

Aus dem
Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. W. A. Rambeck

Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels nach Osteotomie
Das Schaf als Osteoporosemodell

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Susanne Schumacher
aus Hof

München 2007

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Prof. Dr. W. A. Rambeck

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

für Paula

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Definition der Osteoporose unter besonderer Berücksichtigung der Knochendichtemessung mittels Dual energy x-ray absorptiometry (DXA).....	3
2.2	Knochendichte und Knochenqualität.....	7
2.3	Knochenstoffwechsel und biochemische Knochenmarker.....	7
2.4	Möglichkeiten und Grenzen biochemischer Knochenmarker.....	11
2.5	Risikofaktoren, die die Entstehung von Osteoporose und das Auftreten osteoporotischer Frakturen begünstigen.....	12
2.5.1	Niedrige Knochendichte.....	14
2.5.2	Genetische Disposition.....	14
2.5.3	Ethnische Herkunft und geographische Variabilität.....	15
2.5.4	Familienanamnese.....	16
2.5.5	Fragilitätsfrakturen.....	16
2.5.6	Niedriges Körpergewicht.....	17
2.5.7	Verminderte körperliche Aktivität und Immobilisation.....	18
2.5.8	Nikotinkonsum.....	18
2.5.9	Exzessiver Alkoholkonsum.....	19
2.5.10	Coffein.....	20
2.5.11	Ernährung.....	21
2.5.11.1	Calcium.....	21
2.5.11.2	Vitamin D.....	24
2.5.11.3	Protein.....	28
2.5.11.4	Phosphor.....	30
2.5.11.5	Vitamin K.....	31
2.5.11.6	Weitere Nahrungskomponenten, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen.....	32
2.5.12	Prädisponierende Risikofaktoren für primäre oder sekundäre Osteoporoseformen.....	37

2.6	Osteoporoseformen.....	38
2.6.1	Idiopathische oder „primäre“ Osteoporoseformen.....	39
2.6.1.1	Idiopathische juvenile Osteoporose.....	40
2.6.1.2	Idiopathische Osteoporose bei jungen Erwachsenen	41
2.6.1.3	Typ-I-Osteoporose oder postmenopausale Osteoporose	42
2.6.1.4	Typ-II-Osteoporose oder senile Osteoporose	45
2.6.2	Sekundäre Osteoporose	47
2.6.2.1	Glucocorticoidinduzierte Osteoporose	49
2.7	Tiermodelle in der Osteoporoseforschung	51
3	Material und Methoden	56
3.1	Versuchstiere.....	56
3.2	Induktion der osteoporotischen Veränderungen am Knochen.....	59
3.2.1	Ovarektomie	59
3.2.2	Fütterung	60
3.2.3	Glucocorticoidmedikation	62
3.3	Tibiaosteotomie	63
3.4	Euthanasie.....	64
3.5	Laboruntersuchungen.....	64
3.5.1	Probengewinnung	64
3.5.2	Bestimmung biochemischer Parameter des Knochenstoffwechsels....	65
3.5.2.1	Bestimmung der Parameter der Knochenformation: Alkalische Phosphatase und knochenspezifische alkalische Phosphatase	66
3.5.2.2	Bestimmung der Parameter der Knochenresorption	68
3.5.2.2.1	Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin	68
3.5.2.2.2	Calcium im Urin	71
3.5.2.3	Bestimmung weiterer Parameter	72
3.5.2.3.1	Calcium im Serum	72
3.5.2.3.2	Creatinin im Urin	72
3.6	Statistische Auswertung.....	73
4	Ergebnisse	74
4.1	Versuchstiere.....	74

4.2	Konzentrationen und Verlauf der biochemischen Knochenmarker bei den Tieren der Versuchsgruppe und den Tieren der Kontrollgruppe sowie Vergleich zwischen den Gruppen.....	75
4.2.1	Parameter der Knochenformation	76
4.2.1.1	Alkalische Phosphatase	76
4.2.1.2	Knochenspezifische alkalische Phosphatase.....	78
4.2.2	Parameter der Knochenresorption.....	79
4.2.2.1	Collagen-Crosslinks	79
4.2.2.1.1	Pyridinolin.....	80
4.2.2.1.2	Desoxypyridinolin.....	82
4.2.2.2	Calcium im Urin	84
4.3	Konzentrationen und Verlauf des Stoffwechselfparameters Calcium im Serum bei den Tieren der Versuchsgruppe und den Tieren der Kontrollgruppe sowie Vergleich zwischen den Gruppen.....	86
4.4	Korrelationen zwischen den biochemischen Knochenmarkern	87
4.4.1	Korrelationen zwischen den Knochenmarkern bei den Tieren der OVX-Gruppe	87
4.4.2	Korrelationen zwischen den Knochenmarkern bei den Tieren der Kontrollgruppe	95
5	Diskussion.....	102
5.1	Auswahl des Tiermodells.....	102
5.2	Verlauf der biochemischen Knochenstoffwechselfparameter nach Tibiaosteotomie	107
5.2.1	Verlauf des Stoffwechselfparameters Calcium in Serum und Urin.....	108
5.2.1.1	Calcium im Serum	108
5.2.1.2	Calcium im Urin	109
5.3	Verlauf der biochemischen Parameter der Knochenformation.....	110
5.3.1	Alkalische Phosphatase	110
5.3.2	Knochenspezifische alkalische Phosphatase.....	112
5.4	Verlauf der biochemischen Parameter der Knochenresorption.....	113
5.4.1	Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin	113
6	Zusammenfassung	116

7	Summary	118
8	Literaturverzeichnis.....	120
9	Anhang	154
9.1	Abbildungen.....	154
9.2	Tabellen	155
9.3	Abkürzungen.....	159
10	Danksagung	162

1 Einleitung und Problemstellung

Bereits Anfang des 19. Jahrhunderts wurde von dem englischen Chirurgen Sir Astley Cooper dokumentiert, dass die im Alter erworbene Leichtigkeit der Knochen die Entstehung von Frakturen begünstigt (Cooper 1851).

Die Osteoporose ist eine Erkrankung, die durch Verminderung der Knochenmasse, Störung der Mikroarchitektur und ein infolgedessen erhöhtes Frakturrisiko charakterisiert ist. Von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wurde die erste Dekade des neuen Jahrhunderts als „The bone and joint decade 2000 - 2010“ ausgerufen (Lidgren 2003). Einer Schätzung zufolge sind weltweit über 200 Millionen Menschen von der Erkrankung betroffen (Cooper 1999a). Häufig ist die osteoporotische Fraktur zugleich erstes Anzeichen und schwerwiegende Folge der Osteoporose. Im Jahr 2000 betrug die Zahl der osteoporotischen Frakturen allein in der Europäischen Union 3,9 Millionen. Da die Frakturinzidenz exponentiell mit zunehmendem Alter ansteigt, wird infolge der demographischen Entwicklung die Zahl der osteoporotischen Hüftfrakturen von 1,7 Millionen im Jahr 1992 auf 6,3 Millionen im Jahr 2025 ansteigen (DVO-Leitlinie 2006, Cooper et al. 1992b). Männer sind in zunehmendem Maße von der Erkrankung betroffen, wenn auch das Risiko, einen osteoporosebedingten Knochenbruch zu erleiden, für Frauen um das Dreifache höher ist (Cummings und Melton 2002). In der Mitte des vergangenen Jahrhunderts wurde die These aufgestellt, dass die Osteoporose in erster Linie mit dem Östrogenabfall nach der Menopause assoziiert sei (Albright et al. 1940). Nach heutiger Vorstellung ist die Entstehung der Erkrankung jedoch ein multifaktorieller Prozess, welchem unterschiedliche pathogenetische Mechanismen zugrunde liegen. Die Kenntnis zahlreicher Risikofaktoren und verschiedener Pathomechanismen ist die Grundlage für Maßnahmen zur Prävention und Therapie.

In der Vergangenheit wurden einige Tiermodelle etabliert, welche sich als geeignet erwiesen haben, die Erforschung von Ätiologie und Pathogenese sowie die Entwicklung neuer Medikamente voranzubringen. Eine besondere Stellung nimmt in dieser Hinsicht die ovariectomierte Ratte ein.

Wenn auch Vorbeugung und Therapie die ersten Ziele sein müssen, der Erkrankung entgegenzutreten, kommt der Behandlung osteoporotischer Frakturen eine wachsende Bedeutung zu. Derzeit existiert jedoch kein standardisiertes und ausreichend großes Tiermodell, welches die Untersuchung von Frakturheilung und Frakturbehandlung in osteoporotischem Knochen erlaubt. In diesem Zusammenhang sind insbesondere Osteosynthesematerialien und -techniken von Interesse, deren Anwendung in Anwesenheit von Osteoporose veränderte Bedingungen zugrunde liegen. Der Notwendigkeit, ein Großtiermodell zu etablieren, welches orthopädischen und chirurgischen Fragestellungen hinsichtlich Frakturheilung und Frakturversorgung genügt, wird in dieser Studie Rechnung getragen. In Zusammenarbeit mit dem AO Research Institute, Davos, Schweiz, soll die Fraktur- bzw. Knochendefektheilung mit Hilfe eines Tiermodells untersucht werden. Ausgewählt wird das Schaf, welches ob der Größe seiner Knochen geeignet ist, Studien im Hinblick auf humanmedizinische Anwendbarkeit durchzuführen. Osteoporose soll nicht mit dem Ziel induziert werden, eine der humanen Osteoporose vergleichbare Ätiologie und Pathogenese widerzuspiegeln, sondern um einen Knochenmasseverlust zu erzeugen, der geeignet ist, den Heilungsverlauf osteoporotischen Knochens nach Fraktur darzustellen.

Ziel dieser Arbeit ist es, unterschiedliche Heilungsverläufe in osteoporotischem und gesundem Knochen mit Hilfe von biochemischen Knochenmarkern zu beurteilen und damit möglicherweise die Eignung des Tiermodells „Schaf“ für chirurgische bzw. orthopädische Fragestellungen überprüfen zu können. Bei einer aus sieben Tieren bestehenden Gruppe sollen durch die kombinierte Wirkung von Ovariectomie, calcium- und Vitamin D- reduzierter Fütterung sowie Glucocorticoidmedikation osteoporotische Veränderung am Knochen induziert werden. Eine zweite, ebenfalls aus sieben Tieren bestehende Gruppe soll unbehandelt als Kontrollgruppe dienen. Bei allen Tieren soll eine Tibiaosteotomie durchgeführt und mit Hilfe eines Fixateur externe fixiert werden. In Serum und Urin sollen verschiedene biochemische Marker des Knochenstoffwechsels untersucht werden und den Heilungsverlauf gesunden und osteoporotischen Knochens widerspiegeln.

2 Literaturübersicht

2.1 Definition der Osteoporose unter besonderer Berücksichtigung der Knochendichtemessung mittels Dual energy x-ray absorptiometry (DXA)

Osteoporose, abgeleitet aus dem Griechischen „osteon“ für Knochen und „póros“ für Öffnung, ist definiert als „systemische Skeletterkrankung, die durch eine Verringerung der Knochenmasse und Veränderung der Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist sowie einer daraus folgenden Erhöhung der Knochenbrüchigkeit und des Frakturrisikos“ (National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Panel on Osteoporosis 2001). Von Frakturen besonders betroffen sind mechanisch stark belastete Skelettanteile wie Oberschenkel, Wirbelsäule und Unterarm. Sind bereits ein oder mehrere Knochenbrüche aufgetreten, bezeichnet man gemäß der klinischen Einteilung die Erkrankung als manifeste Osteoporose.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schlägt eine Klassifizierung anhand der Quantifizierung des Knochenmineralgehalts von Lendenwirbelsäule und/oder proximalem Femur (Gesamtareal oder Schenkelhals) mittels Dual energy x-ray absorptiometry (DXA) vor, nach der eine Osteoporose bei einem gemessenen T-Wert von unter -2,5 vorliegt und eine manifeste Osteoporose, wenn zugleich eine oder mehrere Frakturen aufgetreten sind (Kanis et al. 2000a, Johnell und Hertzman 2006). Der T-Wert beschreibt die Differenz des gemessenen Wertes zum Mittelwert eines jungen, gesunden weiblichen Kontrollkollektivs in Standardabweichungen.

Normale Knochendichte	T-Score > -1
Osteopenie	T-Score < -1 und > -2,5
Osteoporose	T-Score < -2,5
Manifeste Osteoporose	T-Score < -2,5 und Fragilitätsfraktur(en)

Abbildung 1:
Osteoporosedefinition anhand des T-Scores gemäß der Weltgesundheitsorganisation (WHO)

Diese operationale Definition der WHO ist für Frauen nach der Menopause sowie für Männer jenseits des 50. Lebensjahres gültig (DVO-Leitlinie 2006), jedoch nicht anzuwenden für Frauen vor der Menopause, jüngere Männer und Kinder, für welche die International Society for Clinical Densitometry (ISCD) den Altersvergleich empfiehlt. Demnach sollte die Diagnose der Osteoporose mit Hilfe des T-Scores ausschließlich bei postmenopausalen Frauen und bei Männern über 65 Jahren sowie bei Männern zwischen 50 und 64 Jahren, bei denen zusätzliche osteoporosebegünstigende Risikofaktoren vorliegen, erfolgen. Für die Beurteilung der Knochendichte von jüngeren Frauen und Männern sowie Kindern sind den Z-Scores die größere Bedeutung beizumessen (Writing Group for the ISCD 2004). Dient der Z-Score der Einschätzung des Grades des Knochendichteverlustes bzw. der Schwere der Erkrankung, wird die gemessene Knochendichte mit Werten gleich alter und gleichgeschlechtlicher Personen verglichen.

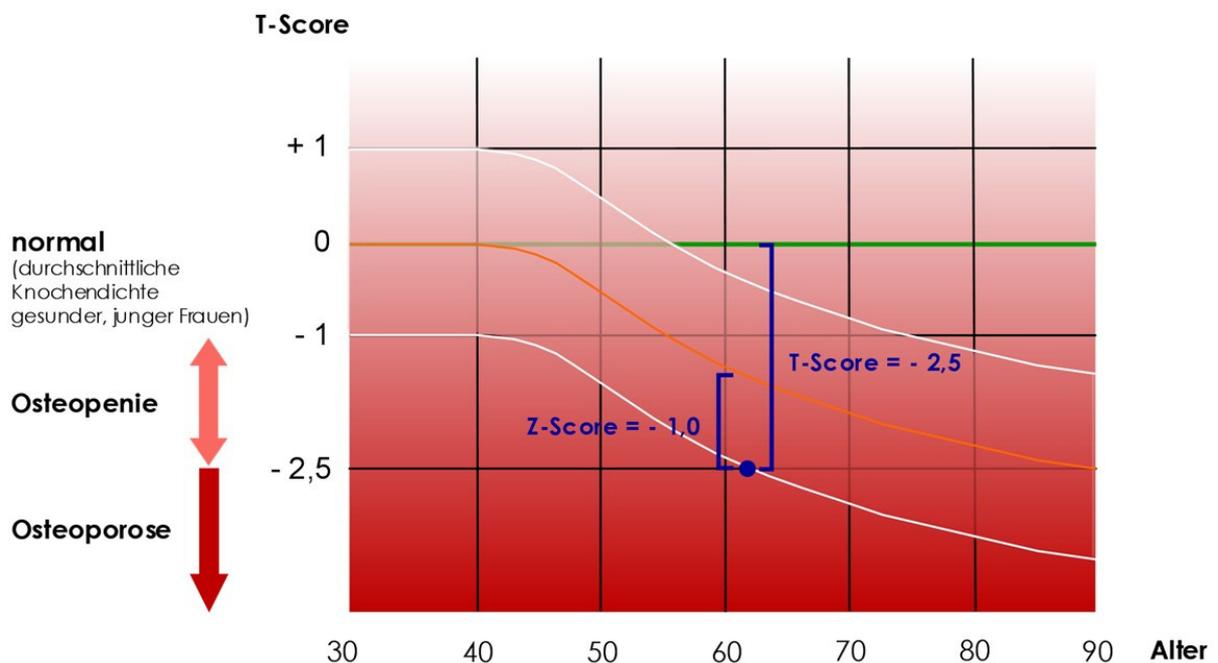


Abbildung 2:

Darstellung von T-Score und Z-Score am Beispiel einer 62-jährigen Frau modifiziert nach Writing Group for the ISCD 2004. Der durchschnittliche, mit dem Alter abfallende Wert der Knochendichte ist als orangefarbene Linie dargestellt. Der Bereich zwischen einer Standardabweichung unter bzw. über dem Mittel als transparente Fläche zwischen den weißen Linien. Die grüne Linie zeigt die durchschnittliche Knochendichte gesunder, junger Frauen („peak bone mass“).

Die von der WHO vorgeschlagene Verwendung des T-Scores, bei dem junge gesunde Frauen als Referenzgruppe dienen, birgt den Vorteil, dass nach dieser Definition die Prävalenz von Osteoporose exponentiell mit zunehmendem Alter ansteigt, wie auch die Frakturwahrscheinlichkeit mit dem Alter steigt und die durchschnittliche Knochendichte abnimmt (Kanis 2000, Department of Health and Human Services 2004). Die Verwendung des Z-Scores ist für die Osteoporosediagnostik nur bedingt geeignet, da Z-Scores trotz abfallender Knochendichte während des gesamten Lebens konstant bleiben können und demnach die Osteoporoseprävalenz mit dem Alter nicht ansteigen würde (Kanis 2000). Wenn die durchschnittliche Knochendichte des Kontrollkollektivs in hohem Alter also gering ist, kann der Z-Score einer Einzelperson diesen Werten entsprechen, obwohl Osteoporose vorliegt. Gleichwohl liefert die Bestimmung des Z-Scores wichtige Hinweise auf die Knochengesundheit, nicht nur bei Kindern, bei denen der T-Score vor Erreichen der maximalen Knochendichte („peak bone mass“) keine Anwendung finden sollte (Department of Health and Human Services 2004), sondern auch, um bei Erwachsenen die Abweichung der Knochendichte vom Durchschnitt gleichaltriger Personen desselben Geschlechts zu ermitteln. Der Faktor Alter kann somit für die Risikoeinschätzung osteoporotischer Frakturen berücksichtigt werden. Bei ausschließlich auf T-Scores basierender Diagnosestellung ist außerdem zu beachten, dass Standardisierung und Qualitätssicherung für DXA-Messungen noch nicht vollständig ausgereift sind und es derzeit Unterschiede hinsichtlich der verwendeten Referenzkollektive sowie der gerätespezifischen Werte und Messtechniken gibt (Binkley et al. 2005).

Die umfangreichste, auf der WHO-Definition basierende Datenerhebung für weiße Frauen im Alter zwischen 20 und 29 Jahren wurde in den USA vorgenommen (The Third National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES III) und wird derzeit als Referenzdatenbank von der International Osteoporosis Foundation (IOF) empfohlen (Kanis und Gluer 2000). Bei der Wahl des Referenzkollektivs ist dennoch zu beachten, dass sich bei gleicher gemessener Knochendichte das Frakturrisiko zwischen Menschen verschiedener ethnischer Herkunft unterscheidet und diesem Sachverhalt durch bevölkerungsspezifische Referenzdaten Rechnung getragen werden kann (Kanis 2000).

Auch hinsichtlich der Frage, welche Referenzkollektive bei der Beurteilung der Knochendichte von Männern verwendet werden sollten, besteht derzeit keine absolute Übereinstimmung (Lombardi und Ross 2001). Während gemäß des Dachverbandes für Osteologie (DVO) die Definition der WHO auch auf Männer jenseits des 50. Lebensjahres zu übertragen ist, schlägt die ISCD für die Beurteilung der Knochendichte bei Männern die Verwendung eines männlichen Kontrollkollektivs vor (DVO-Leitlinie 2006, Writing Group for the ISCD 2004). Die Prävalenz von Osteoporose bei Männern erscheint dadurch etwas höher, jedoch ist dieser Unterschied gering (Kanis et al. 2004c). Da die insgesamt Inzidenz für Hüftfrakturen bei Männern niedriger ist als bei Frauen, sind - zumindest für Fragestellungen hinsichtlich therapeutischer Entscheidungen - die gleichen Schwellenwerte für Männer und Frauen zu verwenden (De Laet et al. 2002). Die Ergebnisse aktueller Studien belegen, dass sowohl bei Frauen als auch bei Männern desselben Alters mit jeder Veränderung der Knochenmineraldichte eine vergleichbare Veränderung des Risikos für Hüft- und Wirbelfrakturen einhergeht und aus diesem Grund auch für die Diagnose der Osteoporose die gleichen Schwellenwerte herangezogen werden können (Kanis et al. 2004c, Seeman et al. 2006).

Für die Beurteilung der Knochendichte sind weitere bildgebende Verfahren (wie z.B. konventionelle Radiographie, quantitative Computertomographie, quantitative Sonographie oder Magnetresonanztomographie) teilweise sehr gut etabliert, die differenzierte Aussagen über die Knochengesundheit an verschiedenen Skelettlokalisationen erlauben. Die Kriterien, die die WHO zur Klassifizierung von Osteoporose vorschlägt, sind jedoch nicht uneingeschränkt für andere Techniken und Messorte gültig (Kanis et al. 2000b), nicht zuletzt aufgrund des höheren Standardisierungsgrades der DXA-Messung an Lendenwirbelsäule oder Femur und des hohen prädiktiven Wertes der an der Hüfte gemessenen Knochendichte hinsichtlich des Frakturrisikos (Marshall et al. 1996).

2.2 Knochendichte und Knochenqualität

Densitometrische Verfahren stellen derzeit die wichtigsten nicht invasiven diagnostischen Mittel dar. Knochendichte und Alter, welche durch die Ermittlung der T- und Z-Scores mit Hilfe der Knochendichtemessung Berücksichtigung finden, sind zwei bedeutsame Risikofaktoren für die Entstehung der Erkrankung. Dennoch lassen sich hiermit lediglich Voraussagen über das relative Frakturrisiko treffen. Entscheidend für das absolute Frakturrisiko ist jedoch nicht allein die Knochendichte, sondern auch Strukturparameter des Knochens wie die Mikroarchitektur, welche in der histopathologisch ausgerichteten Definition der NIH berücksichtigt sind, nehmen großen Einfluss auf die Knochengesundheit und werden derzeit noch hauptsächlich über klinische Risikofaktoren erfasst (Kanis et al. 2005a). In der Regel geht eine Reduktion der Knochendichte zwar mit einer Störung der Mikroarchitektur einher, wobei jedoch das Ausmaß sehr unterschiedlich ausfallen kann. Die Messung der Knochendichte sollte in Kombination mit der Erfassung struktureller Parameter des Knochens erfolgen (Parkinson und Fazzalari 2003).

Sowohl Knochendichte als auch Knochenqualität sind wichtige Determinanten der Knochenfestigkeit (NIH 2001, Lamichhane 2005). Eine eindeutige Definition des Begriffes „Knochenqualität“ liegt derzeit noch nicht vor, könnte aber neben Zusammensetzung und Ausmaß des Mineralgehaltes Eigenschaften der Matrix (z.B. Collagen 1), der trabekulären (z.B. Dicke und Konnektivität) und kortikalen Struktur (Dicke), der Anhäufung von Mikrofrakturen, der Rate des Knochenumsatzes und schließlich auch makroarchitektonische Merkmale wie Form und Größe des Knochens umfassen (Seeman 2003a, Heaney 2003).

2.3 Knochenstoffwechsel und biochemische Knochenmarker

In diesem Zusammenhang könnten biochemische Marker des Knochenstoffwechsels zukünftig eine Schlüsselrolle einnehmen, da eine gesteigerte Knochenumsatzrate als potentieller Risikofaktor für osteoporotische Frakturen angenommen wird (Garnero und Delmas 2004, Melton et al. 1997). Prospektive Studien ließen einen von der Knochenmineraldichte unabhängigen Zusammenhang zwischen osteoporotischen

Frakturen und Indizes des Knochenumsatzes bei Frauen nach der Menopause erkennen (Garnero und Delmas 1996, Johnell et al. 2002).

Knochen ist ein stoffwechselaktives Organ und unterliegt nach Abschluss des Wachstums („modeling“) einem ständigen Umbau („remodeling“). In einer geordneten Abfolge, als „coupling“ bezeichnet, wird Knochengewebe von Osteoklasten resorbiert und neue Knochenmatrix, die anschließend mineralisiert wird, von Osteoblasten produziert (Sambrook und Cooper 2006). Unter normalen Bedingungen sind Knochenresorption und Knochenformation eng aneinander gekoppelt, wobei die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts durch systemische Hormone (z.B. Parathormon, Vitamin D-Hormon, weitere Steroidhormone) und lokale Mediatoren (z.B. Cytokine, Wachstumsfaktoren) gewährleistet wird. Verschiebt sich das Gleichgewicht des Remodelingprozesses zugunsten der Resorption, beispielsweise infolge des rückläufigen Östrogenspiegels nach der Menopause, ist ein Verlust an Knochenmasse die Folge. Nicht nur eine übersteigerte Knochenresorption, auch eine unzureichende Knochenformation nach stattgehabter Resorption innerhalb des Remodelingprozesses kann die Knochenmasse vermindern (Priemel et al. 2006).

Die Dynamik des Remodeling bzw. Knochenumsatzes wird durch in Serum und Urin messbare Konzentrationen verschiedener biochemischer Parameter des Knochenstoffwechsels widerspiegelt. Obwohl diese sog. Marker des Knochenstoffwechsels sowohl Enzyme als auch nicht-enzymatische Peptide umfassen, werden sie entsprechend dem metabolischen Vorgang, den sie reflektieren, klassifiziert in Formationsmarker und Resorptionsmarker (Seibel 2006a). Nachfolgende Tabellen geben eine Übersicht über die derzeit messbaren biochemischen Knochenstoffwechselmarker.

Tabelle 1:

Übersicht über derzeit messbare Marker der Knochenformation, modifiziert nach Seibel 2005

Marker der Knochenformation		
Marker	Gewebeherkunft	Untersuchungsmaterial
Alkalische Phosphatase (AP)	Knochen, Leber, Darm, Niere, Plazenta	Serum oder Plasma
Knochenspezifische alkalische Phosphatase (bAP)	Knochen	Serum oder Plasma
Osteocalcin (OC)	Knochen, Blutplättchen	Serum oder Plasma
Carboxyterminales Propeptid des Typ I Procollagen (PICP)	Knochen, Bindegewebe, Haut	Serum oder Plasma
Aminoterminalen Propeptide des Typ I Procollagen (PINP)	Knochen, Bindegewebe, Haut	Serum oder Plasma

Die meisten Parameter der Knochenneubildung sind von Osteoblasten synthetisierte Proteine, wie das knochenspezifische Isoenzym der alkalischen Phosphatase und Osteocalcin oder Produkte des neugebildeten Collagens, wie die carboxy- und aminoterminalen Propeptide des Typ-I-Collagens, welche von Osteoblasten und Fibroblasten synthetisiert werden. Einige Marker der Knochenresorption sind Abbauprodukte des Collagens, wie z. B. die Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin, die carboxy- und aminoterminalen quervernetzten Telopeptide und Hydroxyprolin, die in die Blutbahn freigesetzt und mit dem Urin ausgeschieden werden (Seibel 2005). Weitere Marker der Knochenresorption sind nicht collagene Proteine der Matrix wie Bone Sialo Protein oder die osteoklastenspezifischen Enzyme tartratresistente saure Phosphatase und Cathepsin K und L.

Die Calciumausscheidung im Urin ist stark von der täglichen Calciumzufuhr abhängig und kann hinsichtlich der Beurteilung der Knochenresorption nur eventuell als zusätzliche Informationsquelle dienen.

Tabelle 2:

Übersicht über derzeit messbare Marker der Knochenresorption, modifiziert nach Seibel 2005

Marker der Knochenresorption		
Marker	Gewebeherkunft	Untersuchungsmaterial
Abbauprodukte des Collagens		
Hydroxyprolin	Knochen, Knorpel, Weichteile, Haut	Urin
Hydroxylysin	Knochen, Weichteile, Haut, Komplementfaktoren	Urin (oder Serum)
Pyridinolin (PYD)	Knochen, Knorpel, Sehnen, Gefäßwände	Urin oder Serum
Desoxypyridinolin (DPD)	Knochen, Dentin	Urin oder Serum
C-terminale quervernetzte Telopeptide des Typ-1-Collagens (ICTP, CTX-MMP)	Knochen, Haut	Serum
C-terminales quervernetztes Telopeptid des Typ-1-Collagens (CTX-1)	Alle Typ-1-Collagen enthaltende Gewebe	Urin, Serum (nur β - Isomer)
C-terminales quervernetztes Telopeptid des Typ-1-Collagens (NTX-1)	Alle Typ-1-Collagen enthaltende Gewebe	Urin oder Serum
Nicht collagene Proteine		
Bone Sialoprotein (BSP)	Knochen, Dentin, hypertropher Knorpel	Serum
Osteocalcin-Fragmente	Knochen	Urin
Osteoklasten-Enzyme		
Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAcP)	Knochen, Blut	Serum oder Plasma
Cathepsin K	Osteoklasten	Serum oder Plasma
Cathepsin L	Makrophagen, Osteoklasten	Serum oder Plasma

2.4 Möglichkeiten und Grenzen biochemischer Knochenmarker

Die biochemischen Knochenstoffwechsellmarker können wichtige Einblicke in die Dynamik des Knochenstoffwechsels liefern, dennoch sind sie immer unter Berücksichtigung ihrer jeweiligen Charakteristika sowie im klinischen Zusammenhang zu betrachten.

Einige der als Knochenstoffwechsellmarker bezeichneten Verbindungen sind auch in extraskelettalen Geweben vorhanden und unterliegen daher den Einflüssen anderer Prozesse. Zudem sind Veränderungen des Knochenstoffwechsels nicht spezifisch für eine bestimmte Erkrankung, sondern reflektieren Veränderungen im Stoffwechsel des gesamten Skeletts, unabhängig von der zugrundeliegenden Ursache (Seibel 2005). So wurde zum Beispiel kürzlich nachgewiesen, dass die meisten Knochenstoffwechsellmarker, insbesondere die der Resorption, bei Patienten mit Tumormetastasen im Knochen erhöht sind und eine Reaktion der Marker auf tumorspezifische Therapie erfolgt (Brown et al. 2005, Chen et al. 2002a). Dennoch lassen sich derzeit keine endgültigen Schlussfolgerungen hinsichtlich Präzision und Aussagekraft der Markermessungen bei Krebspatienten treffen (Seibel 2006b).

