHAPUY, M. C.; MEUNIER, P. J.; DELMAS, P. (1993): Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *The Journal of Clinical Investigation* 91 (4), 1769–1774.
- TAKEDA, S.; ELEFTERIOU, F.; LEVASSEUR, R.; LIU, X.; ZHAO, L.; PARKER, K. L. et al. (2002): Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111 (3), 305–317.
- TEITELBAUM, S. L.; ABU-AMER, Y.; ROSS, F. P. (1995): Molecular mechanisms of bone resorption. *Journal of Cellular Biochemistry* 59 (1), 1–10.
- THOMAS, L. (2012): Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 8., Aufl, Frankfurt am Main. TH-Books Verlagsgesellschaft.

Literaturverzeichnis

- THOMPSON, D. D.; SIMMONS, H. A.; PIRIE, C. M.; KE, H. Z. (1995): FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 17 (4), S125-S133.
- TÓTH, M.; GROSSMAN, A. (2013): Glucocorticoid-induced osteoporosis: lessons from Cushing's syndrome. *Clinical Endocrinology* 79 (1), 1–11.
- TOUITOU, Y.; AUZÉBY, A.; CAMUS, F.; DJERIDANE, Y. (2010): Twenty-four-hour profiles of urinary excretion of calcium, magnesium, phosphorus, urea, and creatinine in healthy prepubertal boys. *Clinical Biochemistry* 43 (1-2), 102–105.
- TROEN, B. R. (2006): The regulation of cathepsin K gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1068 (1), 165–172.
- TURNER, A. S. (2002): The sheep as a model for osteoporosis in humans. *The Veterinary Journal* 163 (3), 232–239.
- TURNER, A. S.; MALLINCKRODT, C. H.; ALVIS, M. R.; BRYANT, H. U. (1995): Dual-energy X-ray absorptiometry in sheep. *Bone* 17 (4), S381-S387.
- TURNER, R.; MARAN, A.; LOTINUN, S.; HEFFERAN, T.; EVANS, G. E.; ZHANG, M.; SIBONGA, J. D. (2001): Animal models for osteoporosis. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* (2), 117–127.
- UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N.; AKATSU, T.; TANAKA, H.; SASAKI, T.; NISHIHARA, T. et al. (1990): Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (18), 7260–7264.
- UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N.; YASUDA, H.; MIZUNO, A.; ITOH, K.; UENO, Y. et al. (2000): Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* 141 (9), 3478–3484.
- UEBELHART, D.; SCHLEMMER, A.; JOHANSEN, J. S.; GINEYTS, E.; CHRISTIANSEN, C.; DELMAS, P. (1991): Effect of menopause and hormone replacement therapy on the urinary excretion of pyridinium cross-links. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 72 (2), 367–373.
- VAANANEN, H. K.; HORTON, M. (1995): The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *Journal of Cell Science* 108 (Pt 8), 2729–2732.

Literaturverzeichnis

- VAN BEZOOIJEN, R. L.; ROELEN, B. A.; VISSER, A.; VAN DER WEE-PALS, L.; WILT, E. de; KARPERIEN, M. (2004): Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *The Journal of Experimental Medicine* 199 (6), 805–814.
- VAN RAALTE, D. H.; NOFRATE, V.; BUNCK, M. C.; VAN IERSEL, T.; SCHAAP, J. E.; NÄSSANDER, U. K. et al. (2010): Acute and 2-week exposure to prednisolone impair different aspects of β -cell function in healthy men. *European Journal of Endocrinology* 162 (4), 729–735.
- VAN STAA, T. P. (2006): The Pathogenesis, Epidemiology and Management of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *Calcified Tissue International* 79 (3), 129–137.
- VAN STAA, T. P.; LEUFKENS, H. G. M.; ABENHAIM, L.; ZHANG, B.; COOPER, C. (2000): Use of oral corticosteroids and risk of fractures. *Journal of Bone and Mineral Research* 15 (6), 993–1000.
- VAN STRAALLEN, J. P.; SANDERS, E.; PRUMMEL, M. F.; SANDERS, G. T. (1991): Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clinica Chimica Acta* 201 (1-2), 27–33.
- VERMEER, C.; JIE, K. S.; KNAPEN, M. H. (1995): Role of vitamin K in bone metabolism. *Annual Review of Nutrition* 15, 1–22.
- VESTERGAARD, P.; REJNMARK, L.; MOSEKILDE, L. (2005): Fracture risk associated with systemic and topical corticosteroids. *Journal of Internal Medicine* 257 (4), 374–384.
- VESTERGAARD, P.; REJNMARK, L.; MOSEKILDE, L. (2009): Diabetes and its complications and their relationship with risk of fractures in type 1 and 2 diabetes. *Calcified Tissue International* 84 (1), 45–55.
- VICENTE-RODRÍGUEZ, G.; EZQUERRA, J.; MESANA, M.; FERNÁNDEZ-ALVIRA, J.; REY-LÓPEZ, J.; CASAJUS, J.; MORENO, L. (2008): Independent and combined effect of nutrition and exercise on bone mass development. *Journal of Bone Mineral Metabolism* 26 (5), 416–424.
- VORONKOV, A.; KRAUSS, S. (2013): Wnt/beta-catenin signaling and small molecule inhibitors. *Current Pharmaceutical Design* 19 (4), 634–664.
- WALSH, L. J.; WONG, C. A.; PRINGLE, M.; TATTERSFIELD, A. E. (1996): Use of oral corticosteroids in the community and the prevention of secondary osteoporosis: a cross sectional study. *British Medical Journal* 313 (7053), 344–346.