Auch weisen die meisten Knochenmarker eine hohe, nichtspezifische Variabilität auf, der verschiedene Ursachen zugrunde liegen. Während präanalytische und analytische Faktoren wie zum Beispiel Entnahmezeitpunkt der Proben (circadiane Rhythmik einiger Marker), Beachtung der UV-Licht- und Temperaturempfindlichkeit einiger Marker, Wahl des Analyseverfahrens und technische Ausführung im Vorfeld berücksichtigt werden müssen, sind biologische Ursachen der Variabilität häufig unveränderbar. Nicht nur Alter und Geschlecht bedingen Unterschiede in den Konzentrationen der Knochenstoffwechsellmarker, sondern auch Faktoren wie Biorhythmus (z.B. Jahreszeit, Zyklusstadium) und nicht skelettale Erkrankungen (z.B. eingeschränkte Nierenfunktion) müssen in der Interpretation Berücksichtigung finden (Seibel 2005).

Wenn auch derzeit noch keine verbindlichen Richtlinien für den breiten Einsatz von biochemischen Parametern des Knochenstoffwechsels verfügbar sind, ist dennoch deren potentieller Nutzen im Zusammenhang mit der Erkrankung Osteoporose

unumstritten. Es ist allgemein anerkannt, dass Knochenstoffwechselmarker nicht nur bedeutende Informationen bezüglich der weiteren Erforschung pathogenetischer Grundlagen, sondern auch hinsichtlich der Einschätzung des Frakturrisikos, der Identifizierung von Personen mit erhöhtem Knochenumsatz und der Beurteilung der Therapieeffektivität liefern können (Hodgson et al. 2001, North American Menopause Society 2002, National Osteoporosis Foundation (NOF) 2003). Insbesondere hinsichtlich der Therapiekontrolle erscheint der Einsatz biochemischer Knochenstoffwechselmarker sehr attraktiv, da signifikante Veränderungen im Knochenumsatz ungleich schneller (nach 3 – 6 Monaten) nachweisbar sind als Veränderungen der Knochendichte, welche häufig erst nach 1 - 2 Jahren darzustellen sind (Cummings und Melton 2002, Srivasta et al. 2005, Bonnicks und Shulman 2006).

2.5 Risikofaktoren, die die Entstehung von Osteoporose und das Auftreten osteoporotischer Frakturen begünstigen

Die große Bedeutung densitometrischer Verfahren für Diagnose, Beurteilung des Frakturrisikos und Therapieverlaufskontrolle ist unangefochten. Dennoch müssen verschiedene messtechnisch erfassbare Parameter und klinische Risikofaktoren im Zusammenhang betrachtet und teilweise noch etabliert werden, um eine bessere Vorhersage für Frakturen, welche das Hauptproblem der Osteoporose darstellen, treffen zu können.

Nachfolgend sind bedeutende Risikofaktoren für Osteoporose oder osteoporotisch bedingte Frakturen tabellarisch aufgelistet, von denen ausgewählte anschließend näher erläutert werden.

Tabelle 3:
Risikofaktoren, die die Entstehung von Osteoporose und das Auftreten osteoporotischer Frakturen begünstigen

Risikofaktor	Beispiel	modifizierbar
Niedrige Knochendichte	T-Score mehr als 1 SD unter dem Kontrollkollektiv	teilweise
Genetische Disposition	Vitamin-D-Rezeptor Genotyp	nein
Ethnische Zugehörigkeit	Kaukasisch („weiß“)	nein
Familienanamnese (Frakturen)	Proximale Femurfraktur bei Mutter oder Vater	nein
Prävalente Fragilitätsfrakturen	Wirbelkörperfrakturen	nein
Niedriges Körpergewicht	Body Mass Index (BMI) unter 20 (Frauen) bzw. 24 (Männer)	ja
Bewegungsmangel und Immobilisation	Paraplegie, Frakturen, längere Bettruhe	teilweise
Sturzneigung	Vermindertes Sehvermögen, Epilepsie, Beeinträchtigung durch Medikamente, Muskelschwäche	teilweise
Genussmittel	Alkohol, Nikotin, Coffein	ja
Ernährung	Mangel an Calcium, Vitamin D, Vitamin K	ja
Geringe UV-Licht-Exposition	In den Wintermonaten	ja
Toxine	Cadmium, Aluminium	ja
Lebensalter und Geschlecht	Höheres Lebensalter, weibliches Geschlecht	nein
Hormonelle Imbalancen	Später Beginn der Pubertät oder frühes Einsetzen der Menopause	teilweise
Medikamente	Glucocorticoide	teilweise
Erkrankungen und Stoffwechselstörungen	Hypogonadismus, Malabsorptionssyndrom	teilweise

2.5.1 Niedrige Knochendichte

Der Risikofaktor „erniedrigte Knochendichte“ entsteht nicht allein durch exzessiven Knochenmasseverlust infolge gesteigerter Knochenresorption oder verminderter Knochenneubildung, sondern kann auch in einer unzureichenden maximalen Knochenmasse („peak bone mass“) begründet sein (Riggs und Melton 1986, Cooper et al. 1992b, Bonjour et al. 1994, Mora und Gilsanz 2003). Die maximale Knochenmasse wird bei Frauen und Männern in der dritten Lebensdekade erreicht, wobei der größte Zuwachs während der Pubertät erfolgt (Cooper et al. 1992b). Männer erreichen aufgrund von Unterschieden in Größe und Länge eine höhere maximale Knochenmasse als Frauen (Seeman 1993), die ebenso wie der größere Durchmesser der Kortikalis zu einer höheren Knochenfestigkeit beiträgt (Seeman 1999). Die maximale Knochendichte scheint jedoch bei Männern und Frauen ähnlich zu sein, wenn die Knochengröße bei der densitometrischen Messung Berücksichtigung findet (Seeman 1993, Orwoll und Klein 1995). Etwa ab dem 40. Lebensjahr beginnt bei beiden Geschlechtern ein progressiver Knochenmasseverlust von etwa 0,4 % jährlich, welcher bei Frauen in den ersten 5 - 10 Jahren nach der Menopause aufgrund des Östrogenabfalls noch um weitere 1 - 2 % pro Jahr verstärkt wird (Manolagas 2000a). Determinierend für das Ausmaß der erreichten Knochenmasse sind nicht alleine genetische und hormonelle Faktoren, sondern auch zahlreiche Einflüsse in Kindheit und Pubertät, wie z.B. Ernährung und körperliche Betätigung (Mora und Gilsanz 2003). Sogar während der intrauterinen Entwicklung scheinen Lebensgewohnheiten der Mutter diesbezüglich von Bedeutung zu sein (Javaid und Cooper 2002).

2.5.2 Genetische Disposition

Dennoch scheinen genetische Faktoren eine bedeutende Rolle in der Entstehung der Osteoporose zu spielen (Cooper 1999b). Knochendichte und Knochenstoffwechsel werden von zahlreichen Genen determiniert, wobei Interaktionen zwischen verschiedenen Genen oder zwischen Genen und Umwelt von großer Bedeutung sind (Carbonell et al. 2005). Der Beitrag der genetischen Disposition zur Osteoporoseentstehung wird mit 50 – 80 % angegeben (Carbonell et

al. 2005). Additive Geneffekte erklären 60 – 80 % der Unterschiede der maximalen Knochendichte (Eisman 1999). Der genetische Einfluss auf das Ausmaß des Knochenumsatzes und Knochenverlustes nach der Menopause ist weniger gut evaluiert und könnte mit 40 – 80 % etwas geringer sein (Garnero et al. 1996). Viele Gene, wie zum Beispiel das Vitamin-D-Rezeptor (VDR)-Gen oder die Östrogenrezeptor-Gene, sind als Determinanten der Knochenmasse identifiziert, wenn auch noch nicht bekannt ist, ob zum Beispiel VDR-Genotypen signifikant zum Frakturrisiko bei älteren Menschen beitragen (Ferrari 2005). Die molekulare Grundlage der Osteoporose ist noch nicht abschließend definiert (Ralston und Crombrugge 2006). Klinische Anwendungsmöglichkeiten könnten in der Beurteilung des Frakturrisikos und Entwicklung neuer Medikamente liegen (Ferrari 2005, Ralston 2005).

2.5.3 Ethnische Herkunft und geographische Variabilität

In diesem Zusammenhang ist auch die ethnische Herkunft von Bedeutung. Kaukasische (weiße) postmenopausale Frauen haben ein höheres Risiko für osteoporotische Frakturen als asiatische, schwarze und südamerikanische Frauen (DVO-Leitlinie 2006). Die Knochenmasse schwarzer postmenopausaler Frauen ist höher als die hispanischer oder kaukasischer Frauen, wohingegen aber asiatische Frauen (auch nach Adjustierung auf Körpergröße) eine niedrigere Knochenmasse als weiße Frauen haben. Demnach sind Rückschlüsse von der Knochenmasse auf das Frakturrisiko nicht ohne weiteres zu ziehen (Barret-Connor et al. 2005). Unterschiede in Körpergröße und -gewicht, Größe der Knochen und Geometrie der Hüfte sowie das Ausmaß des Knochenverlustes könnten eine Erklärung dafür sein (Barret-Connor et al., 2005). Wenn sich auch die Prävalenz niedriger Knochendichte und das absolute Frakturrisiko zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen unterscheidet, steigt dennoch innerhalb jeder ethnischen Gruppe das Frakturrisiko mit abfallender Knochendichte (Binkley et al. 2002).

Hinsichtlich der Inzidenz von Hüftfrakturen scheint den Ergebnissen mehrerer Studien zufolge (Schwartz et al. 1999, Cooley und Jones 2001, Norton et al. 1997) eine breite geographische Variation sowohl zwischen als auch innerhalb verschiedener Länder zu existieren. Die höchsten Frakturraten wurden für die nordeuropäischen Länder und

die USA, und die niedrigsten für Afrika und einige asiatische Länder angegeben. Abgesehen von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen, wie zum Beispiel dem Ausmaß der UV-Licht-Exposition oder Ernährungsgewohnheiten, könnten diese Differenzen jedoch zusätzlich auf Unterschieden in der Datenerhebung begründet sein (WHO Scientific Group 2003, Chang et al. 2004).

2.5.4 Familienanamnese

Auch das Auftreten von familiär gehäuften Frakturen infolge eines geringen Traumas sollte in die Risikobeurteilung einbezogen werden (Lamichane 2005). Aufgrund der bislang unzureichenden Datenlage empfiehlt jedoch der DVO, lediglich die Anamnese proximaler Femurfrakturen bei Mutter oder Vater in die Risikobeurteilung zu integrieren. Dieser wird als prognostisch zuverlässiger Faktor des genetischen Risikos für osteoporotische Frakturen angenommen (DVO-Leitlinie 2006).

2.5.5 Fragilitätsfrakturen

Vorausgegangene Fragilitätsfrakturen gelten bei postmenopausalen Frauen und älteren Männern als bedeutende Indikatoren für osteoporotische Frakturen (Haentjens et al. 2003, Ettinger et al. 2003). Den höchsten prädiktiven Wert für eine zukünftige Fraktur hat ein prävalenter atraumatischer Wirbelkörperbruch und stellt einen starken unabhängigen Risikofaktor dar (Delmas et al. 2003, Van der Klift et al. 2004, Kanis et al. 2004b). Auch die Ergebnisse anderer Studien legen nahe, dass stattgefundenen Wirbelfrakturen und die Messung der Knochendichte - einzeln oder in Kombination - die Identifizierung von Patienten mit hohem Frakturrisiko erlauben (Ross et al. 1993, Bensen et al. 2005). Die Höhe des Risikos hängt von der Anzahl der gegenwärtigen Wirbelbrüche ab: Bei einer einzelnen Wirbelfraktur scheint sich das Risiko für eine zukünftige Wirbelfraktur zu verdreifachen, bei zwei prävalenten Wirbelbrüchen ist das Risiko 10-fach und bei drei oder mehr Wirbelfrakturen 20-fach erhöht (The EPOS Study Group 2002, Lunt et al. 2003). In den ersten Jahren nach Auftreten einer Fraktur scheint das Risiko deutlich höher zu sein als in späteren Jahren (Johnell et al. 2003). Inwieweit periphere Knochenbrüche ebenfalls als starker

unabhängiger Risikofaktor für Frakturen zu bewerten sind, ist noch nicht abschließend geklärt. In einer 11 Kohortenstudien umfassenden Metaanalyse fand sich jedoch ein um 1,86-fach erhöhtes Risiko nach vorausgegangener Fraktur, welches nur in geringem Maße durch die Knochendichte zu erklären war (Kanis et al. 2004b).

2.5.6 Niedriges Körpergewicht

Untergewicht (Body mass index < 20 bei Frauen, < 24 bei Männern (Bakhireva et al. 2004)) ist ebenfalls ein Risikofaktor für Osteoporose und Frakturen, der vorwiegend über eine Erniedrigung der Knochendichte zu erklären ist. Bei prä- und perimenopausalen Frauen wurden Risikofaktoren für das Vorhandensein von geringer Knochendichte untersucht, wobei ein starker Zusammenhang zwischen niedrigem Körpergewicht und geringer Knochendichte festgestellt wurde (Bainbridge et al. 2004). In einer Meta-Analyse konnte aufgezeigt werden, dass ein niedriger Körpermasseindex einen bedeutenden Risikofaktor für alle Frakturen darstellt, der weitgehend unabhängig von Alter und Geschlecht, aber abhängig von der Knochendichte ist (De Laet et al. 2005). Nicht nur Untergewicht, auch Gewichtsverlust von über 1 % jährlich, ist bei älteren Menschen mit zunehmendem Knochenverlust und erhöhtem Frakturrisiko assoziiert (Ensrud et al. 2003, Knoke und Barrett-Connor 2003). Als Ursachen für diese Zusammenhänge werden eine verminderte periphere Östrogenproduktion im Fettgewebe und die geringere mechanische Beanspruchung vermutet (WHO Scientific Group 2003). Auch die verminderte Produktion des insulinähnlichen Wachstumsfaktors IGF-1 (Insulin like growth factor 1) bei Unterernährung und insbesondere Proteinmangelernährung begünstigt eine Verringerung der Knochendichte (Thissen et al. 1994, Rizzoli und Bonjour 1999). Aufgrund der komplexen knochenanabolen Wirkungsmechanismen des IGF-1 ist eine verminderte Aktivität ein bedeutender Faktor in der Pathogenese der Osteoporose (Zofková 2003). Bei jugendlichen Patienten mit Anorexia nervosa sind die Folgen von Unterernährung und verminderten IGF-1-Serumspiegeln besonders gravierend, da in dieser Zeitspanne der Hauptanteil der später erreichten maximalen Knochendichte ausgebildet wird (Hotta et al. 2000).

2.5.7 Verminderte körperliche Aktivität und Immobilisation

Sowohl Knochendichte als auch einige Parameter der Knochenqualität sind durch mechanische Beanspruchung des Knochens beeinflussbar. Körperliche Betätigung scheint nicht nur während Kindheit und Jugend einen Einfluss auf die maximale Knochenmasse zu haben, sondern auch bei älteren Menschen die Knochendichte zu erhöhen und dem Knochenmasseverlust entgegenzuwirken (Warburton et al. 2006). Auch das Risiko für proximale Femurfrakturen und Wirbelkörperfrakturen scheint sich durch körperliche Aktivität zu verringern (Cummings et al. 1995, Chan et al. 1996, Nevitt et al. 2005). Die Ergebnisse einer Studie zeigten bei postmenopausalen Frauen, die 4 Stunden pro Woche einer moderaten körperlichen Betätigung nachgingen, ein um 41 % verringertes Risiko für eine proximale Femurfraktur gegenüber Frauen mit einer Stunde Bewegung pro Woche (Feskanich et al. 2002). Dementsprechend ist Immobilität eine bedeutende Ursache für Knochenmasseverlust und einer der wichtigsten Risikofaktoren für Osteoporose (WHO Scientific Group 2003). Die sogenannte Inaktivitätsosteoporose ist charakterisiert durch lokalen oder generalisierten Knochenverlust nach verminderter mechanischer Einwirkung auf den Knochen (Takata und Yasui 2001). Auf mechanische Belastungsreize hin vermitteln Osteozyten über „gap junctions“ mit Hilfe intra- und extrazellulärer Transmitter die Induktion der Knochenformation und Hemmung der Knochenresorption (Lanyon 1993, Takata und Yasui 2001). Infolgedessen erfolgt bei fehlender Belastung eine forcierte Knochenresorption, aufgrund der höheren Stoffwechselaktivität von trabekulärem Knochen insbesondere in Knochen mit hohem trabekulärem Anteil (Takata und Yasui 2001). Besondere Bedeutung hat die Inaktivitätsosteoporose z.B. im Zusammenhang mit Querschnittslähmung, längerer Bettruhe und Frakturen.

2.5.8 Nikotinkonsum

Nikotinkonsum hat einen negativen Einfluss auf die Knochendichte und erhöht das Osteoporoserisiko sowie das Risiko für alle osteoporotischen Frakturen sowohl bei Frauen als auch bei Männern (Kanis et al. 2005c). Auch für ehemalige Raucher scheint im Vergleich zu Nichtrauchern noch ein erhöhtes Frakturrisiko zu bestehen,

welches aber geringer als das für gegenwärtige Raucher ist (Kanis et al. 2005c). Die zugrunde liegenden Ursachen sind vielfältig und noch nicht restlos geklärt. Bei Frauen ist der antiöstrogene Effekt von großer Bedeutung (Tanko und Christiansen 2004), welcher vermutlich in erster Linie auf einen veränderten Östrogenmetabolismus in der Leber zurückzuführen ist (Kapoor und Jones 2005). Östrogen wird vermehrt zu 2-Hydroxyöstron metabolisiert, welches nur eine schwache östrogene Wirkung und infolgedessen eher einen antiöstrogenen Effekt hat. Auch die verminderte Calciumabsorption bei Rauchern und die veränderten Parathormon- und Calcitriol-Spiegel scheinen eine große Rolle zu spielen (Kapoor und Jones, 2005), ebenso wie erhöhte Cortisolkonzentrationen (Friedman et al. 1987). Des Weiteren werden direkte Auswirkungen der verschiedenen Toxine auf den Knochen in Erwägung gezogen (Kapoor und Jones 2005). Bei ovariectomierten Ratten wurde ein negativer Effekt von polyzyklischen aromatischen Hydrocarbonen (PAHs) auf Knochendichte und Strukturparameter nachgewiesen (Lee et al. 2002). Bei weiblichen und männlichen Rauchern wurden erhöhte Werte der von der Nebennierenrinde synthetisierten Androgene Androstendion und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) nachgewiesen, welche möglicherweise über eine antiöstrogene Wirkung ebenfalls zu der Verminderung der Knochendichte beitragen könnten (Khaw et al. 1988, Salvini et al. 1992, Hautanen et al. 1993, Kapoor und Jones 2005). Die Ergebnisse einer anderen Studie, in der die Wirkung von oralem DHEA auf den Knochenstoffwechsel junger Anorexia-nervosa-Patientinnen untersucht wurde, lassen jedoch eine anabolische und antiresorptive Wirkung des DHEA vermuten (Gordon et al. 2002).

2.5.9 Exzessiver Alkoholkonsum

Exzessiver Alkoholkonsum in Mengen von mehr als 30 g täglich ist ein weiterer Risikofaktor für Osteoporose und osteoporotische Frakturen (Laitinen und Valimaki 1991, Bainbridge et al. 2004, Turner 2000). In einer Metaanalyse wurde ab einem gewissen Schwellenwert ein signifikanter Anstieg des Risikos osteoporotischer Frakturen bei Frauen und Männern beobachtet, der von Alter und Knochendichte unabhängig war; bei geringem Alkoholkonsum konnte dieser Zusammenhang nicht belegt werden (Kanis et al. 2005b). Moderater Alkoholgenuss scheint sogar eher einen protektiven Einfluss auf die Knochengesundheit zu haben (Bainbridge et al.

2004), insbesondere bei postmenopausalen Frauen (Turner 2000). Diese Beobachtung könnte mit einer Verminderung der altersbedingt erhöhten Remodeling-Rate zusammenhängen (Turner 2000). Ergebnisse einer anderen Studie hingegen lassen vermuten, dass bei regelmäßigem Genuss selbst moderate Alkoholmengen mit verminderter Knochenmasse assoziiert sind (Klein 1997). Die alkoholinduzierte Osteopenie scheint auf eine Verminderung der Knochenformation, nicht aber auf eine Steigerung der Knochenresorption zurückzuführen zu sein (Chakkalakal 2005, Turner 2000, Klein 1997). In Zellkulturen wurde ein dosisabhängiger toxischer Effekt auf die Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten nachgewiesen (Chakkalakal 2005, Turner 2000). Zudem wird eine modulierende Wirkung auf Hormone des Mineralstoffwechsels diskutiert (Sampson 1997). Auch die Frakturheilung scheint durch Störung der Matrixmineralisation beeinflusst zu werden (Chakkalakal 2005). Im Tierversuch mit männlichen Ratten konnte eine dosisabhängige Beeinträchtigung der Knochenheilung belegt werden (Chakkalakal et al. 2005). Das derzeitige Wissen um die Alkoholwirkung auf zellulärer und molekularer Ebene ist noch unvollständig, insbesondere hinsichtlich zukünftiger Nutzung für Prävention und Therapie (Chakkalakal 2005).

2.5.10 Coffein

Die Frage, ob Coffein den Risikofaktoren für Osteoporose zuzuordnen ist, wird seit langem diskutiert. Coffein in höheren Mengen erhöht die renale Calciumausscheidung (Massey und Whiting 1993), jedoch scheint dieser Verlust bei jüngeren Menschen, nicht aber bei älteren, durch eine gesteigerte Calciumabsorption kompensiert werden zu können (Massey 1998). Die Ergebnisse einiger Studien lassen einen Zusammenhang zwischen Coffeinaufnahme und verminderter Knochendichte vermuten. Beispielsweise wurde bei postmenopausalen Frauen eine Verminderung der Knochendichte am proximalen Femur beobachtet (Cooper et al. 1992a). Andere Studien hingegen können diesen Zusammenhang nicht belegen: Die am proximalen Femur gemessene Knochendichte postmenopausaler Frauen mit hohem (>300 mg/d) und geringem Coffeinkonsum unterschied sich nicht signifikant (Lloyd et al. 2000). In einer aktuellen Studie wurden dosisabhängige Zusammenhänge zwischen der Coffeinwirkung auf den

Knochenstoffwechsel und dem Vitamin D-Rezeptor-Genotyp aufgezeigt, was die Heterogenität der Ergebnisse früherer Studien erklären könnte (Rapuri et al. 2007).

2.5.11 Ernährung

Die Ernährung spielt eine entscheidende Rolle im Zusammenhang mit der Erkrankung Osteoporose. Diätetische Faktoren wirken sich nicht nur auf das Ausmaß der erreichten maximalen Knochendichte, sondern auch auf den altersbedingten Knochenmasseverlust und das Frakturrisiko aus. Zudem sind sie im Gegensatz zu einigen anderen Risikofaktoren beeinflussbar. Infolgedessen sind die Nahrungskomponenten, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen, nicht nur hinsichtlich der Identifizierung von Personen mit erhöhtem Osteoporose- und Frakturrisiko von großem Wert, sondern finden auch in Prävention und Therapie breiten Einsatz. Die größte Bedeutung haben in diesem Zusammenhang Calcium und Vitamin D.

2.5.11.1 Calcium

Knochengewebe besteht zu etwa 65 % aus anorganischem Material. Hiervon entfallen etwa 85 % auf Calciumphosphate (die vorwiegend in Form von Hydroxylapatit vorliegen) und der restliche Anteil auf Calciumcarbonat, Magnesiumphosphat und Calciumfluorid. Die kristalline Struktur der Mineralphase ordnet sich zwischen der Knochenmatrix an und bedingt im Wesentlichen die Stabilität des Skeletts. 99 % des gesamten Calciums sind im Knochen eingelagert, welches somit dem Körper auch als Mineraldepot dient, um die Calciumhomöostase, und damit eine Vielzahl physiologischer Funktionen, aufrechtzuerhalten.

Der hormonellen Steuerung des Calcium- und Phosphathaushaltes dienen in erster Linie Parathormon und Calcitriol, welche über komplexe Wirkungsmechanismen an Darm, Niere und Knochen die Calciumhomöostase aufrechterhalten. Im Zustand der Hypocalcämie bewirkt Parathormon eine Aktivierung der Osteoklasten und

Freisetzung von Calcium (und Phosphat) aus dem Knochen, die Synthese von Calcitriol aus Vitamin D₃ in der Niere, welches die Calciumabsorption im Darm erhöht, sowie eine erhöhte Resorption von Calcium in der Niere. Bei ausgeglichenem Calciumhaushalt wird eine Hypocalcämie über die erhöhte Absorption im Darm kompensiert, und der Knochen dient nur als kurzzeitiger Puffer. Pathologisch erniedrigte Blutcalciumspiegel mit Entmineralisierung der Knochen sind meist auf eine Störung im Parathormon- oder Vitamin-D-Stoffwechsel zurückzuführen, selten aber von der Nahrungscalciumzufuhr abhängig und treten bei den Krankheitsbildern Rachitis bzw. Osteomalazie auf. Bei Osteomalazie wird die im Rahmen des Umbauprozesses gebildete Matrix ungenügend mineralisiert, wohingegen bei der sich im Kindesalter manifestierenden Rachitis zusätzlich die Mineralisation der enchondralen Knochenneubildung an den Wachstumsfugen gestört ist, was zu Skelettdeformationen führt (Bernecker 2004).

Eine Calciumsupplementation könnte aber bei Kindern und Heranwachsenden die Knochendichte erhöhen, und auch die Ergebnisse einer Metaanalyse zeigen einen positiven Zusammenhang zwischen Calciumeinnahme und Knochendichte bei prämenopausalen Frauen auf (Kanis 1999, Welten et al. 1995). Dennoch wird die Frage kontrovers diskutiert, inwieweit eine Erhöhung der Calciumaufnahme mit der Nahrung den Knochenmineralgehalt – zumindest langfristig - erhöhen kann. Zwar scheint sich, abhängig von der Calciumaufnahme, die Knochendichte bzw. der Knochenmineralgehalt bei Kindern und jungen Erwachsenen geringgradig zu verändern; diese Veränderungen sind jedoch reversibel und nicht gleichzusetzen mit Veränderungen in der maximalen Knochenmasse (Kanis 1999). Zahlreiche Studien haben einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Menge des zugeführten Calciums und der Knochendichte bei prä- und postmenopausalen Frauen sowie bei Männern aufgezeigt. Die Ergebnisse waren von mehreren Faktoren abhängig, insbesondere von dem Skelettort, an dem der Knochenmineralgehalt gemessen wurde (Halioua und Anderson 1989, Uusi-Rasi et al. 2001, Uusi-Rasi et al. 2002, Kelly et al. 1990, Tylavski et al. 1992, Reid et al. 1995). Die größte Übereinstimmung scheint hinsichtlich der Auswirkungen von diätetischem Calcium auf das appendikuläre Skelett zu bestehen (WHO Scientific Group 2003). Eine Studie, die den Zusammenhang zwischen Calciumaufnahme und Knochendichte bei Männern

untersuchte, legt allerdings nahe, dass bei Männern die Knochendichte eher an axialen Skelettorten beeinflussbar sei (Kelly et al. 1990).

Eine eindeutigere Situation ergibt sich jedoch in Bezug auf das Ausmaß des Knochenverlustes bei gesteigertem „bone turnover“: Durch erhöhte Calciumaufnahme scheint sich der Knochenverlust zu verlangsamen, was insbesondere bei Menschen in fortgeschrittenem Lebensalter von großer Bedeutung ist (Reid et al. 1993, Fujita et al. 1993). In einer Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass Calciumergänzungen (zwischen 500 und 2000 mg täglich) bei postmenopausalen Frauen den Knochenverlust im ersten Jahr verlangsamen (Mackerras und Lumley 1997), wobei sich diese Wirkung v.a. in kortikalem Knochen zu manifestieren scheint (Elders et al. 1994; Riis et al. 1987). Die Frage, ob höhere Calciumeinnahmen das Frakturrisiko senken, ist dennoch nicht abschließend geklärt (WHO Scientific Group 2003, Cumming et al. 1997), obwohl die Ergebnisse einiger Studien eine Reduzierung des Hüftfrakturrisikos aufzeigen (Holbrook et al. 1988, Cumming und Nevitt 1997, Kanis et al. 2005a).

Die Auswirkungen von Calciummangel bzw. -supplementierung auf den Knochen scheinen von vielen Faktoren abzuhängen, wobei genetische Disposition (Vitamin D-Rezeptor-Genotyp mit Auswirkungen auf das Ausmaß der Calciumabsorption, das Ansprechen auf Calcium und Vitamin D und die Rate des Knochenverlustes) und Beeinflussung durch andere Nahrungskomponenten von Bedeutung sind (Kanis 1999). Insbesondere ist die Verfügbarkeit von Vitamin D ein entscheidender Faktor für die Effizienz von Calciumsupplementen.

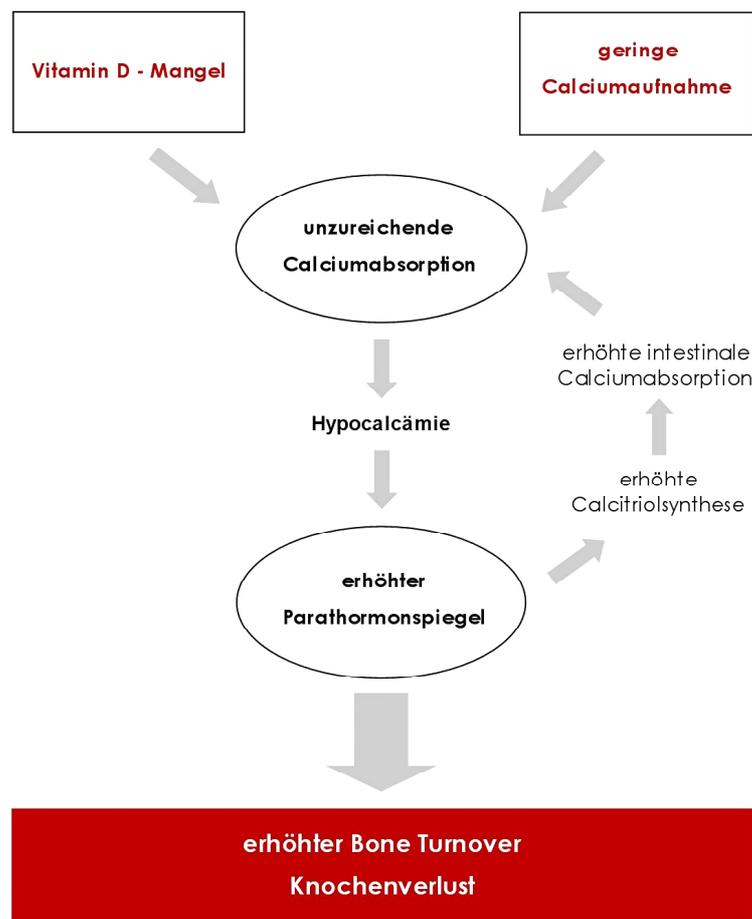


Abbildung 3:
Schematische Darstellung pathophysiologischer Zusammenhänge bei Vitamin D-Mangel und unzureichender Calciumaufnahme modifiziert nach Reginster 2005

2.5.11.2 Vitamin D

Vitamin D ist eine Sammelbezeichnung für eine Gruppe fettlöslicher Vitamine. Biologische Bedeutung haben vor allem Vitamin D₂ (Ergocalciferol), welches vorwiegend in Nahrungsmitteln pflanzlicher Herkunft vorkommt und Vitamin D₃ (Cholecalciferol) aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Da Vitamin D nicht mit der Nahrung zugeführt werden muss, sondern durch die Einwirkung von UVB-Strahlung (290-315 nm (Holick 2004)) aus den Ergosterol (Provitamin D₂) und 7-Dehydrocholesterol (Provitamin D₃) synthetisiert werden kann, ist es nicht als Vitamin im engeren Sinne zu bezeichnen.

Durch Photolyse entsteht in der Haut über eine Zwischenstufe Vitamin D₃, welches - ebenso wie das mit der Nahrung aufgenommene Vitamin D - in der Leber zu Calcidiol (25-OH-Cholecalciferol) hydroxyliert wird. In dieser Form kann es an Vitamin-D-Bindungsprotein (DBP) gebunden in bestimmten Geweben gespeichert werden (Reginster 2005). Die Serumkonzentrationen von Calcidiol reflektieren die Verfügbarkeit von Vitamin D₃ am besten, die Halbwertszeit beträgt etwa 3 Wochen (Thomas und Demay 2000). In der Niere entsteht durch eine zweite Hydroxylierung die hormonell wirksame Substanz Calcitriol (1,25 (OH)₂-Cholecalciferol) oder „Vitamin D Hormon“. Neben der Niere sind auch andere Gewebe in geringerem Maße zur Synthese von Calcitriol fähig (Schwartz et al. 1998, Bikle et al. 2005).

Die Synthese von Calcitriol wird durch das bei Hypocalcämie vermehrt sezernierte Parathormon sowie durch einen erniedrigten Phosphatspiegel im Blut initiiert. Eine der zahlreichen Funktionen der aktiven Form des Vitamin D ist die Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase durch Wirkung an Darm, Knochen und Nieren. Aber auch die positiven Wirkungen auf neuromuskuläre Funktionen und Stärkung der Muskelkraft sind im Zusammenhang mit der Erkrankung Osteoporose von Bedeutung (Pfeifer et al. 2002). Der letzte Syntheseschritt von Calcitriol wird durch das bei Hypocalcämie vermehrt sezernierte Parathormon (PTH) sowie durch Hypophosphatämie (und auch Prolactin) aktiviert. Calcitriol erhöht die Absorption von Calcium (und Phosphat) im Darm und steuert zudem den Calciumtransport an Niere und Knochen (Lips 2006). Erhöhung der Calciumabsorption und Mineralisierung der Knochenmatrix sind somit die bedeutenden Wirkungen des Vitamin D-Hormons im Zusammenhang mit der Erkrankung Osteoporose.

Das aktive Vitamin D ist unerlässlich für eine adäquate intestinale Calciumabsorption. In geringem Ausmaß findet auch eine Vitamin D-unabhängige Calciumabsorption durch passive Diffusion statt, die von dem Calciumgradienten abhängig ist und insofern von der Menge der Calciumaufnahme (Lips 2006). Wenige Nahrungsmittel sind reich an Vitamin D, so dass der Bedarf zu einem großen Teil über die Eigensynthese der Haut gedeckt werden muss (Francis 2006). Ausnahmen stellen fettreicher Fisch (Lachs, Makrele, Hering) sowie Milch, die in einigen Ländern mit Vitamin D angereichert ist, dar (Chen et al. 2007, Reginster 2005, Holick 2006). In geographischen Breiten mit geringer Sonneneinstrahlung, aber auch in Mitteleuropa

während der Wintermonate, ist die dermale Synthese in der Regel unzureichend (Bettica et al. 1999). Der Grad der Hautpigmentierung und die Verfügbarkeit der Vorstufe 7-Dehydrocholesterol in der Haut, die bei älteren Menschen oft vermindert ist, sind ebenfalls bedeutende Faktoren für das Ausmaß der dermalen Synthese (Bernecker 2004). Zudem kann die Absorption von Vitamin D bei chronischen Darmerkrankungen oder die Metabolisierung bei Funktionsstörungen von Leber oder Niere beeinträchtigt sein (Holick 2005).

Vitamin D-Mangel ist ein globales Problem innerhalb aller Altersgruppen, insbesondere bei älteren Menschen und Patienten mit Osteoporose (Holick 2006). Im Alter ist die intestinale Absorption von Vitamin D nicht reduziert, die Verfügbarkeit von 7-Dehydrocholesterol in der Haut und somit die dermale Synthese sowie die Metabolisierung in der Niere hingegen schon (Lips 2006). Bei Männern scheint Vitamin D-Mangel weniger prävalent zu sein als bei Frauen (Reginster 2005). In einer Studie, in der die Serumkonzentration von 25(OH)D bei postmenopausalen nordamerikanischen Frauen mit Osteoporose und diesbezüglicher Therapie untersucht wurden, wurden bei 52 % der Frauen Calcidiolkonzentrationen von weniger als 30 ng/ml gemessen (Holick et al. 2005). Auch eine 30 Studien umfassende Analyse lässt eine hohe Prävalenz niedriger Calcidiolwerte bei postmenopausalen Frauen erkennen, insbesondere bei Osteoporose und Frakturanamnese (Gaugris et al. 2005). Eine europäische Studie bezüglich der saisonalen Variabilität wies im Frühjahr einen Calcidiolmangel (unter 20ng/ml) bei 71 % gesunder postmenopausaler Frauen nach (Bhattoa et al. 2004). In den USA ist bei älteren Menschen eine unzureichende Vitamin D-Versorgung seltener als in den meisten europäischen Ländern, was auf die dortige Supplementierung von Nahrungsmitteln mit Vitamin D zurückzuführen sein könnte (Lips 2001). Auch bei Jugendlichen wurde im Rahmen einer Studie eine hohe Prävalenz (42 %) unzureichender Calcidiolwerte (unter 20 ng/ml) nachgewiesen (Gordon et al. 2004) und selbst während der intrauterinen Entwicklung könnte eine Vitamin D-Unterversorgung zu einem erhöhten Osteoporoserisiko im Alter führen (Cooper et al. 2005).

Derzeit gibt es keine Übereinstimmung hinsichtlich der optimalen Konzentration von Calcidiol (25(OH)D) im Serum (Reginster 2005). Werte von über 30 ng/ml (75 nmol/l)

werden aber für die Gewährleistung einer maximalen Calciumresorption und anderer bedeutender Funktionen für erforderlich gehalten (Heaney 2000). Einige Studien haben aufgezeigt, dass physiologische Parathormonkonzentrationen bei einem Calcidiolwert von 32 ng/ml vorliegen (Chapuy et al. 1997, Thomas et al. 1998, Tangpricha et al. 2002). Bei Osteomalazie sind die Calcidiolwerte deutlich erniedrigt (unter 10 ng/ml). Werte von unter 20 ng/ml werden mit unzureichender Calciumabsorption und Verminderung der Knochendichte in Zusammenhang gebracht (Hickey und Gordon 2004).

Sekundärer Hyperparathyreoidismus wird als Hauptmechanismus für den Zusammenhang zwischen Vitamin D-Defizit und Osteoporose angesehen: Die geringen Calcidiolwerte spiegeln eine verminderte Calcitriolsynthese und infolgedessen eine unzureichende intestinale Calciumabsorption wider. Infolge der Hypocalcämie wird vermehrt Parathormon aus den Nebenschilddrüsen sezerniert, welches seinerseits die Calcitriolsynthese stimuliert. Auf diese Weise wird der Calcitriolspiegel zwar angehoben, diese kompensatorischen Mechanismen münden jedoch in einen reaktiven Hyperparathyreoidismus. Parathormon aktiviert an der Oberfläche von Osteoblasten die Exprimierung von RANKL (receptor activator of NF-kappa B-ligand) mit der Folge vermehrter Osteoklastenbildung und dem Ziel der Calciummobilisierung (Holick 2006). Der erhöhte Knochenumsatz mit gesteigerter Resorption führt zu einer Abnahme der Knochenmineraldichte bzw. zu Knochenverlust, welcher sich in erster Linie in kortikalem Knochen (z.B. Oberschenkelhals) manifestiert (Lips 2006, Souberbielle et al. 2006).

Einige Studien haben bei nicht an Osteoporose erkrankten Frauen im Alter von 45 bis 65 Jahren sowie bei älteren Männern (65 bis 76 Jahre) einen Zusammenhang zwischen niedrigem Calcidiolspiegel, erhöhter Parathormonkonzentration und verminderter Knochendichte nachgewiesen (Khaw et al. 1992, Murphy et al. 1993). Auch das Risiko für Hüftfrakturen und andere nicht vertebrale Frakturen scheint bei unangemessener Vitaminversorgung erhöht zu sein (Feskanich et al. 2003, Holick 2006). Umgekehrt kann Vitamin D-Supplementierung dem Knochendichteabfall während der Wintermonate entgegenwirken und außerdem das Risiko nicht vertebraler Frakturen senken (WHO Scientific Group 2003). Insbesondere scheint eine kombinierte Supplementierung von Calcium und Calcitriol bei postmenopausalen

Frauen das Hüftfrakturrisiko zu senken (Chapuy et al. 1994). Auch andere Autoren gelangen zu dem Schluss, dass eine kombinierte Zufuhr von Calcium und Vitamin D bei Risikopatienten eine größere abschwächende Wirkung auf Parathormonsekretion und Knochenumsatz hat, die Knochendichte erhöht und das Risiko nicht vertebraler Frakturen vermindert (Lips 2001). In einer Metaanalyse wurde jedoch aufgezeigt, dass die alleinige Vitamin-D₃-Supplementierung in einer Dosis von 700 bis 800 IU/d unabhängig von Calciumergänzungen bei älteren Patienten das Hüftfrakturrisiko um 26 % und das Risiko anderer nicht vertebraler Frakturen um 23 % senkt.

2.5.11.3 Protein

Ebenso wie sich eine Eiweißunterversorgung negativ auf den Knochenstoffwechsel auswirkt, wird dieser durch exzessive Proteinzufuhr ungünstig beeinflusst. Insofern wird die Frage, welche Rolle die diätetische Eiweißaufnahme im Zusammenhang mit der Erkrankung Osteoporose spielt, kontrovers diskutiert.

Die organische Knochenmatrix besteht zum größten Teil aus Protein (v.a. aus Collagen-1, aber auch aus nicht collagenen Proteinen wie Osteonectin, Osteocalcin und anderen). Ausreichende Eiweißzufuhr ist nötig, um essentielle Aminosäuren für die Matrixsynthese bereitzustellen, und ist eine wichtige Determinante für Knochenwachstum und maximale Knochendichte (WHO Scientific Group 2003). Auch die Synthese des überwiegend knochenanabolen Wachstumsfaktors IGF-1 ist von der Proteinzufuhr abhängig (s. 2.5.6) (Rizzoli und Bonjour 1999, Hotta et al. 2000). IGF-1 ist hinsichtlich des Zuwachses der Knochenmasse in der Pubertät von Bedeutung und könnte zudem infolge der verminderten Verfügbarkeit im Alter in der Pathogenese der Involutionsosteoporose eine Rolle spielen (Zofková 2003, Boonen et al. 1997). Im ovariectomierten Tiermodell wurde eine dosisabhängige Zunahme der Knochendichte nach IGF-1 Applikation beobachtet (Ammann et al. 1993). Die Ergebnisse eines weiteren Tierversuchs mit proteinmangelernährten ovariectomierten Ratten zeigten einen Rückgang der Knochendichte und einen Anstieg der DPD-Konzentration im Urin an, wobei diese Effekte teilweise auf die verminderten Plasmakonzentrationen von IGF-1 zurückgeführt wurden (Ammann et al. 2000). Proteinmangelernährung ist nicht nur mit niedriger Knochendichte assoziiert

(Kerstetter et al. 2000, Devine et al. 2005), sondern auch mit erhöhtem Frakturrisiko (Bonjour et al. 1996), wobei auch die Schwächung der Muskulatur, insbesondere bei älteren Menschen, eine bedeutende Rolle spielt (WHO Scientific Group 2003). In Übereinstimmung damit legen die Ergebnisse einer Querschnittstudie nahe, dass eine erhöhte Eiweißaufnahme bei ausreichender Calciumaufnahme mit einer erhöhten Knochendichte assoziiert ist.

Dieser Auffassung steht entgegen, dass hohe Proteinzufuhr einen vermehrten Calciumverlust über den Urin bedingt, zu einer negativen Calciumbilanz und erhöhter Knochenresorption führt und das Frakturrisiko erhöht (Kerstetter et al. 2003a, Tucker 2003, Rapuri et al. 2003). Die Erkenntnis, dass exzessive Eiweißaufnahme zu erhöhter Calciumausscheidung führt, ist unumstritten. Die Auswirkungen hoher Proteinzufuhr auf den Knochenstoffwechsel sind dennoch nicht abschließend geklärt. Ein Mechanismus, über den Nahrungsprotein die Knochenresorption erhöhen könnte, ist der erhöhte Anfall von Säuren: Der Hypercalciurie liegt eine im Rahmen der Eiweißmetabolisierung erhöhte Säurebelastung zugrunde, wobei Calciumionen aus dem Knochen als Puffer dienen könnten, insbesondere wenn die renale Regulierung des Säure-Basen-Gleichgewichtes unzureichend ist (Kerstetter et al. 2003b). Die durch diesen Mechanismus erhöhte Knochenresorption könnte zu Knochenverlust und Anstieg des Frakturrisikos führen. Allerdings ist die Herkunft des im Urin vermehrt anfallenden Calciums noch nicht gesichert: Die Ergebnisse einiger Studien legen nahe, dass die Hypercalciurie in erster Linie auf eine durch die hohe Proteinzufuhr gesteigerte intestinale Calciumabsorption zurückzuführen sei und nicht auf Mobilisierung aus dem Knochen (Kerstetter et al. 2003b). Umgekehrt vermindert eine geringe Eiweißaufnahme kurzfristig die intestinale Absorption mit der Folge eines Anstiegs von PTH und Calcitriol und einem temporären sekundären Hyperparathyreoidismus (Kerstetter et al. 1997, Kerstetter et al. 2000).

Demnach existieren derzeit verschiedene Hypothesen, die als Ursache für eine erhöhte Knochenresorption sowohl eine zu geringe als auch eine zu hohe Eiweißaufnahme in Betracht ziehen. Die Proteinwirkung auf den Knochenstoffwechsel scheint verschiedenen Einflüssen zu unterliegen, wobei insbesondere die Höhe der Calciumzufuhr von Bedeutung zu sein scheint (Heaney 1993). Auch die Art des Proteins beeinflusst den Knochenstoffwechsel: Tierisches

Eiweiß, insbesondere Fleisch, könnte durch den höheren Anteil schwefelhaltiger Aminosäuren eine höhere metabolische Säurebelastung bedingen als pflanzliches Eiweiß. Studien, die diesen Zusammenhang untersuchten, zeigten auf, dass sich Knochenverlust an Oberschenkelhals und Frakturrisiko bei hoher Zufuhr tierischer und geringer Zufuhr pflanzlicher Eiweiße erhöhten (Frassetto et al. 2000, Sellmeyer et al. 2001). Auch andere Nahrungskomponenten scheinen hinsichtlich des Säureanfalls bei Verstoffwechslung (PRAL, potential renal acid loads) von Bedeutung zu sein (Tucker 2003).

2.5.11.4 Phosphor

Die anorganische Knochenmatrix besteht zum größten Teil aus Calciumphosphat (s. 2.5.11.2). Phosphor ist wie Calcium unerlässlich für Aufbau und Aufrechterhaltung der Knochenmasse (Heaney 2004). Hypophosphatämie limitiert die Mineralisation neu gebildeten Knochens, beeinträchtigt die Funktion der Osteoblasten und verstärkt die osteoklastäre Resorption (Raisz und Niemann 1969). Infolgedessen könnte Phosphormangel zu erhöhtem Frakturrisiko führen (Nieves 2005). Zudem vermindert Phosphor die Calciumausscheidung mit dem Urin. Phosphormangel kann entstehen bei einseitiger Ernährung sowie durch Einnahme von Calciumsupplementen in Form von Carbonaten oder Citraten, welche die Absorption von Phosphor beeinträchtigen (Heaney 1993). Dennoch ist ein Phosphormangel selten zu beobachten, z.B. sind Fleisch, Milch, Milchprodukte, Fisch, Eier und Gemüse reich an Phosphor und eine angemessene Zufuhr (700 mg/d) in der Regel gewährleistet (Nieves 2005).

Das Verhältnis von Calcium zu Phosphor ist entscheidender als die alleinige Phosphoraufnahme (Heaney und Nordin 2002). Ein inverses Calcium-Phosphor-Verhältnis beeinflusst den Knochenstoffwechsel negativ (Calvo et al. 1990). Hohe Phosphat- und geringe Calciumkonzentrationen verursachen über eine gesteigerte Parathormonfreisetzung einen sekundären Hyperparathyreoidismus, der zum Knochenverlust führt (Takeda et al. 2004, Nieves 2005). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind in Kapitel 2.5.11.3 dargestellt.

Phosphor ist nicht nur bei üblicher Ernährung in ausreichendem Maß vorhanden, sondern einigen Lebensmitteln werden Phosphate, z.B. als Stabilisatoren, zugesetzt. Der Anteil der Lebensmittel mit Phosphatzusätzen, wie z.B. Cola, ist in den vergangenen Jahren stark angestiegen (Takeda et al. 2004). Eine Studie zeigte auf, dass hoher Konsum des Getränks bei Frauen (nicht aber bei Männern) eine signifikante Abnahme der Knochendichte an der Hüfte zur Folge hatte. Auch bei entcoffeinierter Cola wurde dieser Effekt beobachtet (Tucker et al. 2006).

2.5.11.5 Vitamin K

Vitamin K bezeichnet eine Gruppe fettlöslicher Vitamine. Vitamin K1 (Phyllochinon) wird von Pflanzen synthetisiert und ist in grünem Gemüse (z.B. Spinat, Kohl, grüne Bohnen) enthalten. Die Synthese von Vitamin K2 (Menachinon) erfolgt bakteriell. Vitamin K kommt nicht nur im Rahmen der Blutgerinnung eine entscheidende Bedeutung zu, sondern auch hinsichtlich des Knochenstoffwechsels. Als Cofaktor der γ -Glutamylcarboxylase ist die Substanz an der Carboxylierung peptidgebundener Glutamatreste beteiligt und essentiell für die γ -Carboxylierung des von Osteoblasten synthetisierten Osteocalcins (Plaza und Lamson 2005). Aber auch andere an der Mineralisierung des Knochengewebes beteiligte Proteine sind Vitamin K-abhängig. Neben der Induktion der Mineralisation scheint Vitamin K auch eine resorptionshemmende Funktion zu erfüllen, welcher unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen (Plaza und Lamson 2005). Die Frakturheilung wird durch Vitamin K beschleunigt.

Da Osteocalcin nur in carboxylierter Form an Hydroxyapatit binden kann, ist die Serumkonzentration an untercarboxyliertem Osteocalcin nicht nur ein Indikator für die Versorgung mit Vitamin K, sondern auch für eine verminderte Knochendichte und ein erhöhtes Frakturrisiko (Plaza und Lamson 2005, Szulc et al. 1996). Aber auch Vitamin K an sich ist ein Indikator des Knochenstoffwechsels und weist - insbesondere in Kombination mit anderen Markern - eine hohe Sensivität und Spezifität auf (Heiss et al. 2004). Die Fraktion des untercarboxylierten Osteocalcins steigt im Alter und ist mit einem erhöhten Hüftfrakturrisiko assoziiert (WHO Scientific Group 2003). Eine Supplementierung mit Vitamin K senkt die Konzentration des Knochenmarkers uOC

und erhöht die Knochendichte (Douglas et al. 1995). Jedoch ist bei Supplementierung die blutgerinnungsfördernde Wirkung zu beachten; bei Einsatz von bestimmten Antikoagulanzen (z.B. Cumarine) ist zusätzliche Vitamin-K-Gabe demzufolge kontraindiziert. Umgekehrt scheint der Einsatz von Vitamin-K-Antagonisten die Knochendichte zu vermindern. Die Ergebnisse einer Studie zeigten auf, dass bei Frauen, welche über mindestens ein Jahr mit oralen Antikoagulantien behandelt wurden, das Risiko für Wirbel- und Rippenfrakturen erhöht war und demnach Langzeittherapie als unabhängiger Risikofaktor für osteoporotische Frakturen angesehen wird (Caraballo et al. 1999).

2.5.11.6 Weitere Nahrungskomponenten, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen

Die bisher beschriebenen Nahrungskomponenten sind hinsichtlich ihrer Wirkung auf den Knochenstoffwechsel gut untersucht und werden von der WHO als Risikofaktoren für osteoporotische Frakturen eingestuft. Bezüglich der kontrovers diskutierten Proteinzufuhr bewertet die WHO eher eine niedrige Eiweißaufnahme als Risikofaktor (WHO Scientific Group 2003). Die Empfehlungen der Leitlinien des DVO hingegen beziehen sich derzeit ausschließlich auf Calcium und Vitamin D, da der Nutzen weiterer diätetischer Maßnahmen, insbesondere in Bezug auf die fraktursenkende Wirkung, noch weiterer Abklärung bedarf (DVO-Leitlinie 2006). Auch andere Nahrungsbestandteile beeinflussen den Knochenstoffwechsel. Sie bedürfen aber noch der weiteren Evaluierung (WHO Scientific Group 2003).

Vitamin C (Ascorbinsäure) ist ein wichtiger Cofaktor für Hydroxylierungsreaktionen und somit für die Hydroxylierung von Prolin und Lysin im Rahmen der Collagenbildung. Die Ergebnisse einiger Studien lassen positive Zusammenhänge zwischen Vitamin C-Einnahme über längere Zeit und Knochendichte vermuten (Hall und Greendale 1998, Leveille et al. 1997). Außerdem scheint Vitamin C-Mangel bei älteren Frauen mit einem größeren Ausmaß des Knochenverlustes assoziiert zu sein (Kaptoge et al. 2003).

Die antioxidative Wirkung von Vitamin C sowie auch von **Vitamin E** könnte ebenfalls eine Rolle spielen. Einer Studie zufolge könnte die Knochenresorption durch

Supplementierung beider Vitamine unterdrückt werden (Pasco et al. 2006). Bei Rauchern wurde ein erhöhtes Frakturrisiko im Zusammenhang mit Vitamin C- und Vitamin E- Mangel beobachtet. Der Anstieg freier Radikale, welche möglicherweise die Knochenresorption beeinflussen, könnte dem zugrunde liegen (Melhus et al. 1999). Umgekehrt scheint eine Supplementation mit Antioxidantien bei älteren Rauchern das Risiko osteoporotischer Frakturen zu senken (Zhang et al. 2006).

Vitamin B₁₂ (Cobalamin) und **Folsäure** (Vitamin B₉) sind in Form ihrer Coenzyme am Abbau von Homocystein beteiligt, welches seinerseits die Quervernetzung der Collagenfasern schädigt. In der Rotterdam-Studie war zirkulierendes Homocystein sowohl bei älteren Frauen als auch bei älteren Männern ein unabhängiges Risiko für osteoporotische Frakturen (Van Meurs et al. 2004). Andere Studien konnten positive Zusammenhänge zwischen Knochendichte und Serumkonzentrationen an Vitamin B₁₂ und Folsäure aufzeigen (Dhonushe et al. 2003, Cagnacci et al. 2003).

Indirekte Beeinflussung des Knochenstoffwechsels wird auch den B-Vitaminen **Thiamin** (Vitamin B₁), **Riboflavin** (Vitamin B₂) und **Niacin** (Vitamin B₃) zugeschrieben, deren Mangel möglicherweise mit verminderter Knochendichte und erhöhtem Frakturrisiko in Zusammenhang stehen könnte (Palacios 2006).

Der Mineralstoff **Magnesium** erfüllt als Cofaktor vieler Enzyme, durch seine Bedeutung beim Adenosintriphosphat (ATP)-Metabolismus (Phosphattransfer) und bei der neuromuskulären Erregungsübertragung zahlreiche Funktionen. Etwa 60 % des im Körper befindlichen Magnesiums ist im Knochen eingelagert. Mit abnehmendem Magnesiumgehalt nimmt die Größe der Hydroxyapatitkristalle zu, was die Brüchigkeit erhöhen kann (Palacios 2006). Zudem interagiert Magnesium mit dem Calciumstoffwechsel, z.B. durch Beeinflussung der Parathormonfreisetzung und Vitamin D- Synthese, wobei die den Knochenstoffwechsel betreffenden Mechanismen komplex sind (Seelig et al. 2004). Im Tierversuch mit weiblichen Ratten schien Magnesiummangel assoziiert zu sein mit verminderter Osteoblastenaktivität, Entkopplung von Formation und Resorption und resultierendem Knochenverlust (Rude et al. 1998). Bei ovariectomierten Ratten förderten Magnesiumzusätze die Knochenformation, schienen aber die Calciumabsorption zu hemmen (Toba et al. 2000). In einer Studie, in der bei jüngeren Männern mit Hilfe von biochemischen

Knochenstoffwechsellmarkern die Auswirkungen von Magnesiumsupplementen untersucht wurden, konnte eine Verminderung des Knochenumsatzes beobachtet werden. Demnach könnte Magnesium eine protektive Wirkung zugeschrieben werden bei Osteoporoseformen mit hohem Knochenumsatz („high turnover“), wie z.B. der altersassoziierten Osteoporose (Dimai et al. 1998). Der Nutzen von Magnesiumsupplementen in der Osteoporoseprävention ist dennoch aufgrund inkonsistenter und zum Teil kontroverser Ergebnisse nicht erwiesen (Nieves 2005).

Kalium könnte ebenfalls protektiv auf den Knochenstoffwechsel wirken. Die Ergebnisse einer Studie zeigten einen positiven Zusammenhang zwischen Kaliumaufnahme und Knochendichte. Darüber hinaus war die kombinierte Einnahme von Kalium und Magnesium sowohl bei Männern als auch bei Frauen signifikant mit der Knochendichte assoziiert. Bei Männern wirkte diese einem Verlust der Knochendichte während eines Beobachtungszeitraumes von vier Jahren entgegen (Tucker et al. 1999). Kalium nimmt Einfluss auf den Calciummetabolismus, insbesondere durch Verminderung der Calciumausscheidung (Nieves 2005). Die Quelle des zugeführten Kaliums scheint jedoch von Bedeutung zu sein. Während Kalium aus Früchten oder Gemüse sowie supplementiert in Form von Kaliumbicarbonat die Calciumausscheidung im Urin vermindert bzw. die Retention in der Niere erhöht und die Knochenresorption unterdrücken kann, vermag dies Kaliumchlorid in Ermangelung der Pufferwirkung auf endogene Säuren nicht (Morris et al. 1999, Tucker 2003).

Das essentielle Spurenelement **Zink** ist Bestandteil von über 200 Enzymen und erforderlich für Knochenwachstum, Collagensynthese und Mineralisation der Matrix (Yamaguchi 1998, Calhoun et al. 1974). Das Metall aktiviert die Aminoacyl-tRNA-Synthetase in Osteoblasten und stimuliert die zelluläre Proteinsynthese. Darüber hinaus hemmt es die Osteoklastenbildung und ist bedeutend für die Erhaltung der Knochenmasse. Etwa ab der fünften Lebensdekade nimmt der Zinkgehalt im Knochen ab, was mit einer verminderten Knochenfestigkeit assoziiert ist (Alhava et al. 1977). Bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose wurde im Vergleich zu gesunden Frauen eine erhöhte Zinkausscheidung im Urin, welche mit vermindertem Knochenmineralgehalt korrelierte, beobachtet. Demnach scheint die Zinkelimination von dem Ausmaß der Knochenresorption abhängig zu sein bzw. diese

widerzuspiegeln. Die Serumkonzentrationen jedoch unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Frauen mit und ohne Osteoporose (Relea et al. 1995). Anders in einer Studie mit älteren Männern, in der die diätetische Zinkaufnahme sowie die Serumkonzentrationen mit der Knochendichte assoziiert und bei Probanden mit Osteoporose niedriger waren. Anhand der Zinkkonzentration im Serum konnte jedoch keine Aussage über den Knochenverlust innerhalb der Beobachtungsdauer von 4 Jahren getroffen werden (Hyun et al. 2004). Ob Zinksupplemente die Knochendichte bei älteren Männern erhöhen könnten und welche Rolle möglicherweise ein Zinkmangel in der Ätiologie der Osteoporose bei Männern spielt, bleibt bislang ungeklärt (Hyun et al. 2004).

Auch die Spurenelemente **Kupfer**, **Mangan** und **Eisen** nehmen Einfluss auf den Knochen. Kupfer ist als Cofaktor für die Vernetzung („cross-linking“) der Collagenfibrillen von Bedeutung und trägt somit zur Knochenfestigkeit bei (Palacios 2006). Auch Mangan ist Cofaktor verschiedener Enzyme und trägt zur Matrixbildung bei. Im Tierversuch wurde bei jungen Ratten zudem eine Interaktion mit dem IGF-Metabolismus beobachtet (Clegg et al. 1998). Eisen agiert ebenfalls als Cofaktor und beeinflusst Matrixsynthese, Calcitriolbildung und Calciumabsorption (Palacios 2006).

Fluorid gilt als potenter Osteoblastenaktivator, jedoch ist die therapeutische Breite relativ gering. Bei Überdosierung oder auch zu hoher Aufnahme, beispielsweise über Trinkwasser, besteht das Risiko einer Skelettf fluorose, wodurch die Stabilität des Knochens vermindert wird und das Frakturrisiko steigt (Nieves 2005).