Literaturverzeichnis

- WANG, F.-S.; KO, J.-Y.; LIN, C.-L.; WU, H.-L.; KE, H.-J.; TAI, P.-J. (2007): Knocking down dickkopf-1 alleviates estrogen deficiency induction of bone loss. A histomorphological study in ovariectomized rats. *Bone* 40 (2), 485–492.
- WARRINER, A. H.; SAAG, K. G. (2013): Glucocorticoid-related bone changes from endogenous or exogenous glucocorticoids. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity* 20 (6), 510–516.
- WEBER, G.; BECCARIA, L.; DE'ANGELIS, M.; MORA, S.; GALLI, L.; CAZZUFFI, M. A. et al. (1990): Bone mass in young patients with type I diabetes. *Bone and Mineral* 8 (1), 23–30.
- WEINSTEIN, R. S. (2012): Glucocorticoid-induced osteoporosis and osteonecrosis. *Endocrinology and metabolism Clinics of North America* 41 (3), 595–611.
- WHO SUMMARY MEETING REPORT (2007): WHO scientific group on the assessment of Osteoporosis at primary health care level.
- WHO TECHNICAL REPORT SERIES (1994): Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organization technical report series 843, 1–129.
- WILKENS, M. R.; MROCHEN, N.; BREVES, G.; SCHRÖDER, B. (2010): Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on calcium and phosphorus homeostasis in sheep fed diets either adequate or restricted in calcium content. *Domestic Animal Endocrinology* 38 (3), 190–199.
- WINDHAGEN, H.; WITTE, F.; HURSCHLER, C.; MACIEJEWSKI, O.; LINNENBERG, D.; THOREY, F. (2002): Bone turnover during distraction osteogenesis in an experimental sheep model. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 122 (5), 279–282.
- WRITING GROUP FOR THE ISCD (2004): Position statement. *Journal of Clinical Densitometry* 7 (1), 7–12.
- ZAITSEVA, O. V.; SHANDRENKO, S. G.; VELIKY, M. M. (2015): Biochemical markers of bone collagen type I metabolism. *Ukrainian Biochemical Journal* 87 (1), 21–32.
- ZARRINKALAM, M. R.; BEARD, H.; SCHULTZ, C. G.; MOORE, R. J. (2009): Validation of the sheep as a large animal model for the study of vertebral osteoporosis. *European Spine Journal* 18 (2), 244–253.

Literaturverzeichnis

ZARRINKALAM, M. R.; MULAIBRAHIMOVIC, A.; ATKINS, G. J.; MOORE, R. J. (2012): Changes in osteocyte density correspond with changes in osteoblast and osteoclast activity in an osteoporotic sheep model. *Osteoporosis International* 23 (4), 1329–1336.

ZITTERMANN, A. (2010): The estimated benefits of vitamin D for Germany. *Molecular Nutrition & Food Research* 54 (8), 1164–1171.

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Osteoklastengenese.....	9
Abbildung 2:	Remodeling-Zyklus.....	14
Abbildung 3:	Regelkreis der PTH/1,25-Dihydroxyvitamin D Achse zur Regulation der Calciumhomöostase.....	17
Abbildung 4:	Wirkungsweisen endogener/exogener Glukokortikoide im Knochenstoffwechsel.....	36
Abbildung 5:	Interaktion zwischen Knochen- und Energiestoffwechsel.....	40
Abbildung 6:	Studiendesign.....	73
Abbildung 7:	Schaf bei Knochendichtemessung (DXA).....	82
Abbildung 8:	Körpergewicht und DXA-Daten im Gruppenvergleich zum Zeitpunkt 0, 3 und 8 Monate.....	113
Abbildung 9:	Elektrolyte und fraktionierte Urinausscheidung im Gruppenvergleich zum Zeitpunkt 0, 3 und 8 Monate.....	120
Abbildung 10:	Knochenformations- und Resorptionsmarker sowie 25-OH- Vitamin D im Gruppenvergleich zum Zeitpunkt 0, 3 und 8 Monate.....	122
Abbildung 11:	Marker des Energiestoffwechsels und IGF-1 im Gruppenvergleich zum Zeitpunkt 0, 3 und 8 Monate.....	126