Potentiell schädigende Wirkung zeigt auch **Vitamin A** durch dosisabhängige Förderung der Knochenresorption. Als zugrunde liegende Ursachen werden die Interaktion von Vitamin A mit Parathormon sowie eine direkte Wirkung an Osteoblasten und Osteoklasten über deren Rezeptoren für Vitamin A-Säure (All-trans-Retinsäure) vermutet (Liu et al. 1996, Rohde und DeLuca 2003). Exzessive Aufnahme über längere Zeit könnte einigen Studien zufolge das Frakturrisiko erhöhen, wohingegen die Ergebnisse anderer Studien keinen Zusammenhang erkennen ließen (Barker und Blumsohn 2003). Eine Supplementierung über einen begrenzten Zeitraum scheint jedoch nicht zur Entstehung von Osteoporose beizutragen (Kawahara et al.

2002). Dennoch besteht hinsichtlich der Existenz und Auswirkung subklinischer toxischer Effekte weiterhin Forschungsbedarf (Penniston und Tanumihardjo 2006).

Omega-3-ungesättigte Fettsäuren beeinflussen den Knochenstoffwechsel durch Verminderung der Cytokinproduktion und Erhöhung der Calciumabsorption. Die Cytokine Interleukin-1, Interleukin-2 (IL-1 und IL-2) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) tragen möglicherweise wesentlich zu dem schnellen Knochenverlust nach der Menopause bei (Kettler 2001). IL-1 und TNF α , die in Monozyten und Makrophagen gebildet werden, stimulieren Stromazellen zur Produktion von Interleukin-6 (IL-6) (Pacifici 1996). IL-1 wiederum scheint frühe Stadien der Osteoklastengnese zu stimulieren. Zusätzlich aktivieren IL-1- sowie TNF-reife Osteoklasten indirekt über Osteoblasten und stimulieren somit die Knochenresorption bei Beeinträchtigung der Formation (Kettler 2001). Ω 3-Fettsäuren wie z.B. Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA), die der α -Linolensäure entstammen, beeinträchtigen wahrscheinlich die Freisetzung der Cytokine. Insbesondere ein niedriges Verhältnis von ω -6- zu ω -3-Fettsäuren durch Erhöhung des Anteils von ω -3-Fettsäuren scheint protektive Wirkung auf den Knochenstoffwechsel zu haben (Kettler 2001).

Bei Ratten konnte ein durch Ovariectomie herbeigeführter Knochenverlust durch EPA gehemmt werden (Sakaguchi et al. 1994). In einer Studie mit älteren Frauen und Männern wurde nach Supplementierung von EPA und γ -Linolensäure (GLA) eine Verminderung der Knochenresorption und Zunahme der Knochendichte beobachtet (Kruger et al. 1998).

Östrogenmangel, die Hauptursache für postmenopausalen Knochenverlust bei Frauen und möglicherweise auch eine Ursache für Knochenverlust bei Männern, führt zu einer vermehrten Synthese von TNF α . Insofern könnte Östrogen durch Hemmung der Cytokinfreisetzung die Resorption vermindern.

Phytoöstrogene sind Pflanzenstoffe, die strukturelle Ähnlichkeit mit Östrogen besitzen, wodurch eine Bindung an Östrogenrezeptoren möglich ist. Da sie sowohl östrogenagonistische als auch östrogenantagonistische Wirkung ausüben können, werden sie auch den selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs) zugeordnet. Die zum Beispiel in der Sojabohne enthaltenen Isoflavone Genistein und Daidzein

gehören zu den am besten untersuchten Phytoöstrogenen. Da Östrogenmangel ein Risikofaktor für Osteoporose ist, langfristige Hormonersatztherapie aber wiederum einen Risikofaktor für Brust- und Gebärmutterkrebs darstellt, sind die Phytoöstrogene in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gelangt. Bei älteren Ratten wurde eine knochenanabole Wirkung von Genistein beobachtet, und auch andere Befunde bei ovariectomierten Tieren als Modell für eine postmenopausale Stoffwechsellage liefern Hinweise auf Verlangsamung des Knochenverlustes oder Steigerung der Knochendichte; dennoch sind diesbezügliche Ergebnisse nicht einheitlich (Yamaguchi und Gao 1998, Setchell und Lydeking-Olsen 2003). Sojaprotein-Supplemente erhöhten in einer Studie mit älteren Frauen und Männern die Knochendichte an der Wirbelsäule (insbesondere bei Frauen), jedoch wurden keine Veränderungen der Knochendichte an der Hüfte beobachtet (Newton et al. 2006).

Wenn es auch Hinweise gibt, dass Isoflavone in Abhängigkeit von Östrogen-Rezeptor- Genotypen auf Knochengewebe östrogenartige, und auf reproduktive Gewebe östrogenantagonistische Wirkungen haben könnten und infolgedessen eine interessante Anwendungsmöglichkeit darstellen, liegen derzeit keine gesicherten Erkenntnisse über Wirkungsmechanismen, Beeinflussung von Frakturrisiko und therapeutischen Einsatz vor (Chen und Andersson 2002, Setchell und Lydeking-Olsen 2003).

2.5.12 Prädisponierende Risikofaktoren für primäre oder sekundäre Osteoporoseformen

Die Risikofaktoren weibliches Geschlecht oder hohes Lebensalter und die damit verbundenen hormonellen Änderungen können die Erkrankung Osteoporose „primär“ verursachen.

Bestimmte Medikamente sowie einige Erkrankungen und Stoffwechselstörungen können zu einer sogenannten „sekundären“ Osteoporose führen.

Da diese Risikofaktoren auslösend für bestimmte Osteoporoseformen sind, werden sie im folgenden Kapitel dargestellt. Zu beachten ist jedoch, dass die übliche

Verwendung der Termini „primäre“ und „sekundäre“ Osteoporose die in der Regel multifaktorielle Ätiologie der Osteoporose wenig berücksichtigen.

2.6 Osteoporoseformen

Die Klassifizierung der Osteoporose kann nach unterschiedlichen Kriterien erfolgen. Eine mögliche Einteilung ist die Differenzierung anhand des Schweregrades, die gemäß der WHO über den Knochendichtewert im Vergleich zur „peak bone mass“ vorgenommen wird und zusätzlich den Frakturbefund berücksichtigt. Hierbei wird zwischen Osteoporose und klinisch manifester Osteoporose unterschieden (siehe Kapitel 1).

Neben der Klassifizierung nach dem Schweregrad kann jedoch die Einteilung auch nach pathophysiologischen Kriterien erfolgen, wonach die Ursachen der Knochendichteminderung in den Vordergrund treten. In der Regel liegen jedoch mehrere unabhängige Faktoren einer Verminderung der Knochendichte zugrunde, so dass der häufig verwendete Begriff „primär“ nicht immer zutreffend ist. Infolgedessen wird eine Osteoporose ohne erkennbare Ursache auch als „primär“ oder idiopathisch bezeichnet. Sind andere Grunderkrankungen oder die Einnahme bestimmter Medikamente die auslösende Ursache, wird die Osteoporose als „sekundär“ bezeichnet.

Den primären Osteoporoseformen werden üblicherweise die postmenopausale und die Altersosteoporose zugeordnet, wobei zu beachten ist, dass die Übergänge fließend sind. Die postmenopausale Osteoporose tritt bei Frauen nach der Menopause auf, die Altersosteoporose bei Frauen und Männern etwa ab dem 65. Lebensjahr. Der Östrogenabfall nach der Menopause ist jedoch nur ein auslösender Faktor, und eine Frau mit Altersosteoporose befindet sich immer im postmenopausalen Lebensabschnitt.

Eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit ist die Kategorisierung nach Typ I- und Typ-II- Osteoporose. Der osteoporotische Knochenabbau findet in der Regel aufgrund des schnelleren Stoffwechsels („remodeling“) in trabekulärem Knochen zunächst in

diesem statt. Erst bei fortschreitendem Knochenabbau ist zunehmend auch kortikaler Knochen betroffen. Die postmenopausale Osteoporose, bei der vor allem die Knochendichte in trabekulärem Knochen vermindert ist, entspricht in etwa der Typ-I-Osteoporose, wohingegen die Altersosteoporose, bei der die Knochendichte in beiden Anteilen vermindert ist, weitgehend der Typ-II-Osteoporose entspricht. Aus diesem Grund treten zum Beispiel bei der Typ-I-Osteoporose häufig Wirbelkörperfrakturen auf und bei der Typ-II-Osteoporose Wirbelkörper- und proximale Femurfrakturen.

Darüber hinaus ist eine Einteilung nach der Dynamik des „remodeling“ möglich. Aufgrund der unterschiedlichen Ausprägung des Knochenmasseverlustes durch gesteigerte Knochenresorption und/oder verminderte Knochenformation kann, beispielsweise mit Hilfe von biochemischen Knochenmarkern, zwischen Low- und High-Turnover-Osteoporose unterschieden werden (Riis 1995). Bei einer Low-Turnover-Osteoporose beträgt der jährliche Verlust an Knochenmasse bis zu 3 % und bei einer High-Turnover-Osteoporose mehr als 3 % (Gasser und Finkenstedt 1999). Die Einschätzung der Dynamik ist insbesondere hinsichtlich der Beurteilung des Frakturrisikos und therapeutischer Entscheidungen von Bedeutung (Gasser und Finkenstedt 1999, Riis 1995, Epstein et al. 2003).

Zudem ist eine Einteilung nach der Lokalisation der Osteoporose möglich. Zwar sind die meisten Osteoporoseformen generalisiert, jedoch kann z.B. eine Inaktivitätsosteoporose (s. Kapitel 2.5.7) auch örtlich begrenzt auftreten (Takata und Yasui 2001).

2.6.1 Idiopathische oder „primäre“ Osteoporoseformen

Nachfolgende Tabelle liefert einen Überblick über eine mögliche Klassifizierung idiopathischer oder „primärer“ Osteoporoseformen, in der auch das Lebensalter Berücksichtigung findet.

Tabelle 4:**Idiopathische Osteoporoseformen: Klassifikation nach pathogenetischen Kriterien**

Idiopathische juvenile Osteoporose	Kinder
Idiopathische Osteoporose junger Erwachsener	Frauen und Männer zwischen Pubertät und Funktionsminderung der Gonaden
Idiopathische Osteoporose der Erwachsenen /Involutionsosteoporose	
Typ-I-Osteoporose/ Postmenopausale Osteoporose	Frauen nach der Menopause
Typ-II-Osteoporose/ Altersosteoporose/ Senile Osteoporose	Frauen und Männer ab dem 65. Lebensjahr

2.6.1.1 Idiopathische juvenile Osteoporose

Die juvenile idiopathische Osteoporose ist eine seltene Erkrankung, die in der Regel bei Kindern vor Erreichen der Pubertät auftritt. Die Ätiologie ist bislang nicht bekannt. Klinisch manifest wird die Erkrankung meist im Alter von ein bis dreizehn Jahren, wobei das Durchschnittsalter bei sieben Jahren liegt und keine Geschlechtspräferenz zeigt (Kulkarni und Keshavamurthy 2004, Smith 1995). Der niedrigen Knochendichte liegt eine verminderte Knochenformation insbesondere in trabekulärem Knochen zugrunde; inwieweit auch kortikaler Knochen betroffen ist, ist derzeit nicht gesichert (Rauch et al. 2002). Klinisch ist die idiopathische juvenile Osteoporose durch Schmerzen, Gehstörungen und Frakturen nach geringem Trauma insbesondere im Bereich der Wirbelkörper und in den Metaphysen der langen Röhrenknochen charakterisiert. Radiologisch sind nicht selten Wirbelkompressionen darstellbar (Smith 1995). Die Beurteilung der Knochendichte bei Kindern ist sowohl aufgrund ungenügend vorhandener als auch schwierig zu erhebender Referenzdaten für Z-Scores im Rahmen der DXA-Messung nicht einfach, bei Messung mittels qCT ist zudem die höhere Strahlenbelastung zu beachten (Bianchi 2005, Baroncelli et al. 2005). Neuerdings wird vorgeschlagen, den Knochenmineralgehalt in Relation zur fettfreien Körpermasse (lean body mass, LBM) zu bewerten, und somit die Muskulatur in die Beurteilung einzubeziehen (Pludowski et al. 2006). Auch die Messung biochemischer Knochenmarker kann bei Kindern wertvolle Hinweise liefern,

insbesondere um die Effizienz der Therapie zu überprüfen (Baroncelli et al. 2005, Bianchi 2005). Bislang erfolgt die Diagnose in erster Linie durch Ausschluss. Von der nicht hereditären, idiopathischen juvenilen Osteoporose muss die kongenitale Form der erhöhten Knochenbrüchigkeit, die sog. Osteogenesis imperfecta, abgegrenzt werden, welcher eine Osteoblasteninsuffizienz und ein Collagendefekt zugrunde liegen. Außerdem sind Faktoren auszuschließen, welche eine sekundäre Osteoporose, die weit häufigere Form im Kindesalter, verursachen (Krassas 2000). In vielen Fällen findet mit Eintreten der Pubertät eine natürliche Remission statt (Pludowski et al. 2006, Smith 1995).

2.6.1.2 Idiopathische Osteoporose bei jungen Erwachsenen

In der Regel wird zwischen Pubertät und Funktionsverlust der Gonaden das Gleichgewicht zwischen Knochenformation und -resorption konstant gehalten (Priemel et al. 2006). Auch bei jungen Erwachsenen tritt die idiopathische Form der Osteoporose, eine erhöhte Knochenbrüchigkeit unbekannter Ätiologie, selten auf. Osteoporose in dieser Altersgruppe ist sowohl bei Männern als auch bei Frauen meist sekundär bedingt durch Faktoren, die entweder das Erreichen der maximalen Knochenmasse beeinträchtigen, oder einen Knochenverlust begünstigen (Rubin et al. 2005). Eine Geschlechtspräferenz scheint nicht vorzuliegen. Von Frakturen betroffen sind vorwiegend Knochen mit hohem trabekulären Anteil, wie zum Beispiel Wirbelkörper, aber auch Hüftfrakturen sind als Folge dieser Erkrankung zu beobachten (Heshmati und Khosla 1998). Die Ergebnisse einiger Studien lassen die Vermutung zu, dass dem Knochenverlust möglicherweise eine beeinträchtigte Osteoblastenfunktion unbekannter Ursache zugrunde liegt (Kurland et al. 1997, Khosla et al. 1994). Bei Männern mit idiopathischer Osteoporose wurden erniedrigte IGF-1-Konzentrationen im Serum beobachtet, die mit Knochendichte und histomorphometrischen Befunden korrelierten (Gillberg et al. 2002, Kurland et al. 1997, Reed et al. 1995). IGF-1 wirkt nicht nur direkt (z.B. durch Stimulation der Collagensynthese), sondern auch indirekt über Beeinflussung von Geschlechtshormonen und durch Verbesserung der Calciumabsorption knochenanabol. Eine verminderte Aktivität scheint zumindest in der Pathogenese der Involutionsosteoporose eine Rolle zu spielen (Zofková 2003). Die Ursachen der

erniedrigten IGF-1-Serumspiegel sind bislang nicht geklärt, jedoch wird ein Zusammenhang von IGF-1-Genotyp und idiopathischer Osteoporose bei Männern vermutet (Rosen et al. 1998).

2.6.1.3 Typ-I-Osteoporose oder postmenopausale Osteoporose

Zur Minderung der Knochendichte und Entstehung der Osteoporose tragen viele Faktoren bei, dennoch kommt dem Östrogenabfall bei Frauen mit Eintreten der Menopause eine zentrale Bedeutung zu. Die postmenopausale Osteoporose ist die häufigste Form der Osteoporose. Nach Angaben des DVO liegt die Prävalenz von Osteoporose auf der Grundlage einer erniedrigten Knochendichte (T-Score unter -2,5) bei 55-jährigen Frauen bei 7 % und steigt auf 18 % bei 80-jährigen Frauen. Das Frakturrisiko für eine über 50-jährige kaukasische postmenopausale Frau während des verbleibenden Lebens eine osteoporotische Fraktur zu erleiden, beträgt fast 40 % (DVO-Leitlinie 2006). Das Lebenszeitrisiko für eine diagnostizierte Wirbelfraktur wird auf 16 % geschätzt, wobei die tatsächliche Zahl vermutlich höher liegt, da einige Wirbelkörperfrakturen asymptomatisch verlaufen und nicht diagnostiziert werden. Die Prävalenz einer Osteopenie (entweder an proximalem Femur, Wirbelsäule oder Radius) bei Frauen im Alter von über 50 Jahren wird mit 45 % angegeben (Melton et al. 1992).

Nach Erreichen der maximalen Knochenmasse beginnt sowohl bei Männern als auch bei Frauen ein kontinuierlicher Knochenmasseverlust. Während sich bei Männern die Geschlechtshormonproduktion nur sehr langsam vermindert, fällt die Östrogenproduktion bei Frauen mit Beginn der Menopause und dem zunehmenden Funktionsverlust der Ovarien rapide ab. Der Östrogenmangel bedingt eine etwa 5 - 10 Jahre andauernde Phase des beschleunigten Knochenverlustes, welcher insbesondere trabekulären Knochen betrifft (Manolagas 2000a). In diesem Zeitraum verlieren Frauen etwa 20 - 30 % an trabekulärem und 5 - 10 % an kortikalem Knochen (Riggs und Melton 1986). Nach dieser Periode dominiert bei Frauen die langsame kontinuierliche Phase des Knochenverlustes, die auch bei älteren Männern zu beobachten ist (Riggs et al. 1998).

Die dem Zusammenspiel von Östrogen und Knochenstoffwechsel zugrunde liegenden Mechanismen sind vielfältig und komplex. „Bone remodeling“ findet durch koordiniertes Zusammenwirken von Osteoblasten und Osteoklasten in funktionellen Einheiten, den sogenannten Basic multicellular units (BMU`s) statt. Der Prozess beginnt mit der Aktivierung von Osteoklastenvorläuferzellen und der Initiierung einer Resorptionskaskade, welche durch Apoptose, den programmierten Zelltod der Osteoklasten beendet wird. Nach kurzer Umkehrphase erfolgt die Auffüllung der Resorptionslakunen durch die Wirkung der Osteoblasten. (Riggs et al. 2002, Weitzmann und Pacifici 2006a). In gesundem Knochen wird die gleiche Menge resorbierten Knochens durch neuen Knochen ersetzt, Resorption und Formation befinden sich im Gleichgewicht. Ein gesteigerter Knochenumbau kann jedoch zu einem Verlust an Knochenmasse führen, da der Prozess von Formation und Mineralisation eine längere Zeitspanne in Anspruch nimmt als die vergleichsweise kurze Phase der Resorption (Priemel et al. 2006).

Osteoblasten, Osteoklasten und Osteocyten exprimieren die Östrogenrezeptoren (ER) ER- α und ER- β , wobei ER- α bei der Wechselwirkung zwischen Östrogen und Knochen größere Bedeutung zukommt (Lerner 2006, Barkhem et al. 1998). Die Stimulation der osteoblastären Rezeptoren aktiviert nicht nur die Formation, sondern hemmt zudem den Mechanismus der Osteoklastenaktivierung durch Osteoblasten. Außerdem hemmt Östrogen über Rezeptoren der Osteoklasten-Vorläuferzellen die Differenzierung zu Osteoklasten und zusätzlich die osteoklastäre Resorptionsaktivität (Lerner 2006). Obwohl viele Östrogenwirkungen durch die Nukleärrezeptoren vermittelt werden, sind weitere Mechanismen von Bedeutung, welche über membranständige Rezeptoren vermittelt werden (Weitzmann und Pacifici 2006a).

Östrogenmangel führt zu einer gesteigerten Aktivierungsfrequenz der BMU`s, erhöhtem Remodeling und Vergrößerung der Resorptionsareale. In erster Linie ist diese Wirkung auf vermehrte Osteoklastenbildung zurückzuführen, wobei an diesem Prozess verschiedene hämatopoetische Zellen und Immunzellen beteiligt sind (Weitzmann und Pacifici 2006b). Zudem verlängert Östrogenmangel die Lebensspanne der Osteoklasten durch Hemmung der Apoptose. Der Zelltod der Osteoblasten wird jedoch gefördert, so dass die erhöhte Resorptionsaktivität nicht ausgeglichen werden kann und ein Verlust an Knochenmasse resultiert.

Eine weitere Auswirkung des Östrogendefizits könnte die vermehrte Synthese von Cytokinen sein, welche ihrerseits die Osteoblastenaktivität vermindern und die Osteoklastenbildung stimulieren (Kettler 2001). Die Wirkungen einiger Cytokine wie zum Beispiel IL-1 und TNF α auf den Knochenstoffwechsel sind in Kapitel 2.5.11.6 kurz beschrieben. Zudem stimulieren Cytokine das Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2), welches die Synthese von Prostaglandin E₂ (PGE₂) katalysiert. Dies könnte die Wirkung von Östrogen auf den Prostaglandinstoffwechsel erklären, da PGE₂ die Osteoklastenbildung und Knochenresorption stimuliert (Lerner 2006, Suzawa et al. 2000). Der zugrunde liegende Mechanismus ist die verstärkte Induktion der RANKL-Expression der Osteoblasten sowie die verstärkte Signalwirkung von RANK (receptor activator of NF-kappaB) in Osteoklastenvorläuferzellen. Die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor RANK führt zu einer Reihe von Signalkaskaden mit Aktivierung der Osteoklasten (Yasuda et al. 1998, Ono et al. 2005).

Das RANKL/RANK-Cytokin-System mit seinem Gegenspieler Osteoprotegrin (OPG) gilt als bedeutende regulatorische Determinante des Knochenstoffwechsels und wird durch zahlreiche Faktoren, wie zum Beispiel auch durch Parathormon moduliert (s. Kapitel 2.5.11.2). Insbesondere in der Pathogenese der postmenopausalen Osteoporose scheint das RANKL/RANK/OPG-System eine wichtige Rolle zu spielen. Östradiol und auch Phytoöstrogene können ER- α -vermittelt in Osteoblasten die OPG-Produktion steigern und gleichzeitig die RANKL-Expression vermindern (Hofbauer et al. 1999, Chen et al. 2002b, Yamagishi et al. 2001). In einer Studie wurde aufgezeigt, dass postmenopausale Frauen im Vergleich zu prämenopausalen Frauen eine erhöhte RANKL-Expression aufweisen, die negativ mit den 17 β -Östradiol-Spiegeln im Serum und positiv mit biochemischen Resorptionsmarkern korrelierte (Eghbali-Fatourehchi et al. 2003). Zudem wurden in einer anderen Studie positive Korrelationen zwischen 17 β -Östradiol-Spiegeln und OPG sowie zwischen OPG und Knochendichte beobachtet (Rogers et al. 2000).

Da die FSH-Sekretion einer negativen Feedback-Regulierung zum Östrogenspiegel unterliegt, könnte auch der infolgedessen höhere FSH-Spiegel einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel haben: Osteoklasten und ihre Vorläuferzellen besitzen FSH-Rezeptoren, deren Aktivierung ebenfalls zu einer gesteigerten Osteoklastenbildung führt (Sun et al. 2006).

Die genauen Mechanismen, über welche Östrogenmangel direkt und indirekt zu Knochenverlust führt, sind dennoch bislang nicht vollständig geklärt (Weitzman und Pacifi 2006a). Der postmenopausale Knochenmasseverlust ist jedoch nicht allein auf den Abfall des Östrogenspiegels zurückzuführen. Weitere Veränderungen, die mit zunehmendem Alter in Zusammenhang stehen, tragen zu der Knochenminderung bei. Gesteigerte Knochenresorption mit Abnahme der Trabelanzahl und –konnektivität sind die vorherrschenden Merkmale der Phase des beschleunigten Knochenverlustes nach der Menopause, welche allmählich in eine „low turnover Phase“ übergeht. Diese langsame Phase des Knochenabbaus findet bei Frauen so wie bei Männern statt und hält während des verbleibenden Lebens an (Riggs et al. 1998).

2.6.1.4 Typ-II-Osteoporose oder senile Osteoporose

Von der Altersosteoporose, der zweiten Form der Involutionsosteoporose, welche etwa ab dem 65. Lebensjahr auftritt, sind sowohl Frauen als auch Männer betroffen. Nach Erreichen der „peak bone mass“ findet der Knochenmasseverlust zunächst vor allem in trabekulärem Knochen statt, wobei sich weniger das Ausmaß als die Art des Verlustes unterscheidet, welche die Knochenfestigkeit beeinflusst. Männer weisen ein höheres trabekuläres Volumen auf als Frauen. Dies ist auf eine höhere Trabekeldicke zurückzuführen, nicht aber auf eine höhere Anzahl der Trabekel. Die Reduktion des trabekulären Knochenvolumens im Alter ist bei Frauen durch einen Rückgang von Trabekelanzahl und Konnektivität bedingt, bei Männern jedoch vor allem durch Abnahme der Trabekeldicke. Mit fortschreitendem Alter steigt das kortikale Remodeling an und der Knochenverlust findet zunehmend durch Verluste aus kortikalem Knochen statt. Infolge des hohen trabekulären Knochenverlustes in der Menopause scheint bei Frauen dieses Kompartiment rascher erschöpft zu sein und der kortikale Abbau früher einzutreten als bei Männern (Riggs et al. 1998, Seeman 2003b). Die Altersosteoporose ist gekennzeichnet durch Abnahme der Knochendichte in beiden Anteilen (Seeman 2003b).

Östrogenmangel ist nicht nur bei Frauen, sondern auch bei Männern hinsichtlich des Knochenverlustes von Bedeutung (Seeman 2004). Der Abfall der Knochendichte bei

älteren Männern könnte eher mit dem Östrogenspiegel als mit der Testosteronwirkung in Zusammenhang stehen (Riggs et al. 1998). In einer Kohortenstudie wurde aufgezeigt, dass niedrige 17β -Östradiolspiegel, nicht aber verminderte Androgenkonzentrationen mit geringer Knochendichte und erhöhtem Knochenumsatz korrelierten (Szulc et al. 2001b). Die Ergebnisse einer anderen Studie legen nahe, dass sowohl Testosteron als auch Östrogen die Knochenformation beeinflussen, die Knochenresorption aber östrogenabhängig ist. Obwohl sowohl Östrogen- als auch Testosteronspiegel mit zunehmendem Alter abfallen, scheint infolgedessen der Östrogenabfall im Hinblick auf den Knochenverlust von größerer Bedeutung zu sein (Falahati-Nini et al. 2000). Die knochenanabole Wirkung von Testosteron während des Knochenwachstums und der Ausbildung der maximalen Knochendichte ist bedeutend, dennoch bedürfen die zugrunde liegenden Mechanismen weiterer Klärung, ebenso die Frage, in welchem Ausmaß Testosteron- und Östrogendefizit zum Knochenverlust älterer Männer beitragen (Riggs et al. 1998). In einer aktuelleren Studie wurde bereits ein positiver Zusammenhang zwischen OPG und Testosteron sowie Östrogen aufgezeigt und eine negative Korrelation zwischen OPG und PTH; demnach könnte OPG als parakriner Mediator eine bedeutende Rolle im Knochenstoffwechsel bei älteren Männern einnehmen (Szulc et al. 2001a).

Zahlreiche weitere Faktoren können zur Entstehung der Osteoporose im Alter beitragen. In diesem Zusammenhang ist insbesondere der kompensatorische sekundäre Hyperparathyreoidismus von Bedeutung, welcher in der langsamen Phase des Knochenverlustes bei Männern und Frauen zu beobachten ist. Während des rapiden Knochenverlustes bei Frauen nach der Menopause scheint das aus dem Skelett mobilisierte Calcium zunächst eine erhöhte PTH-Sekretion zu verhindern. Die erhöhten PTH-Konzentrationen in fortgeschrittenem Alter scheinen auf einer abnehmenden Fähigkeit der Calciumregulierung zu beruhen (Riggs et al. 1998). Auf die im Alter verminderte Calciumabsorption, die beeinträchtigte dermale Vitamin D- und renale Calcitriolsynthese wurde bereits hingewiesen, ebenso wie auf weitere Risikofaktoren, die eine Rolle in der Pathogenese der Osteoporose älterer Menschen spielen.

2.6.2 Sekundäre Osteoporose

Der Begriff „sekundäre Osteoporose“ ist nicht klar von dem Begriff „primäre Osteoporose“ abzugrenzen und wird in der Literatur unterschiedlich verwendet. Während an der Entstehung der „primären“ Osteoporose ob ihrer Multikausalität letztendlich auch sekundäre Faktoren beteiligt sind, wird die „sekundäre“ Osteoporose häufig als Form der Erkrankung bezeichnet, deren Entstehung ganz bestimmte Erkrankungen oder Stoffwechselstörungen zugrunde liegen oder die iatrogen durch Medikamente induziert ist.

Während bei Frauen die postmenopausale Osteoporose die am häufigsten vorkommende Form ist, ist bei Männern die sekundäre Osteoporose von größter Bedeutung.

Eine Auswahl der Medikamente sowie Erkrankungen und Stoffwechselstörungen, die den Knochenmetabolismus beeinflussen und eine sekundäre Osteoporose verursachen können, ist in nachfolgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 5:

Auswahl verschiedener Medikamente sowie Erkrankungen und Stoffwechselstörungen, die eine sekundäre Osteoporose induzieren können.

Medikamente	
Glucocorticoide	Antikoagulantien
Benzodiazepine	L-Thyroxin
Antiepileptika	
Erkrankungen und Stoffwechselstörungen	
Endokrine Erkrankungen	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
Morbus Cushing	Morbus Crohn
Hypogonadismus	Colitis ulcerosa
Hypophysenvorderlappeninsuffizienz	Hämatologische Systemerkrankungen
Hyperthyreose	Multiples Myelom
Primärer Hyperparathyreoidismus	Mastozytose
Diabetes mellitus	Sonstige
Pulmonale Erkrankungen	Malabsorptionssyndrom
Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)	Lactoseintoleranz
Asthma bronchiale	Anorexia nervosa
Zystische Fibrose (Mucoviscidose)	Osteoporose nach Organtransplantation
Rheumatische Erkrankungen	
Rheumatoide Arthritis	

Nachfolgend sind die Auswirkungen von Glucocorticoiden exemplarisch für diese Osteoporoseform beschrieben.

2.6.2.1 Glucocorticoidinduzierte Osteoporose

Die glucocorticoidinduzierte Osteoporose stellt die am häufigsten vorkommende Form der sekundären Osteoporosen dar. Die endogene Synthese der Steroidhormone Cortisol und Cortison erfolgt in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde und wird über die Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-Achse reguliert. Bei Morbus Cushing kommt es infolge einer erhöhten ACTH-Produktion durch die Stimulierung der Nebennierenrinde zu einer vermehrten Cortisolproduktion. Die durch einen endogenen Hypercortisolismus induzierte Osteoporose stellt jedoch einen relativ geringen Anteil dar im Vergleich zu der durch exogene Glucocorticoidzufuhr ausgelöste Form.

Glucocorticoide erfüllen zahlreiche Stoffwechselfunktionen, ihr therapeutischer Einsatz ist aber in erster Linie auf die antiphlogistische und immunsuppressive Wirkung zurückzuführen. Zum Beispiel finden Glucocorticoide breite Anwendung in der Therapie von rheumatoiden Arthritiden oder chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen. In Abhängigkeit von Dosis und Applikationszeitraum können Glucocorticoide zu Knochenverlust und erhöhtem Frakturrisiko führen (Chavassieux et al. 2007). In einigen Studien wurde aufgezeigt, dass bei Langzeitbehandlung ein rascher Knochenverlust innerhalb eines Jahres erfolgte, welcher bereits drei Monate nach Therapiebeginn durch einen signifikanten Abfall der Knochendichte an der Wirbelsäule angezeigt werden konnte; selbst bei einer geringen Dosierung von beispielsweise 10 mg Prednisolon pro Tag (Pearce et al. 1998a, Pearce et al. 1998b). Allerdings gibt es Hinweise, dass die durch Glucocorticoide beeinträchtigte Knochenfestigkeit teilweise unabhängig von einer Verminderung der Knochendichte sein könnte, da die Frakturprävalenz höher ist, als es der Knochendichteminderung nach zu erwarten wäre (Peel et al. 1995, Manolagas 2000b). Epidemiologische Studien konnten einen dosisabhängigen Zusammenhang zwischen Glucocorticoideinnahme und bereits nach drei Monaten erhöhtem Frakturrisiko nachweisen. Eine tägliche orale Dosis von mehr als 2,5 mg Prednison war mit einem gesteigerten Risiko für Wirbel- und Hüftfrakturen assoziiert, wobei bei inhalativen Glucocorticoiden erst bei einer dreifachen äquivalenten Dosis das Frakturrisiko anstieg (van Staa et al. 2005, Vestergaard et al. 2005). Die Wirkung der Glucocorticoide manifestiert sich insbesondere in trabekulärem Knochen,

weshalb das Frakturrisiko insbesondere in Knochen mit hohem trabekulären Anteil, wie zum Beispiel Wirbelsäule und Femurhals, erhöht ist (van Staa et al. 2002, Kanis et al. 2004a). In Abhängigkeit von der kumulativen Dosis verlieren zunächst nur die Trabekel an Dicke, mit Konzentrationserhöhung sinken jedoch auch Anzahl und Konnektivität (Dalle Carbonare et al. 2001).

Die Pathophysiologie glucocorticoidinduzierter osteoporotischer Frakturen ist komplex und nicht nur auf die Calciummalabsorption zurückzuführen, sondern insbesondere auf die direkten Wirkungen auf den Knochen (Kanis et al. 2007). Zum einen induzieren Glucocorticoide die Apoptose von Osteocysten, deren verminderte Anzahl möglicherweise die Reparaturmechanismen von Mikrofrakturen und zudem in frakturiertem Knochen die Kallusbildung beeinträchtigt (Manolagas 2000b, Dunstan et al. 1993). Der Untergang der Osteocysten scheint ein bedeutender Faktor für die Zerstörung der Mikroarchitektur und Frakturprädisposition zu sein (Manolagas 2000b). Des Weiteren gelten Glucocorticoide als potente Inhibitoren der Osteoblastenaktivität, was die Abnahme der Trabekeldicke verursacht (Chavassieux et al. 2007). Außerdem lassen experimentelle Studien vermuten, dass Glucocorticoide dosisabhängig einen hemmenden Einfluss auf OPG und einen stimulierenden Einfluss auf die osteoblastäre Expression von RANKL haben und somit die Osteoklastogenese und Knochenresorption fördern (Hofbauer et al. 1999).

Diese Befunde zeigen, dass der Wirkungsweise der Glucocorticoide in erster Linie eine Zerstörung der Mikroarchitektur zugrunde liegt und insofern insbesondere die Minderung der Knochenqualität das Frakturrisiko begünstigt (van Staa 2006). Das würde erklären, weshalb die Frakturprävalenz möglicherweise höher ist als die dieser Verminderung der Knochendichte entsprechenden und müsste bei der Knochendichtemessung Berücksichtigung finden.

2.7 Tiermodelle in der Osteoporoseforschung

Nicht nur aufgrund der hohen Prävalenz und gesundheitsökonomischen Bedeutung der Osteoporose, sondern auch wegen einiger spezifischer Charakteristika, spielen Tiermodelle insbesondere bei dieser Erkrankung eine große Rolle.

Zum einen liegt der Entstehung der Osteoporose ein sehr langsam fortschreitender Prozess zugrunde und zum anderen werden die pathogenetischen Mechanismen durch eine Vielzahl endogener und exogener Faktoren beeinflusst, woraus sich große Schwierigkeiten ergeben, eine homogene Patientengruppe über einen ausreichend langen Zeitraum zu untersuchen. Zudem besteht Bedarf an der Entwicklung neuer Medikamente in Anlehnung an neu gewonnene Erkenntnisse aus der Erforschung der Grundlagen; insbesondere auch in dieser Hinsicht ist die Verfügbarkeit geeigneter Tiermodelle von großer Wichtigkeit (Turner 2001). Ein weiteres Forschungsziel besteht im Rahmen orthopädischer Fragestellungen, wobei in erster Linie Implantatfixierung und Frakturheilung sowie Wirbelkörperplastik in osteoporotischem Knochen von Interesse sind (Egermann et al. 2005, Turner 2001).

Die Einschränkungen, die hinsichtlich der Erforschung der Osteoporose am Menschen gegeben sind, können durch sorgfältige Auswahl eines der jeweiligen Fragestellung angepassten Tiermodelles teilweise überwunden werden. Zum einen bietet sich die Möglichkeit, große und homogene Gruppen zusammenzustellen und externe Einflüsse weitgehend auszuschließen. Darüber hinaus kann der Untersuchungszeitraum durch die Induktion von osteoporotischen Veränderungen am Knochen erheblich verkürzt werden (Turner 2001).

Zahlreiche Tierarten wie zum Beispiel Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen, Hunde und Schweine finden Verwendung in der Osteoporoseforschung, dennoch ist mit keinem der Modelle die Ätiologie der Osteoporose beim Menschen exakt widerzuspiegeln.

Der Begriff Osteoporose im Sinne der derzeit gültigen Definition über die Knochendichtemessung ist bei Tieren vorsichtig zu gebrauchen: Nicht nur, weil sich aus technischen Gründen zum Teil Schwierigkeiten ergeben, bei Quadrupeden mit

für die Humanmedizin konzipierten Vorrichtungen die Knochendichte an bestimmten Skelettorten (wie zum Beispiel dem Femurhals) zu messen, sondern insbesondere, da keine speziesspezifischen Referenzdaten existieren, welche die Definition anhand der Dichtemessung mittels DXA erlauben würden. Zudem sind bei Vierbeinern in der Regel keine Spontanfrakturen zu beobachten, so dass eine klinisch manifeste Osteoporose (wie sie definitionsgemäß Berücksichtigung findet) bei Tieren nicht vorliegt (Egermann et al. 2005, Turner 2001).

Alleiniges Östrogendefizit infolge Ovariectomie verursacht bei Tieren nicht die Abnahme der Knochendichte, welche dem Knochenverlust bei Frauen nach der Menopause entspräche, wobei nicht humane Primaten eine Ausnahme darstellen (Turner 2001, Mann et al. 1990). Die im Vergleich zum Menschen unterschiedliche mechanische Belastung des Skelettsystems in Kombination mit peripherer Östrogenproduktion in Fettgewebe könnte neben anderen Faktoren zu der geringen Frakturinzidenz bei großen Tiermodellen beitragen (WHO Scientific Group 2003, Turner 2001).

Dennoch sind osteoporotische Veränderungen am Knochen zu induzieren, wobei in der Regel eine Kombination verschiedener Maßnahmen, wie zum Beispiel Ovariectomie, Steroidmedikation und calciumreduzierte Fütterung den ausgeprägtesten Knochenverlust verursacht (Lill et al. 2002, Egermann et al. 2005). Die Auswirkungen verschiedener den Knochenstoffwechsel beeinflussender Maßnahmen unterscheiden sich jedoch speziesspezifisch, so dass je nach Fragestellung eine sorgfältige Auswahl des Tiermodells unter Berücksichtigung mehrerer Aspekte vorgenommen werden muss. Hierbei spielen physiologische Unterschiede, wie die Zyklusbesonderheiten, weitere endokrinologische Regulationsmechanismen und Folgen auf den Knochenstoffwechsel oder die Art des Gastrointestinaltraktes der einzelnen Spezies eine große Rolle (Turner 2001). Eine natürliche Menopause tritt bei Tieren nicht ein, wovon nicht humane Primaten ausgenommen sind (Rodgers et al. 1993). Weibliche nicht humane Primaten weisen einen monatlichen Zyklus sowie eine natürliche Menopause ab dem 20. Lebensjahr auf (Kimmel 1996). Mehrere Studien wurden z. B. mit Javaneraffen (Langschwanzmakaken) und Rhesusaffen durchgeführt, in denen anhand der Gonadotropin-, Östrogen- und Progesteronkonzentrationen aufgezeigt werden

konnte, dass sie zum Zeitpunkt der Menopause ähnlichen hormonellen Veränderungen unterliegen wie die Frau (Hodgen et al. 1977). Weibliche Rhesusaffen, die mit GnRH-Agonisten behandelt werden, weisen ein Maß der Knochendichteminderung auf, die dem postmenopausalen Knochenverlust von Frauen ähnlich ist (Mann et al. 1990). Mehrere Faktoren limitieren jedoch den Einsatz von nicht humanen Primaten als Tiermodell. Zum Beispiel wird die „peak bone mass“ erst im Alter von etwa neun Jahren erreicht, so dass v. a. ältere Tiere ideale Modelle darstellen (Jayo et al. 1994). Zum anderen sind neben Schwierigkeiten hinsichtlich der Durchführbarkeit auch ethische Erwägungen in Betracht zu ziehen.

Ein verbreitetes Tiermodell in der Osteoporoseforschung ist die ovariectomierte (OVX) Ratte. Nicht nur wegen guter Praktikabilität, allgemeiner Akzeptanz und eines hohen Wissensstandes ob des vielfältigen Einsatzes hinsichtlich medizinischer Fragestellungen ist die Verwendung dieses Tiermodells von Vorteil: Die ovariectomierte Ratte zeigt viele Charakteristika des postmenopausalen Knochenverlustes der Frau (Turner 2001). Eine natürliche Menopause tritt nicht ein, jedoch ist durch Ovariectomie bei der Ratte ein signifikanter Knochenverlust zu induzieren, der einen mehrphasigen Verlauf mit raschem Knochenverlust in den ersten drei Monaten, einer stabilen Phase und einem langsamen Knochenverlust in trabekulärem Knochen nach etwa neun Monaten zeigt (Wronski et al. 1989). Die insgesamt Knochendichteminderung ist jedoch geringer als die beim Menschen zu beobachtende (Egermann et al. 2005). Ratten verfügen im Gegensatz zu einigen anderen Tieren und dem Menschen über keine Havers'schen Blutgefäße in kortikalem Knochen und eignen sich daher wenig für Fragestellungen, die den kortikalen Knochenverlust betreffen. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass im späten Stadium des Östrogenmangels bei Ratten im Gegensatz zur Frau die Osteoblastenfunktion nicht beeinträchtigt ist (Wronski und Yen 1991). Dennoch ist die ovariectomierte Ratte ein geeignetes und etabliertes Modell für die durch trabekulären Knochenverlust gekennzeichnete postmenopausale Osteoporose der Frau, insbesondere auch hinsichtlich therapeutischer bzw. pharmakologischer Fragestellungen. Bereits zwei Wochen nach Ovariectomie sind ein erhöhter Knochenumsatz mit Knochenresorption und nachfolgendem Knochenverlust in trabekulärem Knochen zu beobachten (Thompson et al. 1995).

Die Arzneimittelzulassungsbehörde der USA, die Food and Drug Administration (FDA), erstellte 1994 Richtlinien für die Evaluierung von Arzneimitteln, welche in der Prävention und Therapie der postmenopausalen Osteoporose zum Einsatz kommen. In diesen wird empfohlen, für präklinische Studien zwei verschiedene Tiermodelle zu verwenden, da keine Tierart alleine alle Charakteristika der Osteoporose beim Menschen widerspiegelt. Demnach sollen die Studien zunächst an der OVX-Ratte und im Folgenden an einem „non-rodent model“, zum Beispiel einem Großtiermodell, welches über ein dem Menschen ähnliches Remodeling verfügt, durchgeführt werden (Food and Drug Administration 1994). In dieser Hinsicht sind insbesondere ältere, weibliche nicht humane Primaten sowie ovariectomierte Schafe und Schweine von Interesse (Thompson et al. 1995).

Das weibliche Schaf zeigt nicht nur einen Knochenverlust nach Ovariectomie, sondern auch quantitativ und temporär ähnliche Hormonprofile wie die Frau (Lill et al. 2002, Turner et al. 1995). Obwohl einige Rassen saisonal polyöstrisch sind, zeigen andere Rassen (z. B. das Merinoschaf) einen fast ganzjährigen Zyklus und könnten infolgedessen empfindlicher auf Östrogenmangel reagieren. Dennoch tritt auch bei Schafen keine natürliche Menopause ein (Turner 2002). Zu beachten ist, dass bei Schafen saisonale Variationen, welche Knochendichte und Knochenumsatz betreffen, von Bedeutung sind, wobei ein Anstieg der Knochenmasse im Sommer und ein Abfall während der Wintermonate gegeben zu sein scheint (Arens et al. 2006). Auch bei postmenopausalen Frauen konnten saisonale Unterschiede in der Knochendichte von 1,4 % mit einem Höhepunkt im August beobachtet werden (Bergstrahl et al. 1990). Ein Nachteil bei der Verwendung von Schafen könnte der von Monogastriern sehr verschiedene Gastrointestinaltrakt sein, insbesondere in Bezug auf orale Applikation bzw. Absorption von Medikamenten. Zudem bestehen Unterschiede im Phosphatmetabolismus; bei Wiederkäuern erfolgt im Gegensatz zur renalen Phosphatelimination beim Menschen die Ausscheidung in erster Linie über den Verdauungstrakt (Turner 2002).

Das ältere weibliche Schaf ist insbesondere aufgrund der Veränderungen in trabekulärem Knochen nach Östrogenentzug ein geeignetes Modell für die postmenopausale Osteoporose der Frau (Newton et al. 2004). Die Abnahme der Knochendichte kann beim Schaf durch Kombination von Ovariectomie,

Glucocorticoidmedikation sowie calcium- und Vitamin D-reduzierte Fütterung noch verstärkt werden: Auf diese Weise wurde in trabekulärem Knochen eine Abnahme der Knochendichte um 58 % und in kortikalem Knochen um 22 % induziert (Lill et al. 2002). Diese Faktoren prädisponieren neben der im Vergleich zu kleinen Tiermodellen ausreichenden Knochengröße das Schaf auch für orthopädische Fragestellungen, insbesondere bezüglich Frakturheilung, Implantatfestung und Frakturbehandlung (Egermann et al. 2005, Turner 2002).

3 Material und Methoden

Im Rahmen einer Studie über Fraktur- und Knochendefektheilung beim Osteoporosemodell Schaf wurden in vorliegender Arbeit verschiedene Knochenstoffwechselfparameter bestimmt. Mögliche Unterschiede im Heilungsverlauf von osteoporotischem und nicht osteoporotischem Knochen sollen auf diese Weise dargestellt werden.

Bei einer Gruppe der Tiere wurde Osteoporose durch Ovariectomie, calcium- und Vitamin D-restriktive Fütterung sowie Steroidmedikation induziert. Eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Nach Tibiaosteotomie und Setzen eines Fixateur externe bei allen Tieren erfolgte die Messung der biochemischen Knochenmarker in Blut und Urin über einen Zeitraum von 40 Tagen.

Die Versuche am Tier wurden im AO Research Institute, Davos, Schweiz, durchgeführt und gingen in weitere Studien des Instituts ein. Im Institut für Physiologie und Tierernährung der LMU München wurden die Konzentrationen der biochemischen Knochenmarker gemessen.

3.1 Versuchstiere

In vorliegende Studie gingen 13 weibliche Tiere der Rasse „Weißes Alpenschaf“ ein. Alle Tiere stammten aus der Zucht von W. Zahner, 8467 Truttikon, Schweiz.

Die erste Gruppe, im Folgenden OVX-Gruppe genannt, beinhaltete sechs Tiere, bei denen im Verlauf der Studie Osteoporose induziert wurde. Das ursprünglich vorgesehene siebte Tier musste aufgrund einer Infektion aus dem Versuch genommen werden. Die Tiere dieser Gruppe waren zu Versuchsbeginn durchschnittlich 6,3 Jahre alt und wogen im Mittel 61 Kilogramm.

Tabelle 6:
Versuchstierdaten und Operationszeitpunkte

	ID-Nr.	Geburtsdatum	Alter zu Beginn des Versuchs	Gewicht zu Beginn des Versuchs	Ovarektomie	Tibiaosteotomie
OVX-Gruppe (n=6)	599	10.10.1991	ca. 7 Jahre	60 kg	05.08.1998	07.07.1999
	711	13.12.1991	ca. 7 Jahre	60 kg	21.07.1998	19.05.1999
	786	12.01.1994	ca. 4 Jahre	65,5 kg	23.07.1998	18.05.1999
	838	22.10.1991	ca. 7 Jahre	59 kg	22.07.1998	06.07.1999
	842	01.12.1991	ca. 7 Jahre	60 kg	24.07.1998	08.07.1999
	845	02.12.1991	ca. 7 Jahre	61,5 kg	16.07.1998	05.07.1999
Kontrollgruppe (n=7)	719	20.03.1995	ca. 3 Jahre	66 kg	—	26.05.1999
	744	06.03.1995	ca. 3 Jahre	62 kg	—	12.04.1999
	758	18.03.1995	ca. 3 Jahre	69 kg	—	13.04.1999
	772	26.05.1995	ca. 3 Jahre	59,5 kg	—	20.05.1999
	807	10.10.1995	ca. 3 Jahre	58 kg	—	26.05.1999
	819	11.10.1995	ca. 3 Jahre	57 kg	—	14.04.1999
	839	08.10.1995	ca. 3 Jahre	63 kg	—	21.05.1999

Die Studie begann mit der Induktion osteoporotischer Veränderungen am Knochen durch bilaterale Ovarektomie bei den Tieren der OVX-Gruppe. Über einen Zeitraum von acht Monaten wurden die Tiere calcium- und Vitamin D- reduziert gefüttert sowie mit Steroiden behandelt, beginnend zwei Wochen nach der Operation. Um eine Sonnenexposition zu vermeiden, wurden die Tiere mit der Möglichkeit eines Auslaufes im Stall gehalten, die Unterbringung erfolgte in Gruppen .

Die zweite Gruppe bestand aus sieben Tieren, die durchschnittlich 3,0 Jahre alt waren und 62,1 Kilogramm wogen. Bei den Tieren dieser Gruppe, im Folgenden Kontrollgruppe genannt, unterblieb die Induktion osteoporotischer Veränderungen am Knochen. Die Haltung erfolgte in den Sommermonaten auf der Weide, im Winter in Gruppenhaltung im Stall mit Auslauf.

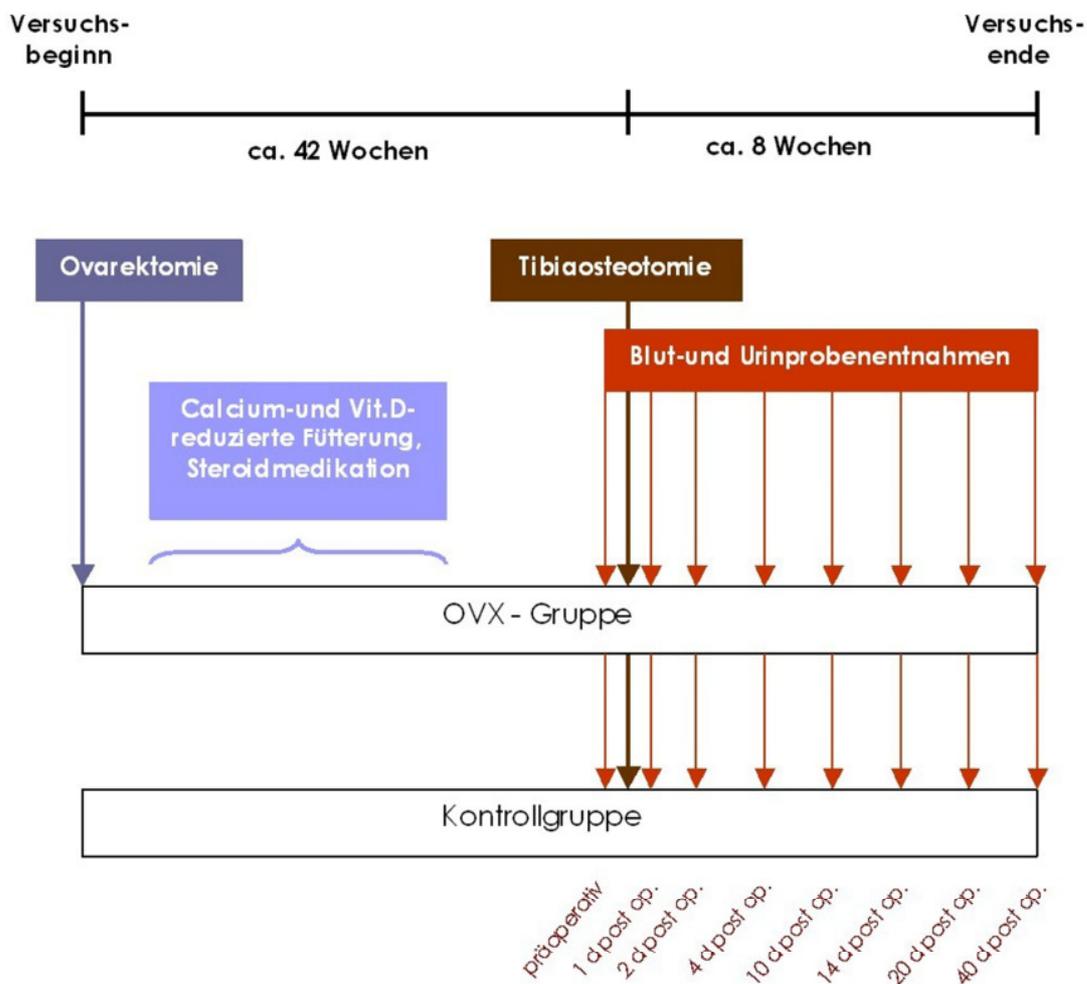


Abbildung 4:
Vereinfachte und schematisierte Darstellung des Versuches

Während der gesamten Dauer des Projektes befanden sich die Tiere unter tierärztlicher Aufsicht. Entwurmungen (Ovitelmin®, Fa. Janssen) und Gewichtskontrollen wurden regelmäßig durchgeführt.

Die auf Tierversuche anzuwendenden Vorschriften gemäß dem Schweizer Tierschutzgesetz und den europäischen Konventionen zum Tierschutz wurden eingehalten. Eine Versuchsgenehmigung lag vor.

3.2 Induktion der osteoporotischen Veränderungen am Knochen

3.2.1 Ovariectomie

Die Ovariectomie wurde an den Tieren der OVX-Gruppe im AO Research Institute in Davos, Schweiz, vorgenommen. Im Zuge der Operation wurde außerdem eine Beckenkammbiopsie durchgeführt, die Teil einer anderen Studie darstellt.

Vor Beginn der Anästhesie wurden die Tiere bei freiem Zugang zu Wasser 24 Stunden nüchtern gehalten. Noch im Stall erfolgte die Prämedikation mit 0,3 ml Detomidin (Domosedan®, 10 mg/ml, Farnos, Pfizer AG Zürich) intramuskulär in die rechte Hintergliedmaße. Nach etwa fünfzehn Minuten waren die Tiere ausreichend sediert, so dass sie gewogen und zum Operationsbereich transportiert werden konnten. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 6 - 8 ml Pentothal® (Thiopental 50 mg/ml, Abbott AG, Cham) in die Jugularvene. Nach ausreichender Muskelrelaxation wurden die Tiere intubiert. Zur Vertiefung und Aufrechterhaltung der Narkose dienten Sauerstoff und Isofluran® (Halocarbon Laboratories, New Jersey), bei einigen Tieren auch Halothan® und Lachgas. Unmittelbar nach Narkoseeinleitung wurde 1 ml Temgesic® (Buprenorphin HCl 0,3 mg/ml, Reckitt & Colman Pharm., England) intravenös zur Schmerzausschaltung verabreicht.

In Rückenlage wurde der Bereich des Beckenkammes rasiert, gereinigt (Betadineseife®, Polyvinylpyrrolidon-Jod, Mundipharma), desinfiziert (Jodobac®, Fa. Bode) und steril abgedeckt. Nach Setzen eines etwa fünfzehn cm langen Hautschnittes kranial des Euters, Präparation des Subkutanfettes, Inzision der Linea alba und Eröffnung des Peritoneums wurde der Uterus lokalisiert und beide Uterushörner in die Bauchöffnung vorgelagert. Die Ovarien wurden nacheinander dargestellt und nach Abklemmen und Ligieren (Vicryl 2/0) von Ovargefäßen und Mesovar abgesetzt. Die Blutungen wurden kontrolliert und der Uterus reponiert. Peritoneum und Linea alba wurden durch eine fortlaufende Schlingennaht (PDS 1),

die Subkutis durch eine einfach fortlaufende Naht (Vicryl 2/0) und die Haut mit acht Klammern, die zwölf Tage post operationem entfernt wurden, verschlossen. Die Wundabdeckung erfolgte mit einem sterilen Verband. Auf die perioperative Gabe von Antibiotika wurde verzichtet.

3.2.2 Fütterung

Die Tiere der OVX-Gruppe wurden mit einer speziellen Diät der Firma EBERLE NAFAG AG, 9201 Gossau gefüttert, die gegenüber bedarfsorientierten Futtermitteln einen verminderten Gehalt an Calcium und Vitamin D₃ sowie einen erhöhten Gehalt an Phosphor aufwies, so dass ein inverses Calcium-Phosphor-Verhältnis vorlag. In einem Kilogramm des Spezialfutters Nr. 8277 waren 1,4 g Calcium und 8,1 g Phosphor enthalten; Vitamin D₃ wurde nicht zugesetzt. Von diesem Futter wurden zweimal täglich jeweils 455 g gefüttert (800 g TS pro Tag). Zusätzlich erhielten die Tiere Stroh zu einem Anteil von 20 % an der Gesamtration, d.h. etwa 230 g.

Mit dieser Ration wurde den Tieren täglich ca. 1,85 g Calcium (0,03 g/kg KG) und 7,99 g Phosphor (0,13 g/kg KG) zugeführt, das Calcium-Phosphor-Verhältnis betrug 0,23.

Die Fütterung erfolgte während der 22 Wochen in Gruppenhaltung durch eine Futtermaschine mittels Ohrmarkenerkennung. Während der sechs folgenden Wochen, in denen die Tiere einzeln gehalten wurden, wurden Menge und Zusammensetzung des Futters beibehalten.

Tabelle 7:

Calcium-, Phosphor- und Vitamin D-Bedarf (Kamphues et al. 1999) im Vergleich zur zugeführten Menge

	Täglicher Erhaltungsbedarf für Schafe (LM 61 kg)	Täglich mit Diätfutter 8277 und Stroh zugeführte Mengen
Calcium	5 g	1,9 g
Phosphor	4 g	7,7 g
Vitamin D ₃	305 IE	unter 100 IE
Calcium / Phosphor	1,25	0,23

Tabelle 8:
Zusammensetzung des Diätfutters 8277 der Fa. EBERLE NAFAG

<u>Futterkomponenten</u>	<u>Zusammensetzung pro kg uS</u>		
Getreideprodukte und Rohfaserträger:	Trockensubstanz	88,0	%
Hafer	Rohprotein	13,0	%
Weizenkleie	Rohfaser	11,7	%
Strohmehl	Rohfett	4,6	%
Mais	Rohasche	5,2	%
Melasse			
Pflanzliche Eiweißträger:	Calcium	1,4	g
Bierhefe	Phosphor	8,1	g
Yea-Sacc-Hefe	Kalium	10,5	g
	Natrium	2,4	g
	Magnesium	3,8	g
Energieträger:	Eisen	197	mg
Sojaöl	Jod	2,2	mg
	Kobalt	5,1	mg
Vormischungen:	Mangan	118	mg
Vitaminvormischung	Zink	127	mg
Mineralstoffvormischung	Kupfer	10,6	mg
Spurenelementvormischung			

Da die Tiere der Kontrollgruppe in den Sommermonaten auf der Weide gehalten wurden, waren die exakten Mengen und Gehalte des aufgenommenen Futters nicht bekannt. Im Winter erhielten die Tiere eine tägliche Ration aus 100 g handelsüblichem Krafffutter für Schafe, 750 g Heu, 1 kg Grassilage sowie ca. 1 kg Stroh. Der Erhaltungsbedarf an Calcium, Phosphor und Vitamin D₃ (5 g Calcium/ Tag, 4 g Phosphor/ Tag und 5 IE Vitamin D₃/ kg KM/ Tag) war durch diese Ration gedeckt.

3.2.3 Glucocorticoidmedikation

Zwei Wochen nach der Ovariectomie begann - ebenfalls nur bei den Tieren der OVX-Gruppe - die Steroidmedikation als weitere, den Knochenmasseverlust fördernde Maßnahme. Über einen Zeitraum von sieben Monaten wurde den Tieren eine spezielle Zubereitung des synthetischen Glucocorticoids Methylprednisolon (Methylprednisoloni acetat 40 mg/ml Ch.-Nr. 607707, G. Streuli & Co. AG Pharmaceutica, 8730 Uznach) im Wechsel in Hintergliedmaßen-, Schulter- und Nackenmuskulatur injiziert. In den ersten 14 Wochen der Steroidmedikation erhielten die Tiere dreimal wöchentlich je 40 mg Methylprednisolon in Form einer Lösung. Um die Abnahme der Knochenmasse zu überprüfen, erfolgten sechs und 14 Wochen nach Beginn der Steroidmedikation Knochendichtemessungen mittels CT. Aufgrund des geringen Knochenmasseverlustes wurden in den folgenden 14 Wochen fünfmal wöchentlich 40 mg des Steroids verabreicht. Da auch nach der Erhöhung der wöchentlichen Dosis die erwartete Verminderung der Knochendichte ausblieb, was durch eine weitere CT-Messung 22 Wochen nach Beginn der Medikation festgestellt wurde, erfolgte in den letzten sechs Wochen eine Umstellung auf eine kristalloide Suspension, wobei Dosierung und Applikationsintervalle beibehalten wurden.