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Osteoporose-Definition anhand T-Score.....	21
Tabelle 2:	Risikofaktoren, die eine Osteoporose und osteoporotisch- bedingte Frakturen begünstigen.....	23
Tabelle 3:	Ursachen für eine sekundäre Osteoporose.....	32
Tabelle 4:	Überblick über aktuell klinisch eingeführte Biomarker des Knochenstoffwechsels in der Humanmedizin.....	50
Tabelle 5:	Gruppenaufteilung der Versuchsschafe.....	76
Tabelle 6:	Analytische Bestandteile und Ernährungszusätze der verwendeten Futtermittel.....	80
Tabelle 7:	Geräte und Verbrauchsmaterialien zur Durchführung der EIAs/ELISAs.....	87
Tabelle 8:	orientierende Referenzbereiche: DXA-Messung „abominal width“.....	112
Tabelle 9:	Z-Score.....	116
Tabelle 10:	orientierende Referenzbereiche: Elektrolyte, Hormone und Marker des Knochen- und Energiestoffwechsel.....	119

11 ANHANG

Dargestellt sind die Präzisionsmessungen aller Untersuchungsparameter. Das Level zeigt an, ob es sich um hohe, mittlere oder niedrig gemessene Werte handelt. (SD = Standardabweichung, CV% = Variationskoeffizient)

Elektrolyte und Hormone:

Calcium (mmol/l)

Messung	1	2
Wiederholungsmessung (n)	10	10
Level	niedrig	mittel
Mittelwert	0,85	1,05
SD	0,01	0,02
CV%	1,30	1,80

Phosphat (mmol/l)

Messung	1	2
Wiederholungsmessung (n)	10	10
Level	niedrig	hoch
Mittelwert	1,81	2,61
SD	0,01	0,01
CV%	0,78	0,52

Magnesium (mmol/l)

Messung	1	2
Wiederholungsmessung (n)	10	10
Level	niedrig	mittel
Mittelwert	0,47	0,76
SD	0,01	0,01
CV%	1,67	1,90

Anhang

25-OH-Vitamin D (ng/ml)

Messung	1	2	3
Wiederholungsmessung (n)	8	8	8
Level	hoch	hoch	niedrig
Mittelwert	27,92	23,86	11,67
SD	1,99	1,86	3,16
CV%	7,14	7,94	27,11

Urinausscheidung

Urin Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)

Messung	1	2
Wiederholungsmessung (n)	15	15
Level	niedrig	hoch
Mittelwert	946,02	13344,26
SD	51,27	383,47
CV%	5,42	2,87

Urin Phosphat (mmol/l)

Messung	1	2
Wiederholungsmessung (n)	15	15
Level	niedrig	hoch
Mittelwert	0,66	42,53
SD	0,07	0,93
CV%	9,91	2,18

Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)

Messung	1	2
Wiederholungsmessung (n)	10	10
Level	niedrig	hoch
Mittelwert	67,3	120,2
SD	0,67	1,03
CV%	1,00	0,86

Anhang

Fraktionierte Ausscheidung Phosphat (FEP %)

Messung	1	2
Wiederholungsmessung (n)	10	10
Level	niedrig	hoch
Mittelwert	0,08	16,04
SD	0,11	0,43
CV%	12,68	2,66

Marker der Knochenformation

BAP (U/L)

Messung	1	2	3	4	5
Wiederholungsmessung (n)	8	8	8	8	7
Level	mittel	niedrig	niedrig	hoch	niedrig
Mittelwert	41,05	34,77	27,16	125,6	33,16
SD	4,47	2,65	2,08	7,94	2,88
CV%	10,89	7,62	7,65	6,32	8,69

Osteocalcin (ng/ml)

Messung	1	2	3	4	5
Wiederholungsmessung (n)	8	8	8	8	8
Level	mittel	mittel	hoch	hoch	hoch
Mittelwert	34,54	29,52	42,03	42,9	41,87
SD	1,26	4,06	0,63	1,01	1,58
CV%	3,65	13,75	1,51	2,36	3,78

Marker der Knochenresorption

NTX-1 (nM BCE)