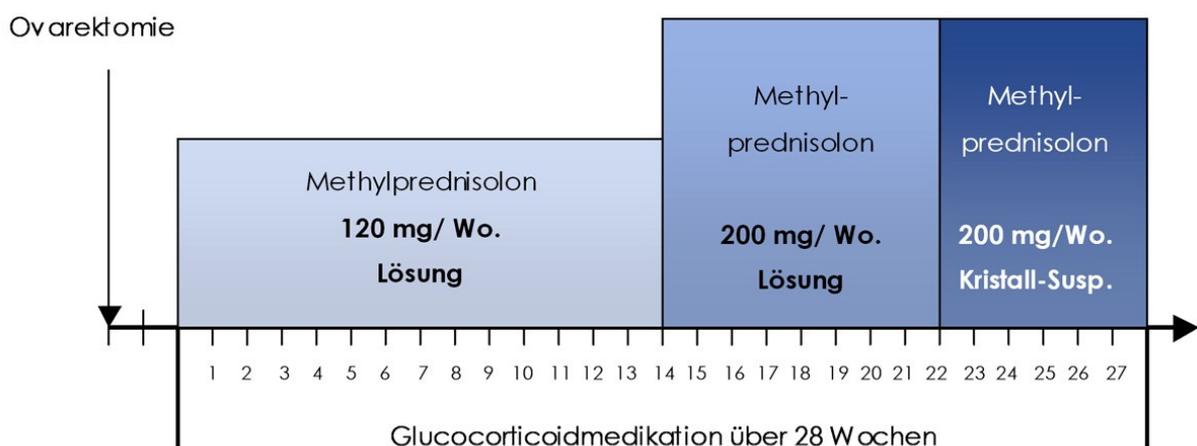


Abbildung 5:
Änderung der Steroiddosierung und -form während des Versuchs

3.3 Tibiaosteotomie

Im AO Research Institute, Davos, Schweiz, wurde unter Leitung von Herrn Dr. Christoph Lill bei den Tieren beider Gruppen eine standardisierte transverse Mittelschaft-Tibiaosteotomie vorgenommen und durch einen Fixateur externe für den Zeitraum von acht Wochen stabilisiert. Während dieser Zeit wurden Steifigkeitsmessungen, Knochendichtebestimmungen mittels peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT) und Röntgenkontrollen vorgenommen, deren Ergebnisse in weiteren Studien dargestellt sind.

Um die Knochenheilung nicht durch die Corticosteroidwirkung zu beeinflussen, wurde erst drei Monate nach Beendigung der Steroidmedikation mit der Durchführung der Tibiaosteotomie begonnen.

Vor Beginn der Anästhesie wurden die Tiere 24 Stunden nüchtern gehalten. Sedierung, Narkoseeinleitung und –aufrechterhaltung sowie intraoperative Analgesie entsprachen der im Zuge der Ovariectomie durchgeführten Vorgehensweise.

In rechter Seitenlage wurde die rechte Hintergliedmaße geschoren, desinfiziert und steril abgedeckt. Nach Palpation und Markierung des distalen Gelenkspaltes wurden an der medialen Seite der Tibia über Stichinzisionen mit Hilfe einer Bohrlehre vier selbstbohrende Schanz-Schrauben (Synthes AG Schweiz) in mediolateraler Richtung eingebracht. Die Schrauben, von denen die distale standardisiert 2 cm proximal des distalen Gelenkspaltes positioniert wurde, wiesen einen Außendurchmesser von 5 mm und einen Kerndurchmesser von 3,5 mm auf. Der Abstand zwischen den Schrauben betrug 4 cm. Ein speziell angefertigter Mess-Fixateur wurde im Abstand von 20 mm zum Knochen auf den Schrauben befestigt. Vor der Osteotomie der Tibia wurde eine Steifigkeitsmessung durchgeführt. Für die Osteotomie wurde ein 5 cm langer, longitudinaler Hautschnitt zwischen der zweiten und dritten Schraube angelegt und die Tibia unter Schonung des Periosts freigelegt. Nach Montage einer Sägelehre auf den Mess-Fixateur und Inzision des Periost wurde mit einer oszillierenden Säge ein standardisierter, 3 mm breiter Frakturspalt gesetzt. Während des Eingriffs wurde das Operationsgebiet mit 0,9%iger, steriler Kochsalzlösung gespült. Der Mess-Fixateur wurde entfernt und ein für die Dauer der Knochenheilung bleibender Fixateur externe angebracht, welcher den Frakturspalt konstant auf 3 mm

hielt. Nach Wundverschluss und Anlegen eines sterilen Verbandes wurde die Steifigkeitsmessung wiederholt und Knochendichtemessungen an osteotomierter und linker Tibia durchgeführt.

Postoperativ erhielten die Tiere ein Analgetikum; Antibiotika wurden während des Versuchs nicht gegeben. Den Tieren, die in Einzelboxen untergebracht waren, wurden immobilisierende Unterstützungsgurte angelegt, die eine Belastung der Gliedmaßen jedoch zuließen.

Im weiteren Verlauf des Versuchs wurden ab der zweiten Woche post operationem wöchentlich Steifigkeitsmessungen, in der vierten und achten Woche post operationem Knochendichtemessungen sowie Röntgenkontrollen durchgeführt. Post mortem wurden Torsions- und Biegemessungen an den Tibiae vorgenommen. Diese Untersuchungen gehen in andere Studien des AO Research Institutes Davos, Schweiz, ein.

3.4 Euthanasie

Die Tiere wurden zwei Monate nach Durchführung der Tibiaosteotomie durch die intravenöse Applikation von 20 ml Vetanarcol® (Pentobarbital 162 mg/ml) euthanasiert.

3.5 Laboruntersuchungen

3.5.1 Probengewinnung

Blut- und Urinproben wurden im AO Research Institute, Davos, Schweiz, unter Berücksichtigung der circadianen Rhythmik der biochemischen Knochenmarker gewonnen.

Zu Beginn des Versuchs, am Tag vor der Durchführung der Tibiaosteotomie, sowie am ersten, zweiten, vierten, zehnten, 14., 20. und 40. Tag nach der Operation wurde bei

allen Tieren Morgenurin in einem speziell für den Versuch entwickelten Auffanggurt gesammelt und bei -20 °C tiefgefroren.

Die Blutentnahmen erfolgten am Tag vor sowie am ersten, zweiten, vierten, zehnten, 14., 20. und 40. Tag nach der Operation. Bei allen Tieren wurden morgens zwischen 7.00 und 8.00 Uhr 10 ml Blut aus der Vena jugularis externa mit Hilfe des S-Monovette® Systems (Sarstedt AG & Co., Nürnberg) entnommen und unverzüglich 10 Minuten bei 4 °C und mit 2200 U zentrifugiert (Universal-Zentrifuge K2S, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen). Das Serum wurde abpipettiert und in Eppendorf-Röhrchen® (Eppendorf AG, Hamburg) bei -20 °C tiefgefroren.

3.5.2 Bestimmung biochemischer Parameter des Knochenstoffwechsels

Die Laboruntersuchungen wurden im Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der LMU München durchgeführt.

Im Serum erfolgte die Bestimmung der Knochenaufbaumarker alkalische Phosphatase (AP) und knochenspezifische alkalische Phosphatase (bAP) sowie die Bestimmung von Calcium. Im Urin wurden die Collagen-Crosslinks Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) sowie Calcium als Parameter des Knochenabbaus, und Creatinin als Bezugsgröße für die Urinparameter gemessen.

Tabelle 9:

In Serum bzw. Urin bestimmte Parameter des Knochenstoffwechsels

Marker der Knochenformation:	
Alkalische Phosphatase (AP)	(Serum)
Knochenspezifische alkalische Phosphatase (bAP)	(Serum)
Marker der Knochenresorption:	
Collagen-Crosslinks:	
Pyridinolin (PYD)	(Urin)
Desoxypyridinolin (DPD)	(Urin)
Calcium	(Urin)

3.5.2.1 Bestimmung der Parameter der Knochenformation: Alkalische Phosphatase und knochenspezifische alkalische Phosphatase

Die Bestimmung der Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatase (tAP) basiert auf der enzymatischen Umsetzung von p-Nitrophenylphosphat und H₂O zu Phosphat und p-Nitrophenol: Die Abspaltung des Phosphatrestes vom Testsubstrat führt zur Bildung eines p-Nitrophenolat-Anions, welches sich aufgrund seiner gelben Farbe im alkalischen Milieu photometrisch quantifizieren lässt. Hierbei ist die pro Zeiteinheit freigesetzte Menge und die damit verbundene Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm direkt proportional zur Gesamtaktivität der in der Serumprobe vorhandenen alkalischen Phosphatase.

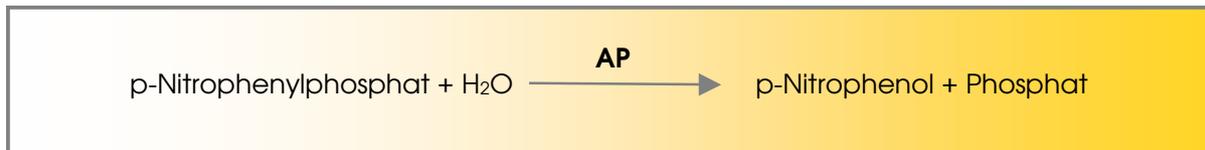


Abbildung 6:
Umsetzung von p-Nitrophenylphosphat durch die alkalische Phosphatase

Die knochenspezifische alkalische Phosphatase (bAP) wird indirekt durch Messung der Aktivität des intestinalen Isoenzym bestimmt: L-p-Bromtetramisol hemmt alle Isoenzyme der alkalischen Phosphatase mit Ausnahme des intestinalen Isoenzym. Die Konzentration der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase kann dann aus der Differenz der gesamtalkalischen und der intestinalen alkalischen Phosphatase (iAP) errechnet werden.

Zunächst wurde eine Pufferlösung mit einem pH-Wert von 10,4 aus Aminomethylpropanol (350 mmol/l), EDTA (2 mmol/l), Magnesiumacetat (2 mmol/l) und Zinksulfat (1 mmol/l) hergestellt. Durch Lösen des Testsubstrats p-Nitrophenylphosphat (16 mmol/l) in 100 ml des Puffers erhielt man das zum Nachweis der gesamtalkalischen Phosphatase benötigte Reagenz 1. 1 ml des Reagenz 1 wurde zusammen mit 20 µl der Serumprobe in einer im Wasserbad bereits temperierten Mikro-Küvette auf 37 °C erwärmt. Nach Umrühren mit einem Plastikspatel erfolgte die photometrische Messung der Extinktionen bei 405 nm zum Zeitpunkt Null sowie nach ein, zwei, drei und vier Minuten. Aus dem Mittelwert der

Differenzen (ΔE) wurde dann nach folgender Formel die Konzentration der alkalischen Phosphatase errechnet:

$$tAP \text{ (U/l)} = \Delta E / \text{Min.} \times 3306$$

Die Proben wurden jeweils im Doppelansatz gemessen. Der Mittelwert beider Ergebnisse diente als Berechnungsgrundlage nach obiger Formel.

Die Bestimmung des intestinalen Isoenzym erfolgte ebenfalls im Doppelansatz. Zunächst wurde Reagenz 2 hergestellt durch Lösen von L-p-Bromtetramisol (0,2 mmol/l) in Reagenz 1. Dieser Vorgang erfolgte aufgrund der schlechten Löslichkeit von Bromtetramisol im Ultraschallbad. Daraufhin wurde 1 ml des Reagenz 2 mit 20 μ l der Serumprobe in einer temperierten Mikroküvette auf 37 °C erwärmt und mit Hilfe eines Plastikspatels vermischt. Im Photometer wurden ebenfalls die Extinktionen bei 405 nm zum Zeitpunkt null, nach einer, zwei, drei und vier Minuten gemessen. Die Konzentration der intestinalen alkalischen Phosphatase wurde wie folgt berechnet:

$$iAP \text{ (U/l)} = \Delta E / \text{Min.} \times 3306$$

Aus der Differenz der gesamtalkalischen und der intestinalen alkalischen Phosphatase wurde schließlich die Konzentration der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase ermittelt.

$$bAP = tAP - iAP$$

Die zur Analyse verwendeten Reagenzien, Materialien und Geräte sind in nachfolgender Tabelle beschrieben.

Tabelle 10:
Für die Bestimmung der alkalischen Phosphatase und knochenspezifischen alkalischen Phosphatase verwendete Reagenzien, Materialien und Apparate

Reagenzien	Hersteller
p-Nitrophenylphosphat	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Alcaline Buffer Solution (Aminomethylpropanol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
L-p-Bromtetramisol	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
EDTA	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Magnesiumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Zinksulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Materialien	
Polystyrol- Mikroküvetten	Brand GmbH & CoKG, Wertheim
Kunststoff- Rührspatel	
Apparate	
Analysenwaage (0,1 mg)	Sartorius AG, Göttingen
Ultraschallbad	Polaron, Watford, England
Photometer	Thermo Spectronic, Typ Genesis 10uv

Der Referenzbereich für die Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatase bei adulten Schafen wird mit 50 – 250 U/l angegeben (Bostedt und Dedie 1996).

3.5.2.2 Bestimmung der Parameter der Knochenresorption

3.5.2.2.1 Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin

Die Bestimmung der Einzelkonzentrationen von Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) im Urin wurde nach einer modifizierten isokratischen Methode durchgeführt. Die Detektion von Pyridinolin und Desoxypyridinolin erfolgte durch Eigenfluoreszenz in einer Ionenpaar-Reversed-Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)-Anlage nach saurer Hydrolyse und Vorreinigung der Proben in Cellulose-Chromatographie-Säulen.

Tabelle 11:
Reagenzien, Materialien und Apparate für die Bestimmung der Collagen-Crosslinks im Urin

Reagenzien und Materialien	Hersteller
1-Butanol	Merck KgaA, Darmstadt
Acetonitril, „gradient grade“	Merck KgaA, Darmstadt
Essigsäure 100 %	Merck KgaA, Darmstadt
Fibrous Cellulose Powder CF 1	Whatman International Ltd., Maidstone, England
Hepatofluorobutyricacid (HFBA)	Sigma Chemical Co.
Reinstwasser	Hauseigene Herstellung (Anlage Seralpur Delta, Seral Reinstwasser-Systeme)
Salzsäure, rauchen, 37 % reinst	Merck KgaA, Darmstadt
Pyridinolin- und Desoxypyridinolin-Kalibrator, PYD/DPD-HPLC-Calibrator	Metra Biosystems Inc., Mountain View, USA
Poly-Prep® Chromatography Columns (0,8 x 4 cm)	Bio-Rad Laboratories
Apparate	
<p>HPLC-Anlage:</p> <p>Integrator, Shimadzu C-R4AX Chromatopac</p> <p>Fluoreszenzdetektor, Shimadzu RF-551S Spectrofluorometric Detektor</p> <p>Pumpe und Steuergerät, Waters 510 Solvent Delivery System and Waters Automated Gradient Controller, Waters Millipore S.A.</p> <p>Probengeber, Pharmacia KKB Autosampler 2157</p> <p>Chromatographiesäule, Spherisorb ODS-2-C18-2 (5µl) mit Vorsäule, Sph ODS-2,5µ 3000-10, Latak Labortechnik-Geräte GmbH, Eppelheim</p> <p>Kühlung, Colora Messtechnik GmbH, Lorch</p>	
Vakuumentrifuge, speed vac concentrator, Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen	
Tischkühlzentrifuge 301 K, Sigma, Osterode	
Trockenschrank (Tv 50 u), Memmert, Schwabach	

Für den Aufschluss der Proben wurde jeweils 1 ml Urin mit 1 ml 37%iger Salzsäure versetzt und über 24 Stunden im Trockenschrank bei 110 °C hydrolysiert, so dass die Collagen-Crosslinks nicht mehr peptidgebunden, sondern in freier Form vorlagen. Danach wurden die Proben 10 Minuten lang bei 3500 U/Min. zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 1000 µl entnommen, um diese auf die vorbereiteten Cellulose-Säulen zu überführen.

Für die Vorbereitung der Cellulose-Chromatographie- Säulen wurde die Cellulose in dem 20-fachen Volumen eines Lösungsmittelgemisches aus Butanol, Eisessig und Reinstwasser im Verhältnis 4:1:1 suspendiert und mit Hilfe eines Magnetrührers zwei bis drei Stunden bis zur Quellung gerührt. In die Chromatographie-Säulen wurden zunächst je zweimal 4 ml der gequollenen Cellulose und im Anschluss daran 2,5 ml des Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisches pipettiert. Die Verdichtung der Cellulose erfolgte mit einem Glasspatel. Nun wurden die Säulen viermal mit je 5 ml des Lösungsmittelgemisches gewaschen und von unten verschlossen. Nachdem die Säulen mit weiteren 5 ml beschickt worden waren, blieben sie 90 Minuten lang verschlossen stehen, damit sich der Cellulose-Schlamm absetzen konnte. Nach vollständigem Auslaufenlassen der Säulen wurden die vorbereiteten Urinproben auf die Säulen überführt und viermal mit je 5 ml des Lösungsmittelgemisches nachgewaschen, um die die Chromatographie störenden Aminosäuren, Salze und Chromogene zu entfernen. Anschließend erfolgte die Elution von Pyridinolin und Desoxypyridinolin mit zweimal je 2 ml Reinstwasser. Die überständige Butanol-Phase wurde vorsichtig abpipettiert und die wässrige Phase in einer Vakuumzentrifuge bis zur Trocknung eingedampft.

Die Analyse in der HPLC-Anlage wurde als Umkehrphasenchromatographie (Reversed-Phase-Chromatography) durchgeführt, in der die mobile Phase polar und die stationäre Phase unpolar ist. Die Elution erfolgte nach der isokratischen Methode, wobei die Zusammensetzung der mobilen Phase (85 % Reinstwasser, 15 % Acetonitril und 0,01 mol HFBA; pH-Wert 1,9) konstant bleibt.

Zunächst wurden externe Standards aufgetragen, welche nach Retentionszeiten von sieben Minuten (Pyridinolin) und neun Minuten (Desoxypyridinolin) eluierten. Die chromatographischen Parameter sind in nachfolgender Tabelle angegeben. Im

Anschluss daran wurden die eingedampften Proben mit 100 µl einer 1%igen Hepta-Fluor-Buttersäure (HFBA)-Lösung aufgenommen und hiervon 90 µl in das HPLC-System injiziert. Unter analogen Bedingungen eluierten Pyridinolin und Desoxypyridinolin in der Probe zu vergleichbaren Retentionszeiten wie die externen Standards und konnten anhand derer ausgewertet werden. Während des gesamten Messvorgangs betrug die Temperatur der Proben 8 °C.

Tabelle 12:
Chromatographische Parameter

Trennsäule:	Spherisorb ODS-2 5µ 150mm x 4mm, Fa. Latek
Temperatur der Trennsäule:	Raumtemperatur
Flussrate der mobilen Phase:	1,0 ml/Min.
Dosiervolumen:	80 µl
Detektion:	Fluoreszenzdetektor
Wellenlänge:	Extension: 295 nm, Emission: 400 nm

3.5.2.2.2 Calcium im Urin

Die quantitative Bestimmung des Urincalciums erfolgte mit Hilfe eines Flammenphotometers (Elex 6361, Eppendorf, Hamburg). Die Urinproben wurden zunächst zentrifugiert (Vakuumzentrifuge, speed vac concentrator, Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen). Nach Verdünnung im Verhältnis 1:20 mit einer 1%igen Lithiumchloridlösung (Lithium-Stammlösung, 500mmol/l, Eppendorf, Hamburg) durch einen Dual Diluter wurden entsprechende Aliquote mit Acetylen verbrannt. Hierbei ist die Intensität der entstehenden Flamme der Calciumkonzentration in der Probe direkt proportional.

Die Proben, bei denen der Standardbereich überschritten wurde (Calciumgehalte von über 3,0 mmol/l), wurden nach nochmaliger Zugabe von Lithiumchloridlösung erneut gemessen. Die Bestimmung erfolgte im Doppelansatz.

3.5.2.3 Bestimmung weiterer Parameter

3.5.2.3.1 Calcium im Serum

Die Messung von Calcium im Serum erfolgte analog der Bestimmung des Urin-Calciums am Flammenphotometer.

3.5.2.3.2 Creatinin im Urin

Die Bestimmung der Creatininkonzentration im Urin basierte auf einer modifizierten Methode nach Jaffé (1886): Alkalische Pikrinsäure bildet mit Creatinin einen gelben Farbkomplex, welcher photometrisch gemessen werden kann. Die Intensität des Farbkomplexes ist zu der Creatininkonzentration in der Probe direkt proportional.

Zur Analyse wurden ein quantitatives, colorimetrisches Assay der Firma Metra Biosystems verwendet.

Die ersten zwölf Kavitäten einer Mikrotiterplatte wurden mit je zweimal 10 µl destilliertem Wasser, Standardlösungen 1 bis 3, Low-Control- bzw. High-Control-Lösung beschickt, die restlichen Kavitäten - ebenfalls im Doppelansatz - mit je 10 µl der Proben. Dazu wurden jeweils 190 µl destilliertes Wasser pipettiert. Die Kavitäten einer weiteren Platte wurden mit je 50 µl destilliertem Wasser sowie 50 µl aus den Kavitäten der ersten Platte beschickt. In eine dritte Mikrotiterplatte wurden jeweils 50 µl aus der zweiten Platte sowie 150 µl des Farbreagens pipettiert. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten erfolgte die photometrische Messung der Extinktionen bei 490 nm. Die Absorptionen der Standards wurden im XY-Diagramm gegen die Konzentrationen aufgetragen. Mit Hilfe der daraus erstellten Standardkurve konnten die Creatininkonzentrationen ermittelt werden.

Tabelle 13:
Reagenzien, Material und Apparate zum Nachweis von Creatinin im Urin

Creatinin-Assay	Metra Biosystems, Inc., Mountain View, USA
Creatinin-Standards A, B, C	
Creatinin Color Reagenz	
Creatinin Low Control	
Creatinin High Control	
Stopplösung	
12-Kanal-Multipipette	Eppendorf
Mikrotiterplatten PS	Greiner Bio-One GmbH
Plattenphotometer	ELISA Reader EAR 400, SLT- Labinstruments, Crailsheim

3.6 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SAS (Statistical Analysis System) für Windows, Version 6.8.2.

Die Werte sind angegeben als arithmetische Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (Stabw) als Maß für die Streuung der Einzelwerte. Die Untersuchung hinsichtlich der Unterschiede zwischen den Gruppen sowie innerhalb der Gruppen erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests. Signifikant unterschiedliche Mittelwerte wurden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von $p < 0,05$ mit *, von $p < 0,01$ mit ** und hoch signifikant unterschiedliche Mittelwerte von $p < 0,001$ mit *** bezeichnet.

Zusammenhänge zwischen den einzelnen Knochenmarkern innerhalb beider Gruppen wurden mit dem Pearson'schen Korrelationskoeffizienten R dargestellt. Signifikanzniveaus von $p < 0,05$ sind mit *, von $p < 0,01$ mit ** und von $p < 0,001$ mit *** gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Versuchstiere

Der Verlauf biochemischer Marker des Knochenstoffwechsels nach Tibiaosteotomie wurde bei einer Gruppe von Schafen, bei denen osteoporotische Veränderungen am Knochen induziert wurden, sowie bei einer unbehandelten Gruppe von Tieren untersucht.

In die Studie gingen insgesamt dreizehn weibliche Tiere ein. Die OVX-Gruppe beinhaltete sechs Tiere, die zu Versuchsbeginn durchschnittlich sechs Jahre alt waren und 61 Kilogramm wogen. Das siebte Tier musste aufgrund einer generalisierten Infektion aus dem Versuch genommen werden. Die Kontrollgruppe bestand aus sieben unbehandelten Tieren, die im Mittel drei Jahre alt waren und 62 Kilogramm wogen. Hinsichtlich des Alters der Tiere bestand ein statistisch hoch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Die Tiere der OVX-Gruppe waren im Mittel fast dreieinhalb Jahre älter als die Tiere der Kontrollgruppe. Hinsichtlich des Körpergewichtes unterschieden sich die Tiere der beiden Gruppen statistisch nicht signifikant.

Tabelle 14:
Anzahl der Tiere der Versuchs- und der Kontrollgruppe sowie Alter und Körpergewicht zu Versuchsbeginn

	Kontrollgruppe	OVX-Gruppe	
Anzahl (n)	7	6	
Alter in Jahren ($\bar{x} \pm s_x$) zu Versuchsbeginn	2,97 \pm 1,09	6,33 \pm 0,90	***
Gewicht in Kilogramm ($\bar{x} \pm s_x$) zu Versuchsbeginn	62,07 \pm 4,34	61,00 \pm 2,35	n.s.

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

*(p < 0,05) ***(p < 0,001) ***(p < 0,001)

Bei den Tieren der OVX-Gruppe wurden durch Ovariectomie, calcium- und Vitamin D-reduzierte Fütterung sowie Steroidmedikation osteoporotische Veränderungen induziert. Als Folge der Behandlung mit Glucocorticoiden wurden bei diesen Tieren Muskelatrophie und Stammfettsucht sowie Alopezie im Sinne eines Cushing-Syndroms beobachtet.

Bei allen Tieren wurde eine Osteotomie des rechten Tibiaschaftes durchgeführt. Blutproben wurden präoperativ sowie ein, zwei, vier, zehn, 14, 20 und 40 Tage nach der Osteotomie entnommen. Im Serum erfolgte die Bestimmung der Aktivitäten der alkalischen Phosphatase und der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase als Marker der Knochenformation sowie die Bestimmung von Calcium. Urin wurde zu Beginn der Studie, einen Tag vor sowie ein, zwei, vier, zehn, 14, 20 und 40 Tage nach der Operation gesammelt. Als Parameter der Knochenresorption wurden die Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin sowie Calcium bestimmt. Außerdem erfolgte die Bestimmung von Creatinin als Bezugsgröße für die Urinparameter.

Da nur in der postoperativen Phase die Zeitpunkte der Urin- und Blutprobengewinnung identisch waren, in der präoperativen Phase aber Urin- und Blutprobengewinnung in verschiedener zeitlicher Relation zum Tag der Tibiaosteotomie standen, sind die Korrelationen der biochemischen Knochenmarker in der präoperativen Phase für die Parameter im Urin und die Parameter im Serum separat aufgeführt. Die z.T. unterschiedliche zeitliche Relation zur Osteotomie bedingt, dass im Folgenden die Urinwerte dieser Phase mit den Termini „Beginn der Studie“ und „1 d ante operationem“ und die Serumwerte dieser Phase mit „präoperativ“ gekennzeichnet sind.

4.2 Konzentrationen und Verlauf der biochemischen Knochenmarker bei den Tieren der Versuchsgruppe und den Tieren der Kontrollgruppe sowie Vergleich zwischen den Gruppen

In den nachfolgenden Tabellen sind die Konzentrationen der biochemischen Knochenmarker (Mittelwert \pm Standardabweichung) zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten in beiden Gruppen dargestellt. Außerdem sind signifikante

Unterschiede hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs im Vergleich zum Ausgangswert für beide Gruppen sowie signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt angegeben.

4.2.1 Parameter der Knochenformation

4.2.1.1 Alkalische Phosphatase

Tabelle 15:

Durchschnittliche Konzentrationen ($\bar{x} \pm s_x$) der alkalischen Phosphatase (AP) (U/l) im Serum bei den ovariectomierten Tieren und den Tieren der Kontrollgruppe präoperativ sowie 1, 2, 4, 10, 14, 20 und 40 Tage nach der Tibiaosteotomie

	Kontrollgruppe	Verlauf innerhalb der Gruppe	OVX-Gruppe	Verlauf innerhalb der Gruppe	Vergleich zwischen den Gruppen
präoperativ	357,46 ± 183,39		233,35 ± 146,78		n.s.
1 d post operationem	127,99 ± 53,08	n.s.	235,55 ± 154,39	n.s.	n.s. (p<0,0795)
2 d post operationem	211,58 ± 115,36	n.s.	188,99 ± 66,99	n.s.	n.s.
4 d post operationem	241,57 ± 151,65	n.s.	194,50 ± 91,27	n.s.	n.s.
10 d post operationem	289,28 ± 130,44	n.s.	298,53 ± 143,07	n.s.	n.s.
14 d post operationem	317,14 ± 188,92	n.s.	282,39 ± 109,48	n.s.	n.s.
20 d post operationem	331,31 ± 154,79	n.s.	294,79 ± 144,49	n.s.	n.s.
40 d post operationem	303,92 ± 119,64	n.s.	322,61 ± 117,85	n.s.	n.s.

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt:

*(p < 0,05) ***(p < 0,001)

Signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe im Vergleich zu Zeitpunkt 0:

(p < 0,05) ## (p < 0,01) ### (p < 0,001)

Die Auswertung der Konzentrationen der alkalischen Phosphatase ließ zu keinem Messzeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen erkennen.

Bei den Tieren der Versuchsgruppe wurde ein um 35 % niedrigerer Ausgangswert gemessen als bei den Tieren der Kontrollgruppe, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Auch die Konzentrationsänderungen im Vergleich zum Ausgangswert waren weder in der Versuchs- noch in der Kontrollgruppe statistisch signifikant. Bei beiden Gruppen fielen die Konzentrationen post operationem ab und erreichten bei den Tieren der Versuchsgruppe bereits an Tag 1 post operationem ein Minimum von 138 U/l und bei den Tieren der Kontrollgruppe an Tag 2 post operationem ein Minimum von 189 U/l. Bis zum 10. Tag post operationem stiegen die Konzentrationen bei beiden Gruppen an und über- oder unterschritten dann bis zum Ende des Messzeitraums Werte um 300 U/l nicht wesentlich .

4.2.1.2 Knochenspezifische alkalische Phosphatase

Tabelle 16:

Durchschnittliche Konzentrationen ($\bar{x} \pm s_x$) der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase (bAP) (U/l) im Serum bei den ovariectomierten Tieren und den Tieren der Kontrollgruppe präoperativ sowie 1, 2, 4, 10, 14, 20 und 40 Tage nach der Tibiaosteotomie

	Kontrollgruppe	Verlauf innerhalb der Gruppe	OVX-Gruppe	Verlauf innerhalb der Gruppe	Vergleich zwischen den Gruppen
präoperativ	81,41 ± 19,20		141,35 ± 40,34		*
1 d post operationem	81,23 ± 25,38	n.s.	145,74 ± 43,11	n.s.	* (p=0,0158)
2 d post operationem	82,65 ± 22,17	n.s.	133,34 ± 54,61	n.s.	*
4 d post operationem	82,18 ± 26,01	n.s.	122,05 ± 61,40	n.s.	n.s. (p=0,1240)
10 d post operationem	98,35 ± 27,60	n.s.	146,13 ± 61,86	n.s.	n.s. (p= 0,0653)
14 d post operationem	111,46 ± 27,62	n.s.	159,24 ± 59,82	n.s.	*
20 d post operationem	125,16 ± 31,26	n.s.	174,94 ± 63,42	n.s.	n.s. (p=0,0629)
40 d post operationem	108,39 ± 28,48	n.s.	167,51 ± 42,11	n.s.	*

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt:

*(p < 0,05) ***(p < 0,01) ****(p < 0,001)

Signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe im Vergleich zu Zeitpunkt 0:

(p < 0,05) ## (p < 0,01) ### (p < 0,001)

Zu allen Untersuchungszeitpunkten wurden bei den Tieren der Versuchsgruppe höhere Konzentrationen der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase gemessen als bei den Tieren der Kontrollgruppe. Diese Unterschiede waren vor der Tibiaosteotomie sowie am ersten, zweiten, 14. und 40. Tag nach der Operation statistisch signifikant.

Die Ausgangskonzentration der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase war in der Versuchsgruppe mit 141 U/l um 74 % statistisch signifikant höher als in der

Kontrollgruppe mit einer Anfangskonzentration von 81 U/l. Bis zum vierten Tag nach der Operation änderte sich die Konzentration bei den Tieren der Kontrollgruppe kaum. Eine geringe, statistisch nicht signifikante Abnahme war in der Versuchsgruppe zu erkennen. Bei den Tieren beider Gruppen war jedoch ein kontinuierlicher Anstieg der Enzymaktivität vom 4. bis zum 20. Tag post operationem zu beobachten. Die Konzentrationserhöhungen sind im Vergleich zum ersten Messzeitpunkt statistisch nicht signifikant. In der Versuchsgruppe stieg die Aktivität der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase bis zum 20. Tag um insgesamt 23,76 % an, um dann geringgradig und nicht signifikant abzufallen. Bei den Tieren der Kontrollgruppe stieg die Konzentration bis zum 20. Tag nach der Osteotomie insgesamt um 54 % an und nahm bis zum 40. Tag post operationem ebenfalls statistisch nicht signifikant ab.

4.2.2 Parameter der Knochenresorption

4.2.2.1 Collagen-Crosslinks

Die Konzentrationen der Resorptionsmarker Pyridinolin und Desoxypyridinolin unterlagen deutlichen Änderungen. Sowohl Pyridinolin als auch Desoxypyridinolin zeigten in beiden Gruppen nicht nur im jeweiligen Verlauf statistisch signifikante Veränderungen, sondern unterschieden sich auch im Vergleich zwischen den Gruppen während der gesamten Versuchsdauer statistisch signifikant.

4.2.2.1.1 Pyridinolin

Tabelle 17:

Durchschnittliche Konzentrationen ($\bar{x} \pm s_x$) an Pyridinolin (PYD) im Urin (nmol/l) bezogen auf Creatinin im Urin (mmol/l) bei den ovariectomierten Tieren und den Tieren der Kontrollgruppe zu Beginn der Studie, 1 Tag vor und 1, 2, 4, 10, 14, 20 und 40 Tage nach Tibiaosteotomie

	Kontrollgruppe	Verlauf innerhalb der Gruppe	OVX-Gruppe	Verlauf innerhalb der Gruppe	Vergleich zwischen den Gruppen
Beginn der Studie	44,89 ± 8,81		89,94 ± 10,72		* *
1 d ante operationem	43,81 ± 2,30	n.s.	87,18 ± 8,26	n.s.	* (p=0,0183)
1 d post operationem	84,99 ± 8,51	#	195,89 ± 38,30	#	* *
2 d post operationem	83,82 ± 7,59	#	179,82 ± 28,65	#	* *
4 d post operationem	92,95 ± 10,84	#	179,02 ± 21,97	#	* (p=0,0122)
10 d post operationem	81,11 ± 12,74	#	166,98 ± 38,75	#	* (p=0,0167)
14 d post operationem	72,90 ± 7,51	#	142,67 ± 38,93	n.s.	* *
20 d post operationem	61,73 ± 8,06	#	130,45 ± 27,25	n.s.	* *
40 d post operationem	56,34 ± 8,84	n.s.	114,96 ± 18,22	n.s.	* *

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt:

*(p < 0,05) *(p < 0,01) ***(p < 0,001)

Signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe im Vergleich zu Zeitpunkt 0:

(p < 0,05) ## (p < 0,01) ### (p < 0,001)

Während des gesamten Beobachtungszeitraumes lagen bei den Tieren der Versuchsgruppe statistisch signifikant höhere Pyridinolinkonzentrationen vor als bei den Tieren der Kontrollgruppe. Bereits zum Zeitpunkt der ersten Messung vor Durchführung der Osteotomie fiel eine um 100 % höhere Konzentration auf. Durchschnittlich wurden in der Versuchsgruppe um 116 % höhere Pyridinolinwerte gemessen als in der Kontrollgruppe. Vor der Operation änderte sich die

Konzentration von Pyridinolin in beiden Gruppen statistisch nicht signifikant. Einen Tag nach der Tibiaosteotomie war in der Gruppe der Versuchstiere ein statistisch signifikanter Anstieg um 118 % und in der Gruppe der Kontrolltiere ein statistisch signifikanter Anstieg um 89 % im Vergleich zum Ausgangswert zu beobachten. Während bei den Tieren der Versuchsgruppe bereits zu diesem Zeitpunkt der höchste Wert von 196 nmol Pyridinolin/mmol Creatinin erreicht war, erzielte die Konzentration bei den Tieren der Versuchsgruppe erst am vierten Tag nach der Osteotomie den gegenüber dem Ausgangswert um 107 % angestiegenen maximalen Wert von 92 nmol Pyridinolin/mmol Creatinin. In beiden Gruppen war nach Erreichen des Maximums bis zum Ende des Versuchs eine kontinuierliche Abnahme zu beobachten.

4.2.2.1.2 Desoxypyridinolin

Tabelle 18:

Durchschnittliche Konzentrationen ($\bar{x} \pm s_x$) an Desoxypyridinolin (DPD) im Urin (nmol/l) bezogen auf Creatinin im Urin (mmol/l) bei den ovariectomierten Tieren und den Tieren der Kontrollgruppe zu Beginn der Studie sowie 1 Tag vor und 1, 2, 4, 10, 14, 20 und 40 Tage nach Tibiaosteotomie

	Kontrollgruppe	Verlauf innerhalb der Gruppe	OVX-Gruppe	Verlauf innerhalb der Gruppe	Vergleich zwischen den Gruppen
Beginn der Studie	4,05 ± 1,12		8,12 ± 1,68		* *
1 d ante operationem	4,29 ± 0,17	n.s.	8,17 ± 0,64	n.s.	* (p=0,0183)
1 d post operationem	8,14 ± 0,72	#	18,10 ± 1,34	#	* *
2 d post operationem	7,99 ± 0,77	#	17,98 ± 4,73	#	* *
4 d post operationem	9,12 ± 1,20	#	17,21 ± 2,11	#	* (p=0,0122)
10 d post operationem	7,67 ± 1,16	#	15,68 ± 3,58	#	* (p=0,0167)
14 d post operationem	6,82 ± 0,85	#	12,58 ± 2,92	#	* *
20 d post operationem	5,85 ± 1,37	#	11,93 ± 2,39	n.s.	* *
40 d post operationem	5,31 ± 0,72	n.s.	11,34 ± 2,58	n.s.	* *

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt:

* (p < 0,05) ** (p < 0,01) *** (p < 0,001)

Signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe im Vergleich zu Zeitpunkt 0:

(p < 0,05) ## (p < 0,01) ### (p < 0,001)

Wie bei Pyridinolin, wurden auch bei Desoxypyridinolin zu allen Untersuchungszeitpunkten in der Versuchsgruppe höhere Konzentrationen gemessen als in der Kontrollgruppe. Die Unterschiede waren jeweils statistisch signifikant. Auch bei diesem Resorptionsmarker war am Tag nach der Operation in beiden Gruppen ein statistisch signifikanter Anstieg zu erkennen: Bei den Tieren der Versuchsgruppe stieg die Konzentration um 122 % und bei den Tieren der

Versuchsgruppe um 101 % gegenüber dem Ausgangswert an. Ähnlich dem Verlauf von Pyridinolin wurde auch bei Desoxypyridinolin in der Versuchsgruppe der maximale Wert von 18 nmol DPD/mmol Crea bereits am ersten Tag nach der Tibiaosteotomie erreicht, wohingegen in der Kontrollgruppe die Konzentration langsamer anstieg und erst am vierten Tag nach der Operation mit 9 nmol DPD/mmol Crea ihr Maximum erreichte. In beiden Gruppen ist wie bei Pyridinolin nach Erreichen des Peaks eine kontinuierliche Abnahme der Konzentrationen bis zum Ende des Versuchszeitraumes zu beobachten. Diese Veränderungen waren in der Versuchsgruppe bis zum 14. Tag und in der Kontrollgruppe bis zum 20. Tag nach der Osteotomie statistisch signifikant.

4.2.2.2 Calcium im Urin

Tabelle 19:

Durchschnittliche Konzentrationen ($\bar{x} \pm s_x$) an Calcium (mmol/l) im Urin bezogen auf Creatinin (mmol/l) im Urin bei den ovariectomierten Tieren und den Tieren der Kontrollgruppe zu Beginn der Studie sowie 1 Tag vor und 1, 2, 4, 10, 14, 20 und 40 Tage nach Tibiaosteotomie

	Kontrollgruppe	Verlauf innerhalb der Gruppe	OVX-Gruppe	Verlauf innerhalb der Gruppe	Vergleich zwischen den Gruppen
Beginn der Studie	0,07 ± 0,03		0,14 ± 0,15		n.s.
1 d ante operationem	0,08 ± 0,04	n.s.	0,09 ± 0,05	n.s.	n.s.
1 d post operationem	0,09 ± 0,16	n.s.	0,06 ± 0,03	n.s.	n.s. (p=0,1987)
2 d post operationem	0,14 ± 0,16	n.s.	0,04 ± 0,01	n.s.	n.s.
4 d post operationem	0,31 ± 0,29	n.s.	0,13 ± 0,14	n.s.	n.s. (p=0,0782)
10 d post operationem	0,15 ± 0,06	n.s.	0,06 ± 0,05	n.s.	*
14 d post operationem	0,14 ± 0,10	n.s.	0,08 ± 0,04	n.s.	n.s. (p=0,1240)
20 d post operationem	0,17 ± 0,08	n.s.	0,07 ± 0,05	n.s.	*
40 d post operationem	0,14 ± 0,09	n.s.	0,06 ± 0,02	n.s.	n.s. (0,0999)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt:

*(p < 0,05) ***(p < 0,001) ***(p < 0,001)

Signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe im Vergleich zu Zeitpunkt 0:

(p < 0,05) ## (p < 0,01) ### (p < 0,001)

Die Calciumausscheidung im Urin unterschied sich zwischen den beiden Gruppen deutlich. Während die Tiere der OVX-Gruppe am ersten Tag der Messung und am Tag vor der Tibiaosteotomie eine höhere Calciumausscheidung aufwiesen als die Tiere der Kontrollgruppe, kehrte sich dieses Verhältnis nach der Operation um: Zu den weiteren Messzeitpunkten schieden die Tiere der Kontrollgruppe mehr Calcium aus, wobei diese Unterschiede nur am Tag 10 und 20 post operationem statistisch

signifikant waren, zu allen übrigen postoperativen Messzeitpunkten ausgenommen Tag zwei aber ebenfalls deutlich zu erkennen waren.

Im Verlauf zeigten sich in beiden Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Bei den Tieren der Versuchsgruppe war bis zum zweiten Tag post operationem ein kontinuierlicher Rückgang der Calciumausscheidung zu beobachten, wohingegen in der Kontrollgruppe die Ausscheidung bis zum ersten Tag nach der Operation geringgradig zunahm. Am vierten Tag nach der Tibiaosteotomie war in beiden Gruppen ein deutlicher Anstieg der Calciumausscheidung zu verzeichnen, der jedoch aufgrund der geringen Tierzahl und großen Streuung nicht signifikant war. Am zehnten Tag post operationem wies die Calciumkonzentration im Urin wieder niedrigere Werte auf und änderte sich bis zum Versuchsende in beiden Gruppen nicht mehr deutlich.

4.3 Konzentrationen und Verlauf des Stoffwechselfparameters Calcium im Serum bei den Tieren der Versuchsgruppe und den Tieren der Kontrollgruppe sowie Vergleich zwischen den Gruppen

Tabelle 20:

Durchschnittliche Konzentrationen ($\bar{x} \pm s_x$) an Calcium (mmol/l) im Serum bei den ovariectomierten Tieren und den Tieren der Kontrollgruppe präoperativ sowie 1, 2, 4, 10, 14, 20 und 40 Tage nach Tibiaosteotomie

	Kontrollgruppe	Verlauf innerhalb der Gruppe	OVX-Gruppe	Verlauf innerhalb der Gruppe	Vergleich zwischen den Gruppen
präoperativ	2,49 ± 0,13		2,18 ± 0,20		n.s. (p=0,0517)
1 d post operationem	2,42 ± 0,06	n.s.	1,93 ± 0,31	n.s.	* (p=0,0122)
2 d post operationem	2,46 ± 0,11	n.s.	1,94 ± 0,16	n.s.	* *
4 d post operationem	2,58 ± 0,09	n.s.	2,10 ± 0,17	n.s.	* *
10 d post operationem	2,57 ± 0,13	n.s.	2,17 ± 0,13	n.s.	* *
14 d post operationem	2,62 ± 0,14	n.s.	2,10 ± 0,17	n.s.	* *
20 d post operationem	2,61 ± 0,06	n.s.	2,01 ± 0,15	n.s.	* *
40 d post operationem	2,58 ± 0,07	n.s.	1,90 ± 0,19	n.s.	* *

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt:

*(p < 0,05) * *(p < 0,01) * * *(p < 0,001)

Signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe im Vergleich zu Zeitpunkt 0:

(p < 0,05) # # (p < 0,01) # # # (p < 0,001)

Die Calciumwerte im Serum lagen bei den Tieren der OVX-Gruppe im Mittel 25 % unter den Werten der Kontrollgruppe. Die Unterschiede waren zu allen Messzeitpunkten nach der Tibiaosteotomie statistisch signifikant.

Die Calciumhomöostase widerspiegelnd, waren hinsichtlich des Verlaufs in beiden Gruppen weder deutliche noch statistisch signifikante Veränderungen zu beobachten.

4.4 Korrelationen zwischen den biochemischen Knochenmarkern

Die Zusammenhänge zwischen den biochemischen Knochenmarkern wurde mit Hilfe des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten ermittelt. Korrelationen und Signifikanzen sind im Folgenden für beide Gruppen zu jedem Untersuchungszeitpunkt tabellarisch aufgezeigt. Aufgrund der verschiedenen Entnahmezeitpunkte sind Urin- und Blutparameter in der präoperativen Phase separat dargestellt. Demzufolge können mögliche Korrelationen zwischen Formations- und Resorptionsmarker erst ab dem ersten Tag nach der Operation angegeben werden.

4.4.1 Korrelationen zwischen den Knochenmarkern bei den Tieren der OVX-Gruppe

Tabelle 21:

Korrelationen der biochemischen Knochenmarker im Urin bei den ovariectomierten Tieren zu Beginn der Studie

	Ca/Crea	PYD/Crea	DPD/Crea
DPD/Crea	0.04473 n.s.	0.94340 * *	1
PYD/Crea	0.23843 n.s.	1	
Ca/Crea	1		

* ($p < 0,05$) ** ($p < 0,01$) *** ($p < 0,001$)

Tabelle 22:

Korrelationen der biochemischen Knochenmarker im Urin bei den ovariectomierten Tieren 1 d ante operationem

	Ca/Crea	PYD/Crea	DPD/Crea
DPD/Crea	0.77653 (p = 0.0693)	0.46367 n.s.	1
PYD/Crea	0.65085 (p=0,1616)	1	
Ca/Crea	1		

* (p < 0,05) ** (p < 0,01) *** (p < 0,001)

Zusammenhänge zwischen den Knochenmarkern waren in der Versuchsgruppe bereits vor Durchführung der Tibiaosteotomie zu erkennen: Bei den Urinparametern zeigte sich zum ersten Messzeitpunkt ein sehr enger und statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin. Einen Tag vor der Operation korrelierten beide Collagen-Crosslinks mit der Calciumkonzentration im Urin, dieser Zusammenhang war jedoch statistisch nicht signifikant.

Tabelle 23:

Korrelationen der biochemischen Knochenmarker im Serum bei den ovariectomierten Tieren zum Zeitpunkt „präoperativ“

	AP	bAP
bAP	0.81113 n.s. (p= 0.0501)	1
AP	1	

* (p < 0,05) ** (p < 0,01) *** (p < 0,001)

Bei den im Serum bestimmten Parametern bestand präoperativ ein enger, aber statistisch nicht signifikanter ($p = 0,0501$) Zusammenhang zwischen der gesamtalkalischen und der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase.

Tabelle 24:

Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den ovariectomierten Tieren 1 d post operationem

	AP	bAP	Ca/Crea	PYD/Crea	DPD/Crea
DPD/Crea	-0.09119 n.s.	0.23318 n.s.	-0.12779 n.s.	0.80236 n.s. ($p = 0.0547$)	1
PYD/Crea	0.13379 n.s.	0.58526 n.s.	0.03201 n.s.	1	
Ca/Crea	-0.38854 n.s.	-0.05749 n.s.	1		
bAP	0.13221 n.s.	1			
AP	1				

*($p < 0,05$) **($p < 0,01$) ***($p < 0,001$)

In der postoperativen Phase zeigte sich zu allen Messzeitpunkten ein enger bis sehr enger Zusammenhang zwischen den beiden Resorptionsmarkern Pyridinolin und Desoxypyridinolin, der ab dem vierten Tag nach der Osteotomie statistisch signifikant und am 14. Tag statistisch hoch signifikant war.

Tabelle 25:

Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den ovariectomierten Tieren 2 d post operationem

	AP	bAP	Ca/Crea	PYD/Crea	DPD/Crea
DPD/Crea	0.00532 n.s.	0.16992 n.s.	0.66986 n.s. (p = 0.1455)	0.72168 n.s. (p = 0.1054)	1
PYD/Crea	-0.12125 n.s.	-0.26416 n.s.	0.85554 *	1	
Ca/Crea	0.28330 n.s.	0.10186 n.s.	1		
bAP	0.81190 *	1			
AP	1				

*(p < 0,05) ***(p < 0,01) ****(p < 0,001)

Am zweiten Tag post operationem bestand nicht nur ein enger Zusammenhang zwischen Pyridinolin und Desoxypyridinolin, sondern auch zwischen der Calciumkonzentration im Urin und den beiden Collagen-Crosslinks, wobei die Korrelation zu Pyridinolin statistisch signifikant war.

Ein Zusammenhang konnte auch zwischen der gesamtalkalischen und der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase am zweiten, vierten und 20. Tag nachgewiesen werden, der aber nur am zweiten Tag nach der Operation statistisch signifikant war.

Tabelle 26:

Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den ovariectomierten Tieren 4 d post operationem

	AP	bAP	Ca/Crea	PYD/Crea	DPD/Crea
DPD/Crea	0.34145 n.s.	0.41868 n.s.	-0.42736 n.s.	0.84421 *	1
PYD/Crea	-0.09149 n.s.	0.08173 n.s.	-0.46357 n.s.	1	
Ca/Crea	0.38978 n.s.	0.08632 n.s.	1		
bAP	0.79013 n.s. (p = 0.0614)	1			
AP	1				

*(p < 0,05) ***(p < 0,01) ****(p < 0,001)

Tabelle 27:

Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den ovariectomierten Tieren 10 d post operationem

	AP	bAP	Ca/Crea	PYD/Crea	DPD/Crea
DPD/Crea	-0.87433 n.s. (p = 0.1257)	-0.81402 n.s. (p=0,1860)	0.40375 n.s.	0.93085 *	1
PYD/Crea	-0.98163 *	-0.58322 n.s.	0.32564 n.s.	1	
Ca/Crea	-0.10664 n.s.	-0.16797 n.s.	1		
bAP	0.49575 n.s.	1			
AP	1				

*(p < 0,05) ***(p < 0,01) ****(p < 0,001)

Zehn Tage nach der Osteotomie zeigte sich ein enger negativer Zusammenhang zwischen beiden Collagen-Crosslinks und der alkalischen Phosphatase, der bei Pyridinolin statistisch signifikant war. Auch im weiteren Verlauf korrelierten Pyridinolin und Desoxypyridinolin negativ mit der gesamtalkalischen Phosphatase: Zwischen Pyridinolin und der alkalischen Phosphatase war bis zum 20. Tag post operationem ein sehr enger und statistisch signifikanter Zusammenhang zu beobachten. Desoxypyridinolin korrelierte mit der alkalischen Phosphatase bis zum Ende des Versuchszeitraumes, wobei der Zusammenhang nur am 14. Tag statistisch signifikant war.

Auch zwischen der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase und beiden Collagen-Crosslinks ließen sich Zusammenhänge erkennen: Am zehnten, 14. und 40. Tag korrelierte die knochenspezifische alkalische Phosphatase negativ mit Desoxypyridinolin. Negative Korrelationen zeigten sich auch mit Pyridinolin am 14., 20. und 40. Tag. Die Zusammenhänge waren jedoch statistisch nicht signifikant.

Tabelle 28:
Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den ovariectomierten Tieren 14 d post operationem

	AP	bAP	Ca/Crea	PYD/Crea	DPD/Crea
DPD/Crea	-0.90883 * (p = 0.0121)	-0.67906 n.s. (p = 0.1380)	-0.28368 n.s.	0.97841 * * *	1
PYD/Crea	-0.86689 *	-0.69724 n.s. (p = 0.1236)	-0.21587 n.s.	1	
Ca/Crea	0.45574 n.s.	0.35319 n.s.	1		
bAP	0.57238 n.s.	1			
AP	1				

*(p < 0,05) ** (p < 0,01) *** (p < 0,001)

Tabelle 29:
Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den ovariectomierten Tieren 20 d post operationem

	AP	bAP	Ca/Crea	PYD/Crea	DPD/Crea
DPD/Crea	-0.70632 n.s. (p = 0.1167)	-0.42618 n.s.	0.65112 n.s. (p=0,1613)	0.89053 * (p = 0.0173)	1
PYD/Crea	-0.82233 *	-0.70697 n.s. (p = 0.1162)	0.61143 n.s. (p=0,1971)	1	
Ca/Crea	-0.15379 n.s.	-0.48358 n.s.	1		
bAP	0.64097 n.s (p=0,1702)	1			
AP	1				

*(p < 0,05) ***(p < 0,01) ****(p < 0,001)

In der postoperativen Phase zeigte sich außerdem an Tag zwei und 20 ein Zusammenhang zwischen beiden Collagen-Crosslinks und der Calciumausscheidung, der nur am zweiten Tag post operationem sehr eng und statistisch signifikant war.

Tabelle 30:
Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den ovariectomierten Tieren 40 d post operationem

	AP	bAP	Ca/Crea	PYD/Crea	DPD/Crea
DPD/Crea	-0.69676 n.s. (p = 0.1240)	-0.61055 n.s. (p=0,1980)	0.15950 n.s.	0.95457 * *	1
PYD/Crea	-0.53997 n.s.	-0.63389 n.s. (p=0,1765)	0.13212 n.s.	1	
Ca/Crea	-0.30442 n.s.	0.37591 n.s.	1		
bAP	0.28269 n.s.	1			
AP	1				

*(p < 0,05) ***(p < 0,01) ****(p < 0,001)

4.4.2 Korrelationen zwischen den Knochenmarkern bei den Tieren der Kontrollgruppe

Tabelle 31:
Korrelationen der biochemischen Knochenmarker im Urin bei den Tieren der Kontrollgruppe zu Beginn der Studie

	Ca/Crea	PYD/Crea	DPD/Crea
DPD/Crea	-0.39470 n.s.	0.95533 * * *	1
PYD/Crea	-0.32079 n.s.	1	
Ca/Crea	1		

*(p < 0,05) ***(p < 0,001) * *(p < 0,01) * * *(p < 0,001)

Tabelle 32:
Korrelationen der biochemischen Knochenmarker im Urin bei den Tieren der Kontrollgruppe 1 d ante operationem

	Ca/Crea	PYD/Crea	DPD/Crea
DPD/Crea	0.15939 n.s.	0.75481 n.s.	1
PYD/Crea	0.75882 n.s.	1	
Ca/Crea	1		

*(p < 0,05) ***(p < 0,001) * *(p < 0,01) * * *(p < 0,001)

Bei den Tieren der Versuchgruppe waren - die Urinparameter betreffend - in der präoperativen Phase ähnliche Zusammenhänge zu beobachten wie in der Kontrollgruppe. Zum ersten Messzeitpunkt war auch hier ein sehr enger

Zusammenhang zwischen den beiden Crosslinks zu erkennen, der sich als statistisch hoch signifikant erwies. Einen Tag vor der Tibiaosteotomie zeigte sich ein statistisch nicht signifikanter Zusammenhang zwischen Pyridinolin und Desoxypyridinolin. Wie auch in der Versuchsgruppe war zu diesem Zeitpunkt ein Zusammenhang zwischen Pyridinolin und Urincalcium zu erkennen, der jedoch ebenfalls statistisch nicht signifikant war.

Tabelle 33:
Korrelationen der biochemischen Knochenmarker im Serum bei den Tieren der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt „präoperativ“

	AP	bAP
bAP	-0.06805 n.s.	1
AP	1	

*($p < 0,05$) **($p < 0,01$) ***($p < 0,001$)

Tabelle 34:
Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den Tieren der Kontrollgruppe 1 d post operationem.

	AP	bAP	Ca/Crea	PYD/Crea	DPD/Crea
DPD/Crea	-0.12797 n.s.	-0.23301 n.s.	0.27334 n.s.	0.84164 *	1
PYD/Crea	-0.36739 n.s.	-0.12875 n.s.	0.14318 n.s.	1	
Ca/Crea	0.02408 n.s.	-0.23831 n.s.	1		
bAP	0.55644 n.s. (p=0,1945)	1			
AP	1				

*(p < 0,05) ***(p < 0,01) ****(p < 0,001)

Tabelle 35:
Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den Tieren der Kontrollgruppe 2 d post operationem.

	AP	bAP	Ca/Crea	PYD/Crea	DPD/Crea
DPD/Crea	0.64300 n.s. (p=0,1193)	0.98062 ***	0.02039 n.s.	0.93854 ** (p = 0.0017)	1
PYD/Crea	0.64239 n.s. (p=0,1198)	0.93319 **	-0.17645 n.s.	1	
Ca/Crea	0.11040 n.s.	-0.03697 n.s.	1		
bAP	0.72782 n.s. (p = 0.0637)	1			
AP	1				

*(p < 0,05) ***(p < 0,01) ****(p < 0,001)

Der zum Teil sehr enge Zusammenhang zwischen den Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin war, wie in der Versuchsgruppe, auch in der Kontrollgruppe zu allen Messzeitpunkten der postoperativen Phase zu beobachten und erwies sich, ausgenommen an Tag vier nach der Osteotomie, als statistisch signifikant.

Am zweiten Tag nach der Operation zeigte sich neben dem sehr engen Zusammenhang zwischen Pyridinolin und Desoxypyridinolin ein Zusammenhang beider Collagen-Crosslinks mit der alkalischen Phosphatase und ein sehr enger und statistisch signifikanter Zusammenhang von Pyridinolin und Desoxypyridinolin mit der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase. Wie auch in der Versuchsgruppe korrelierten gesamtalkalische und knochenspezifische alkalische Phosphatase zu diesem Zeitpunkt ebenfalls. Der Zusammenhang war eng aber statistisch nicht signifikant ($p = 0,0637$).

Tabelle 36:

Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den Tieren der Kontrollgruppe 4 d post operationem

	AP	bAP	Ca/Crea	PYD/Crea	DPD/Crea
DPD/Crea	-0.29654 n.s.	0.55721 n.s.	-0.29105 n.s.	0.84821 n.s. ($p = 0.0693$)	1
PYD/Crea	-0.74819 n.s. ($p = 0.1458$)	0.03961 n.s.	-0.03947 n.s.	1	
Ca/Crea	-0.49341 n.s.	-0.66429 (n.s.) ($p = 0.1501$)	1		
bAP	0.61975 n.s. ($p = 0.1377$)	1			
AP	1				

*($p < 0,05$) **($p < 0,01$) ***($p < 0,001$)

Tabelle 37:
Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den Tieren der Kontrollgruppe 10 d post operationem

	AP	bAP	Ca/Crea	PYD/Crea	DPD/Crea
DPD/Crea	0.03665 n.s.	0.06973 n.s.	0.26359 n.s.	0.98754 * * (p = 0.0017)	1
PYD/Crea	-0.06279 n.s.	-0.02325 n.s.	0.26649 n.s.	1	
Ca/Crea	-0.46064 n.s.	0.20531 n.s.	1		
bAP	0.72329 n.s. (p = 0.1043)	1			
AP	1				

*(p < 0,05) ***(p < 0,01) ****(p < 0,001)

Tabelle 38:
Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den Tieren der Kontrollgruppe 14 d post operationem

	AP	bAP	Ca/Crea	PYD/Crea	DPD/Crea
DPD/Crea	0.17612 n.s.	-0.27272 n.s.	0.45154 n.s.	0.80139 *	1
PYD/Crea	0.25232 n.s.	0.03465 n.s.	0.68977 n.s. (p = 0.0864)	1	
Ca/Crea	-0.20511 n.s.	-0.10290 n.s.	1		
bAP	0.58088 n.s. (p=0,1714)	1			
AP	1				

*(p < 0,05) ***(p < 0,01) ****(p < 0,001)

Auch am vierten Tag nach der Operation bestand ein Zusammenhang zwischen alkalischer Phosphatase und Pyridinolin, wobei dieser im Gegensatz zum vorangegangenen Messzeitpunkt negativ war. Der Zusammenhang war eng, aber statistisch nicht signifikant ($p = 0,1485$). Ebenso korrelierten die knochenspezifische alkalische Phosphatase und die alkalische Phosphatase. Wie auch am zweiten Tag post operationem war der Zusammenhang statistisch nicht signifikant ($p = 0,1377$). Am zehnten Tag nach der Tibiaosteotomie zeigte sich neben dem bereits beschriebenen engen und statistisch signifikanten ($p = 0,0017$) Zusammenhang der beiden Collagen-Crosslinks weiterhin eine statistisch nicht signifikante ($p = 0,1043$) Korrelation zwischen knochenspezifischer und gesamtalkalischer Phosphatase. Zwei Wochen nach Osteotomie war ein statistisch nicht signifikanter ($p = 0,0864$) Zusammenhang zwischen Pyridinolin und Urincalcium zu beobachten. Der sehr enge Zusammenhang zwischen Pyridinolin und Desoxypyridinolin war statistisch signifikant.