Messung	1	2	3	4	5
Wiederholungsmessung(n)	8	8	7	8	8
Level	mittel	mittel	mittel	hoch	niedrig
Mittelwert	16,27	11,54	16,16	17,59	13,9
SD	0,82	2,65	2,37	1,81	4,93
CV%	5,02	22,99	14,68	10,3	35,5

Anhang

Cathepsin K (pmol/l) (Keine Kreuzreaktivität)

Messung	1	2
Wiederholungsmessung (n)	7	8
Level	niedrig	mittel
Mittelwert	23,63	77,3
SD	12,23	37,83
CV%	51,75	48,94

DKK-1 (pmol/l) (Keine Kreuzreaktivität)

Messung	1	2
Wiederholungsmessung (n)	8	8
Level	niedrig	niedrig
Mittelwert	5,19	4,70
SD	0,25	0,25
CV%	4,88	5,33

Marker des Energiestoffwechsels

Fructosamin ($\mu\text{mol/l}$)

Messung	1	2
Wiederholungsmessung (n)	10	10
Level	niedrig	hoch
Mittelwert	192,82	217,37
SD	1,07	2,84
CV%	0,55	1,31

Albumin (g/l)

Messung	1	2
Wiederholungsmessung (n)	10	10
Level	mittel	hoch
Mittelwert	27,4	30,8
SD	0,12	0,11
CV%	0,46	0,37

Anhang

Insulin ($\mu\text{U/ml}$)

Messung	1	2	3	4	5
Wiederholungsmessung (n)	8	8	8	8	8
Level	mittel	niedrig	niedrig	niedrig	hoch
Mittelwert	5,14	2,51	1,87	1,89	8,94
SD	0,52	0,38	0,23	0,28	0,32
CV%	10,05	15,34	12,51	14,8	3,61

Unveresterte Fettsäuren ($\mu\text{mol/l}$)

Messung	1	2
Wiederholungsmessung (n)	10	10
Level	niedrig	mittel
Mittelwert	229,49	555,69
SD	7,15	15,20
CV%	3,11	2,74

Wachstumshormone

IGF-1 (ng/ml)

Messung	1	2	3	4	5
Wiederholungsmessung (n)	8	7	8	8	8
Level	mittel	niedrig	mittel	hoch	hoch
Mittelwert	101,94	52,07	210,92	313,7	308,76
SD	20,91	10,7	20,39	50,93	68,28
CV%	20,51	20,56	9,67	16,25	22,11

12 DANKSAGUNG

Zu allererst möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau PD Dr. (habil.) Natali Bauer ganz herzlich bedanken für die Überlassung des Promotionsthemas und vor allem für ihre tolle Betreuung und Unterstützung. Ohne sie hätte ich diese Arbeit nicht zustande bekommen. Danke für jede Motivation, jeden Rat und für alles was ich lernen durfte! Danke!

Einen besonderen Dank geht auch an Prof. Dr. Andreas Moritz und dem gesamten Team des Zentrallabors der Justus-Liebig-Universität Gießen für die sehr lehrreiche, schöne Zeit in einem super Arbeitsklima mit tollen Kollegen. Danke für das Vertrauen in mich!

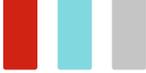
Ein Dank geht an dieser Stelle außerdem an die DFG (Sonderforschungsbereich (SFB)/ Transregio 79, Teilprojekt 1) unter der Leitung von Prof. Dr. Christian Heiss für die Einladung zur Teilnahme an diesem spannenden Projekt und für die Bereitstellung der Sachmittel. Zudem danke ich hier Dr. Thaqif El Khassawna für die gute fachliche Unterstützung meiner Fragen und den Doktoranden des Teilprojekts T1: Etablierung und Qualitätssicherung osteoporotischer Tiermodelle für die gute Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei meiner liebsten Freundin und Arbeitskollegin Sabine Thalmeier bedanken. Ich danke dir dafür, dass du mir immer in allen Lebenslagen mit Rat und Tat zur Seite stehst und die Zeit - trotz viel Arbeit - so schön für mich gemacht hast!

Ein Dank gilt auch dir Lena, als schon langer Bestandteil meiner Familie, für das Korrekturlesen meiner Arbeit sowie meinen guten Freunden für jeden Zuspruch.

Ich danke auch meinen leider bereits verstorbenen Großeltern. Ich weiß, sie wären sehr stolz auf mich gewesen.

Tausend Dank möchte ich aber vor allem an dieser Stelle meinen Eltern und Geschwistern sagen. Ich danke euch, dass ihr mir alles ermöglicht habt und dass ihr mir immer in jeder Hinsicht zur Seite steht. Ihr seid wunderbar!



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6446-4



9 17 8 3 8 3 5 1 9 6 4 4 6 4