Tabelle 39:
Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den Tieren der Kontrollgruppe 20 d post operationem

	AP	bAP	Ca/Crea	PYD/Crea	DPD/Crea
DPD/Crea	-0.27448 n.s.	-0.65278 n.s. ($p = 0,1119$)	0.63802 n.s. ($p = 0,1231$)	0.81163 *	1
PYD/Crea	0.04343 n.s.	-0.33533 n.s.	0.55127 n.s. ($p=0,1996$)	1	
Ca/Crea	-0.46948 n.s.	-0.40098 n.s.	1		
bAP	0.57409 n.s. ($p=0,1777$)	1			
AP	1				

*($p < 0,05$) **($p < 0,01$) ***($p < 0,001$)

Tabelle 40:
Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den Tieren der Kontrollgruppe 40 d post operationem

	AP	bAP	Ca/Crea	PYD/Crea	DPD/Crea
DPD/Crea	0.56225 n.s.	0.25976 n.s.	0.42210 n.s.	0.87181 *	1
PYD/Crea	0.33882 n.s.	-0.02529 n.s.	0.68948 n.s. (p = 0.0866)	1	
Ca/Crea	0.08217 n.s.	-0.20094 n.s.	1		
bAP	0.43914 n.s.	1			
AP	1				

*(p < 0,05) ***(p < 0,001) ***(p < 0,001)

Am 20. Tag nach der Tibiaosteotomie wurde ein im Gegensatz zum zweiten Tag nach der Operation negativer Zusammenhang zwischen knochenspezifischer alkalischer Phosphatase und Desoxypyridinolin deutlich, der jedoch statistisch nicht signifikant war (p = 0,1119). Desoxypyridinolin korrelierte außerdem mit Urincalcium statistisch nicht signifikant (p = 0,1231). Der sehr enge Zusammenhang zwischen den Collagen-Crosslinks war wiederum statistisch signifikant, was auch zum letzten Messzeitpunkt 20 Tage später zu beobachten war. Am 40. Tag post operationem korrelierten zudem Pyridinolin und Urincalcium statistisch nicht signifikant (p = 0,1336).

5 Diskussion

5.1 Auswahl des Tiermodells

Vorliegende Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit dem AO Research Institute, Davos, Schweiz, durchgeführt. Ziel des mehrere Studien umfassenden Projektes war es, an einem ausreichend großen Tiermodell die Frakturheilung in osteoporotischem Knochen nach Tibiaosteotomie zu untersuchen.

Die osteoporotische Fraktur ist häufig erstes Anzeichen und zugleich schwerwiegende Folge der Erkrankung Osteoporose. Die Frakturinzidenz steigt exponentiell mit dem Alter (DVO-Leitlinie 2006). Aufgrund der demographischen Entwicklung wird einer Schätzung zufolge die Zahl der osteoporotischen Hüftfrakturen weltweit von 1,7 Millionen im Jahr 1992 auf 6,3 Millionen im Jahr 2050 steigen, wobei Frauen ein etwa dreifach höheres Risiko haben, eine Fraktur zu erleiden, als Männer (Cooper et al. 1992b, Cummings und Melton 2002). Infolgedessen kommt der Frakturbehandlung große Bedeutung zu, wenn auch Prävention und Therapie die primären Ziele sein müssen, der Erkrankung entgegenzutreten.

Für pathogenetische und pharmakologische Fragestellung sind einige Tiermodelle, insbesondere die ovariectomierte Ratte, sehr gut etabliert (s. Kapitel 2.7). Dennoch existiert derzeit kein standardisiertes und ausreichend großes Tiermodell, welches geeignet ist, Frakturheilung und Frakturbehandlung in osteoporotischem Knochen zu untersuchen. Von Interesse sind in diesem Zusammenhang insbesondere die Erprobung von Osteosynthesematerialien und -techniken sowie die endoprothetische Versorgung des osteoporotischen Knochens.

Die amerikanische „Food and Drug Administration“ (FDA) veröffentlichte 1994 Richtlinien, nach denen für die Erprobung von Arzneimitteln zur Prävention und Therapie der postmenopausalen Osteoporose die Verwendung zweier verschiedener Tiermodelle empfohlen wird, um Charakteristika der humanen Osteoporose effizient widerzuspiegeln. Die FDA fordert, die Studien zunächst mit der ovariectomierten Ratte und im Folgenden mit einem „non-rodent animal“, zum Beispiel einem Großtier durchzuführen. Als mögliche Großtiermodelle werden der

Primat, das Schaf, das Schwein und mit Einschränkungen der Hund genannt. In präklinischen Studien sollen Parameter der Knochenqualität bei beiden Tierarten erhoben werden. Durchzuführen sind die Messung biochemischer Knochenstoffwechselfparameter, histomorphometrische Analysen sowie mechanische Tests zur Beurteilung der Knochenfestigkeit. Die biochemischen Knochenstoffwechselfparameter betreffend, ist mindestens ein Marker der Knochenresorption und ein Marker der Knochenformation zu bestimmen. Aufgrund ihrer Spezifität und Sensitivität werden als Resorptionsmarker die Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin sowie als Formationsmarker das knochenspezifische Isoenzym der alkalischen Phosphatase empfohlen (Food and Drug Administration 1994).

Die Richtlinien beinhalten in erster Linie Empfehlungen für die Evaluierung von Medikamenten, welche für Prävention und Behandlung der postmenopausalen Osteoporose zum Einsatz kommen. Dennoch wird die Notwendigkeit der Etablierung eines Großtiermodells dargelegt, welches die mit Hilfe des Modells der OVX-Ratte gewonnenen Erkenntnisse ergänzt. In diesem Zusammenhang könnte insbesondere das Schaf zukünftig eine bedeutende Rolle spielen.

Die Verwendung von nicht humanen Primaten ist aus vielen Gründen problematisch, nicht nur weil ethische Erwägungen dem entgegenstehen. Umgang und Haltung sind von einigen Schwierigkeiten geprägt, zudem erreichen nicht humane Primaten erst mit etwa neun Jahren die maximale Knochendichte (Jayo et al. 1994). Da sie in der Regel nicht einer Zucht für Forschungszwecke entstammen und ein potentiell Reservoir für humanpathogene Krankheitserreger darstellen, ist außerdem das Zoonoserisiko zu berücksichtigen (Turner 2001).

Hunde eignen sich aus anderen Gründen wenig als Modell für die Osteoporose des Menschen. Zum einen erfährt der Hund als Begleiter des Menschen eine geringe Akzeptanz als Versuchstier und zum anderen scheint das Skelett des Hundes kaum auf Östrogenmangel anzusprechen. Die Hündin ist diöstrisch und adaptiert an längere anöstrische Perioden mit niedrigen Östradiolkonzentrationen. Auch die Tatsache, dass zahlreiche Hündinnen ovariectomiert oder ovariohysterektomiert sind, ohne dass sie infolgedessen eine erhöhte Frakturrate aufweisen, bestätigt die

Vermutung der Unempfindlichkeit gegenüber einem Östrogenmangel. Shen konstatierte 1992, dass sich der Hund aufgrund unzureichender Veränderungen von Knochendichte, histomorphometrischen und biochemischen Parametern nach Ovariectomie nicht als Modell für die postmenopausale Osteoporose zu eignen scheint (Shen et al. 1992).

Minischweine hingegen sind aus vielen Gründen für die Erforschung der Osteoporose geeignet. Sie zeigen einen kontinuierlichen Zyklus, sind Monogastrier und weisen ein dem humanen Skelett ähnliches Remodeling auf. Schweine gehören außerdem zu den wenigen Tieren, bei denen über spontane Wirbelfrakturen berichtet wurde (Spencer 1979). Insbesondere nach Ovariectomie in Kombination mit calciumreduzierter Fütterung scheinen Schweine ein gutes Modell für die postmenopausale Osteoporose darzustellen. Einschränkungen ergeben sich jedoch daraus, dass die Haltung dieser Tiere anspruchsvoll und die Anschaffung kostenintensiv ist (Turner 2001). Das Minipig ist zwar ein „large animal model“, verfügt jedoch nicht über ausreichend lange Röhrenknochen im Hinblick auf chirurgische bzw. orthopädische Fragestellungen der Humanmedizin und ist infolgedessen ebenfalls nur bedingt geeignet.

Vor einiger Zeit ist das Schaf in den Fokus wissenschaftlichen Interesses gerückt. Schafe sind Herdentiere, unkompliziert in Unterbringung und Haltung und werden als Nutztiere angesehen. Zudem verfügen ältere Schafe über Havers'sches Remodeling und zeigen ähnliche Hormonprofile wie der Mensch (Turner 2002). Zwar findet beim Schaf keine natürliche Menopause statt, auf Östrogenmangel und auch auf Östrogensatz spricht der Schafknochen jedoch in ähnlicher Weise an wie der des Menschen (Turner et al. 1995, Turner 2002). Schafe haben sich nicht nur hinsichtlich einiger pharmakologischer Fragestellungen als Modell bewiesen, sondern eignen sich ob ihrer Größe auch für die Erprobung von Techniken und Materialien, die in der Orthopädie zum Einsatz kommen. Auch stellt die Gewinnung der für die Untersuchung biochemischer Knochenmarker und weiterer Stoffwechselformen benötigten Blut- und Urinproben keinen limitierenden Faktor dar.

Aufgrund der Notwendigkeit ein Großtiermodell zu etablieren, welches auch orthopädischen Belangen Rechnung trägt, wurde diese Studie durchgeführt. In

Anlehnung an die Richtlinien der FDA wurden in einem Projekt des AO Research Institutes, Davos, Schweiz, die empfohlenen Parameter der Knochenqualität am Modell des Schafes untersucht, wobei die Bestimmung der biochemischen Knochenstoffwechselformer Inhalt dieser Arbeit ist.

In dem Projekt des AO Research Institutes, Davos, wurde das Tiermodell Schaf nicht gewählt, um eine der humanen Osteoporose vergleichbare Ätiologie und Pathogenese widerzuspiegeln, wenngleich nach Turner das Schaf zum Beispiel als Modell für die östrogenmangelbedingte und Altersosteoporose geeignet ist (Turner 2002). Das Ziel war vielmehr, einen reproduzierbaren Knochenmasseverlust in ausreichend großen Knochen zu erreichen und somit ein Modell zu etablieren, welches geeignet ist, den Heilungsverlauf osteoporotischen Knochens nach Fraktur bzw. Osteotomie unter Einbeziehung der Formations- und Resorptionsmarker zu untersuchen. In diesem Sinne ist diese Studie als Pilotstudie zu betrachten.

Für das Projekt wurde die Rasse „Weißes Alpenschaf“ gewählt, eine Schweizer Schafrasse, die durch Einkreuzung der Rassen „Merino“ und „Ile de France“ veredelt wurde und saisonal polyöstrisch ist. Die Östrogenspiegel sind während der fruchtbaren Periode, in der etwa 20 Zyklen stattfinden, relativ hoch und lediglich in der etwa 2 Monate andauernden Phase des Anöstrus niedrig (Newton et al. 2004).

Dennoch wird beim Schaf durch Ovariectomie nur ein moderater Knochenverlust induziert, der eine Osteopenie, nicht aber eine schwere Osteoporose widerspiegelt. In einer weiteren Studie des AO Research Institutes konnte mittels qCT am distalen Radius aufgezeigt werden, dass Ovariectomie in Kombination mit anderen, den Knochenmasseverlust fördernden Maßnahmen, eine größere Dichteabnahme verursacht als der alleinige Östrogenmangel. In einer Gruppe älterer ovariectomierter Schafe wurde bei zusätzlicher calcium- und Vitamin D-reduzierter Fütterung eine Knochendichteabnahme um 4 % in kortikalen und 7 % in trabekulären Knochenanteilen beobachtet. In einer zweiten Gruppe, in der die ovariectomierten Tiere mit Methylprednisolon behandelt wurden, nahm die Knochendichte um durchschnittlich 16 % (kortikaler Knochen) bzw. 31 % (trabekulärer Knochen) ab. Die größte Verminderung der Knochendichte wurde jedoch bei den Tieren beobachtet, die ovariectomiert, calcium- und Vitamin D-restriktiv gefüttert sowie mit

Glucocorticoiden behandelt worden waren. Hier war die Knochendichte um 22 % in kortikalem bzw. um 57 % in trabekulärem Knochen vermindert (Lill et al. 2002). Obwohl jede der drei Gruppen, sowie eine unbehandelte Kontrollgruppe, ohne signifikante Knochendichteminderung, nur aus jeweils zwei Tieren bestand, lieferte diese Studie eindeutige Hinweise, dass eine Kombination aus Ovariectomie, calcium- und Vitamin D-reduzierter Fütterung sowie Glucocorticoidmedikation ausreichende osteoporotische Veränderungen induziert, welche das Schaf als Modell für orthopädische Fragestellungen prädestinieren.

Für dieses Projekt wurde ebenso die Kombination aus Ovariectomie, calcium- und Vitamin D-restriktiver Fütterung sowie Glucocorticoidmedikation gewählt. Da jedoch ab der sechsten Woche nach Versuchsbeginn die mittels qCT im Rahmen einer Teilstudie gemessene Knochendichteabnahme geringer ausfiel als erwartet, wurde die Steroiddosis zunächst erhöht und nach weiteren acht Wochen die Darreichungsform verändert, um den Knochenverlust zu steigern. Infolge der Glucocorticoidmedikation zeigten die Tiere Anzeichen eines Cushing-Syndroms mit Alopezie, Stammfettsucht und Muskelatrophie. Zusätzlich wurden die Versuchstiere in Einzelboxen gehalten, um die mechanische Belastung des Skelettsystems zu minimieren. In diesem Zusammenhang ist die Immobilisation eine weitere, den Knochenverlust fördernde Maßnahme.

Der Altersunterschied der Tiere wurde bewusst gewählt, um der Vergleichbarkeit mit der postmenopausalen Osteoporose Rechnung zu tragen. Außerdem sollte sich ein Ausgangsunterschied in der Markerkonzentrationen ergeben, um Unterschiede im Verlauf der beiden Gruppen besser beobachten zu können.

Um eine direkte Wirkung der Glucocorticoide auf die Knochenheilung zu vermeiden, lag zwischen der Beendigung dieser den Knochenmasseverlust fördernden Maßnahme und der Durchführung der Tibiaosteotomie eine Zeitspanne von drei Monaten. Bei Menschen wurde allerdings beobachtet, dass sich nach Beendigung einer Therapie mit Glucocorticoiden die trabekuläre Knochendichte wieder langsam erhöht (van Staa et al. 2000). Inzwischen liegen auch für das Schaf diesbezüglich Ergebnisse vor: In einer Studie wurde gezeigt, dass dem raschen Abfall der Knochendichte nach Steroidmedikation eine langsame, geringgradige Zunahme

folgt, sobald die Medikation beendet wird. Dennoch können die massiven osteoporotischen Veränderungen des Knochens für einen Zeitraum von mehr als vier Monaten aufrechterhalten werden. Dieser „Slow Rebound-Effekt“ ist insofern gering und langsam genug, um eine ausreichend lange Zeitspanne für orthopädische Tests zur Verfügung zu haben (Goldhahn et al. 2005).

5.2 Verlauf der biochemischen Knochenstoffwechselfparameter nach Tibiaosteotomie

Frakturheilung ist ein Prozess, in dem die zellulären Vorgänge im Knochen zur Gewährleistung der Heilung stimuliert sind. Um dynamische Änderungen des Knochenstoffwechsels darzustellen, wurden im Rahmen dieser Studie Knochenstoffwechselfmarker bestimmt, welche Formation und Resorption in der Heilungsphase nach Tibiaosteotomie widerspiegeln sollen.

Das Ziel dieser Untersuchung ist die Beantwortung der Frage, ob mit Hilfe von biochemischen Knochenstoffwechselfparametern Unterschiede in der Knochendefektheilung zwischen gesundem (Kontrollgruppe) und osteoporotischem Knochen (Versuchsgruppe) zu beurteilen sind.

5.2.1 Verlauf des Stoffwechselfparameters Calcium in Serum und Urin

5.2.1.1 Calcium im Serum

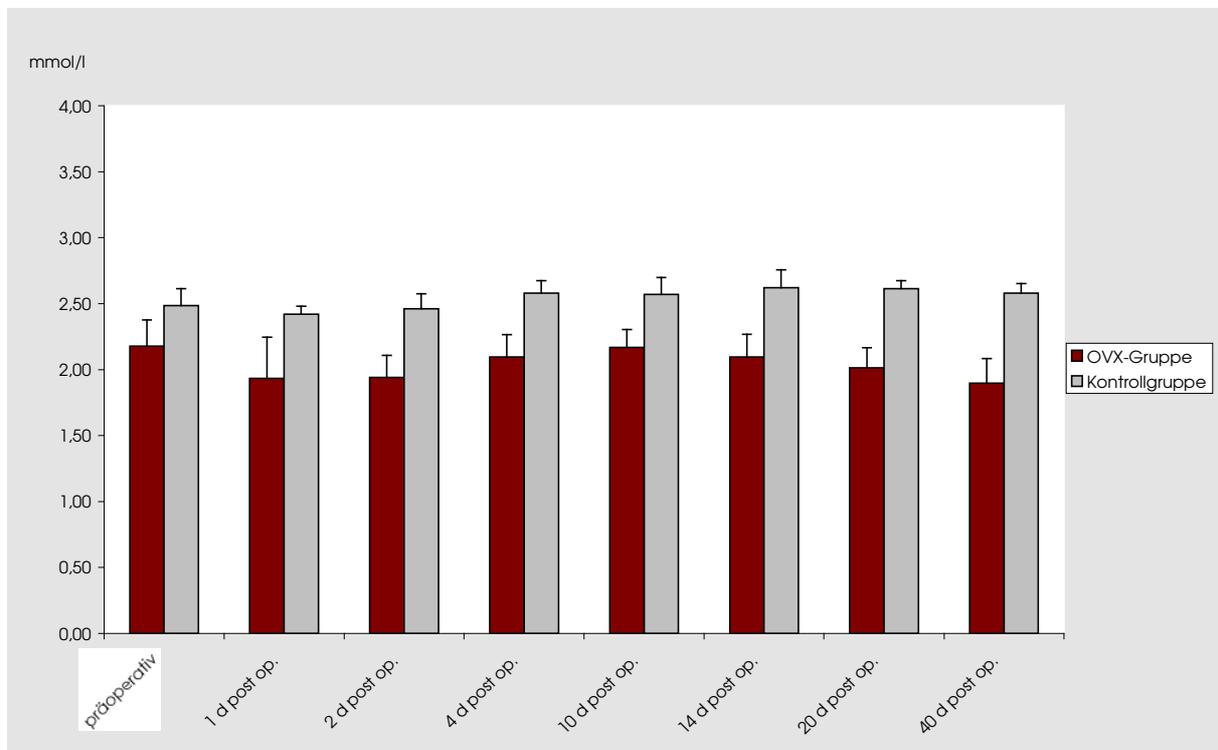


Abbildung 7:
Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Calcium im Serum innerhalb der beiden Gruppen

Die Calciumkonzentration im Serum stellt keinen Knochenstoffwechselfmarker dar, wurde aber als zusätzlicher Stoffwechselfparameter beurteilt.

In beiden Gruppen unterlagen die Calciumkonzentrationen während des zeitlichen Verlaufs keinen deutlichen Veränderungen. Die Ursache hierfür ist in der Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase im Blut zu sehen, welche durch das komplexe Zusammenspiel von Parathormon, Calcitriol und Calcitonin gewährleistet wird. Allerdings waren bei den Tieren der OVX-Gruppe die Serumwerte zu allen Untersuchungszeitpunkten deutlich niedriger. Der Referenzbereich für Serumcalcium liegt beim Schaf bei 2,1 bis 2,7 mmol/l (Kraft und Dürr 1999), so dass die Werte der Versuchstiere an der unteren Grenze des Referenzbereiches oder darunter liegen. Die calcium- und Vitamin D-restrikive Fütterung könnte einen nutritiven sekundären Hyperparathyreoidismus hervorgerufen haben. Die vermehrte Parathormon-

freisetzung dient zwar der Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase, dennoch wird beim sekundären Hyperparathyreoidismus eine Tendenz zu Hypocalcämie beobachtet. Bei Menschen wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhter PTH-Konzentration im Serum und erniedrigter Knochendichte beobachtet (Khaw et al. 1992, Murphy et al. 1993). Studien mit Kaninchen, die eine Diät mit inversem Calcium-Phosphor-Verhältnis erhielten, zeigten Hyperparathyreoidismus und osteoporotische Veränderungen am Knochen (Bai et al. 2006).

5.2.1.2 Calcium im Urin

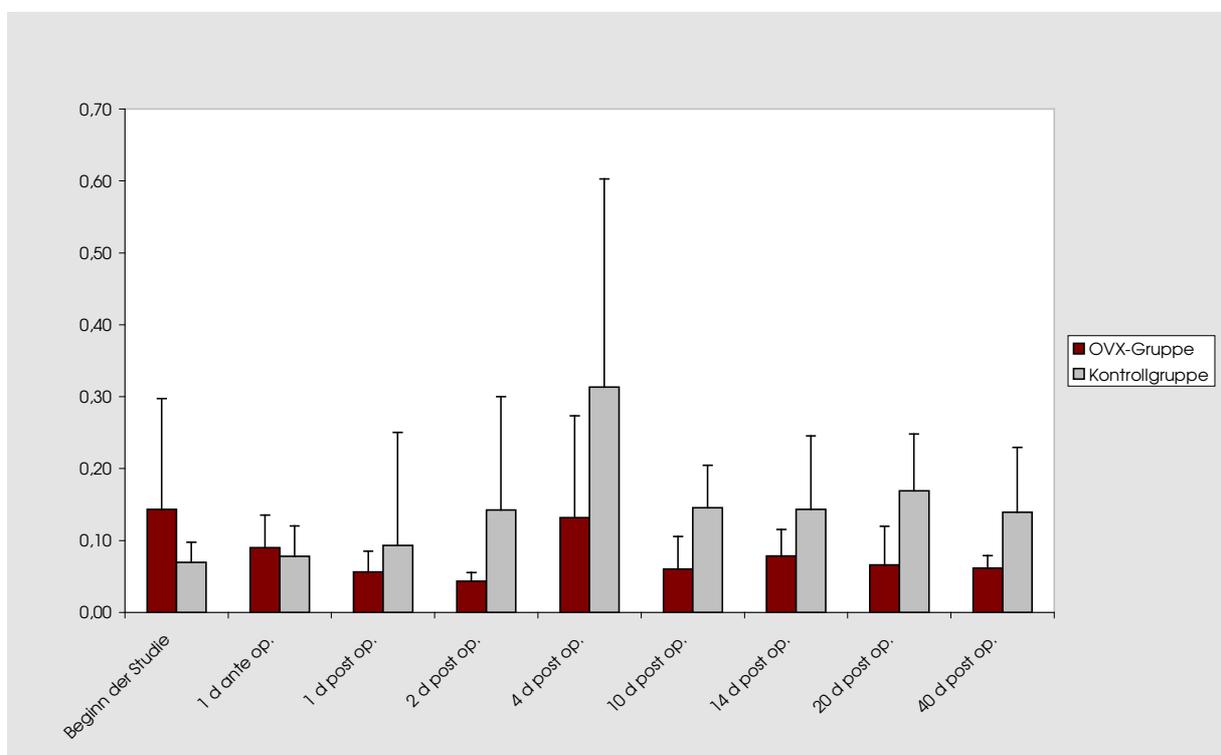


Abbildung 8:
Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Calcium im Urin (mmol/l) bezogen auf Creatinin (mmol/l) innerhalb der beiden Gruppen

Die Calciumausscheidung im Urin unterschied sich zwar zu mehreren Untersuchungszeitpunkten sowohl im Verlauf als auch im Vergleich zwischen den Gruppen deutlich, jedoch sind diese Differenzen nicht signifikant und lassen keinen Trend erkennen. Die Calciumausscheidung ist ein durch zahlreiche Faktoren beeinflussbarer Stoffwechselfparameter und nicht als spezifisch für die

Knochenresorption anzusehen (Seibel und Woitge 1999). Parathormon vermindert die renale Calciumelimination, was möglicherweise die tendenziell niedrigeren Konzentrationen bei den Tieren der Versuchsgruppe erklären könnte. Doch ist auch hier die Streuung der Werte zu groß, um diesbezüglich eine Aussage treffen zu können.

5.3 Verlauf der biochemischen Parameter der Knochenformation

5.3.1 Alkalische Phosphatase

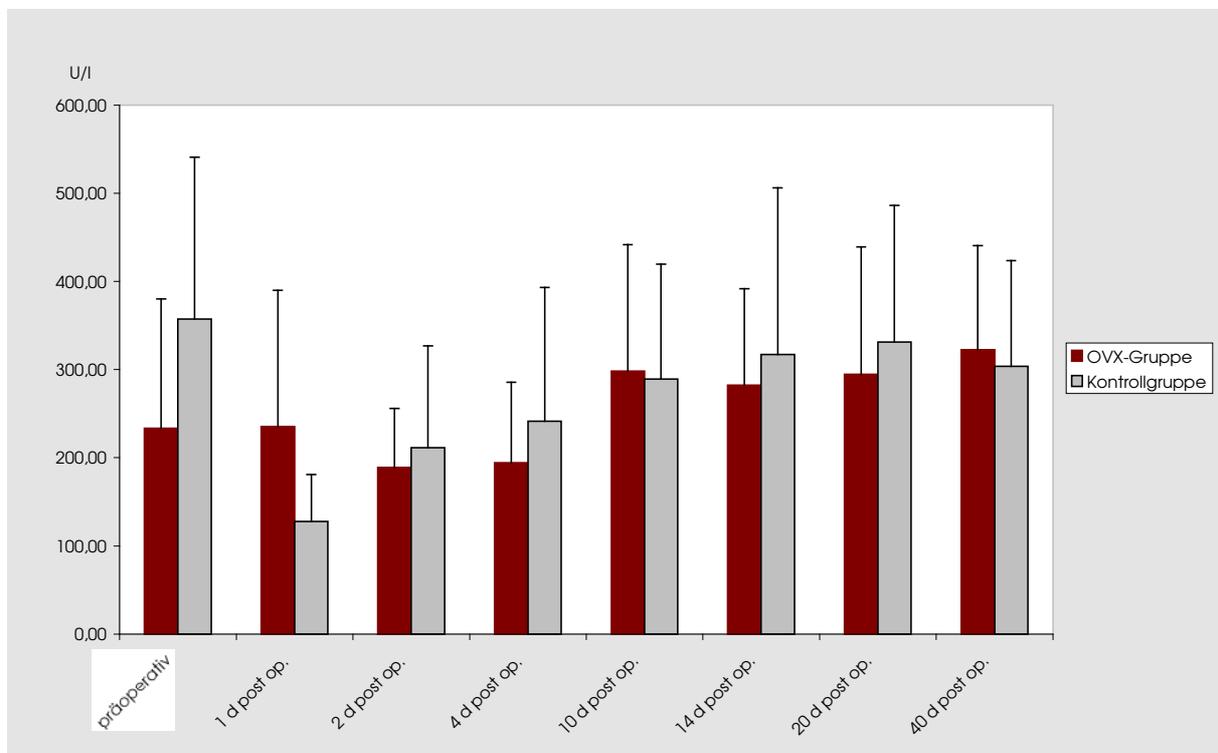


Abbildung 9:

Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der alkalischen Phosphatase innerhalb der beiden Gruppen

Die alkalische Phosphatase ist in vielen Geweben nachzuweisen und besteht aus zahlreichen Isoenzymen, wobei sich der größte Anteil zu etwa gleichen Teilen aus dem Leber- und Knochen-Isoenzym zusammensetzt. Jüngere Tiere weisen jedoch in der Regel eine höhere Enzymaktivität auf, was bei der Interpretation zu berücksichtigen ist. Dies könnte die höhere Konzentration vor der Tibiaosteotomie bei

den Tieren der Kontrollgruppe erklären. Bei Patienten mit Osteoporose sind die Werte der alkalischen Phosphatase aufgrund der höheren Remodeling-Rate bzw. der Reaktion auf die erhöhte Knochenresorption meist leicht erhöht.

Die Frakturheilung gliedert sich in drei Phasen: Entzündung, Reparation und Remodeling (Umbau des Geflechtknochens in lamellären Knochen), wobei biochemische Knochenmarker die Dynamik dieser Prozesse widerspiegeln. Die alkalische Phosphatase repräsentiert die Phase der Matrixreifung und Mineralisation des Frakturkallus und erreicht etwa 20 Tage nach Fraktur ihr Maximum (Einhorn 1998). Die gemessenen Konzentrationen könnten auf diese Phase hinweisen, jedoch ist auch hier die Streuung der Werte sehr groß und weder ein signifikanter Verlauf innerhalb jeder Gruppe noch ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Aktivität der alkalischen Phosphatase durch viele extraskelettale Faktoren (z. B. Hepatopathien) zu beeinflussen ist. Infolgedessen erlaubt die Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatase zwar einen guten Einblick in den Vorgang der Knochenformation, stellt aber einen relativ unspezifischen Marker dar (Seibel 2005).

5.3.2 Knochenspezifische alkalische Phosphatase

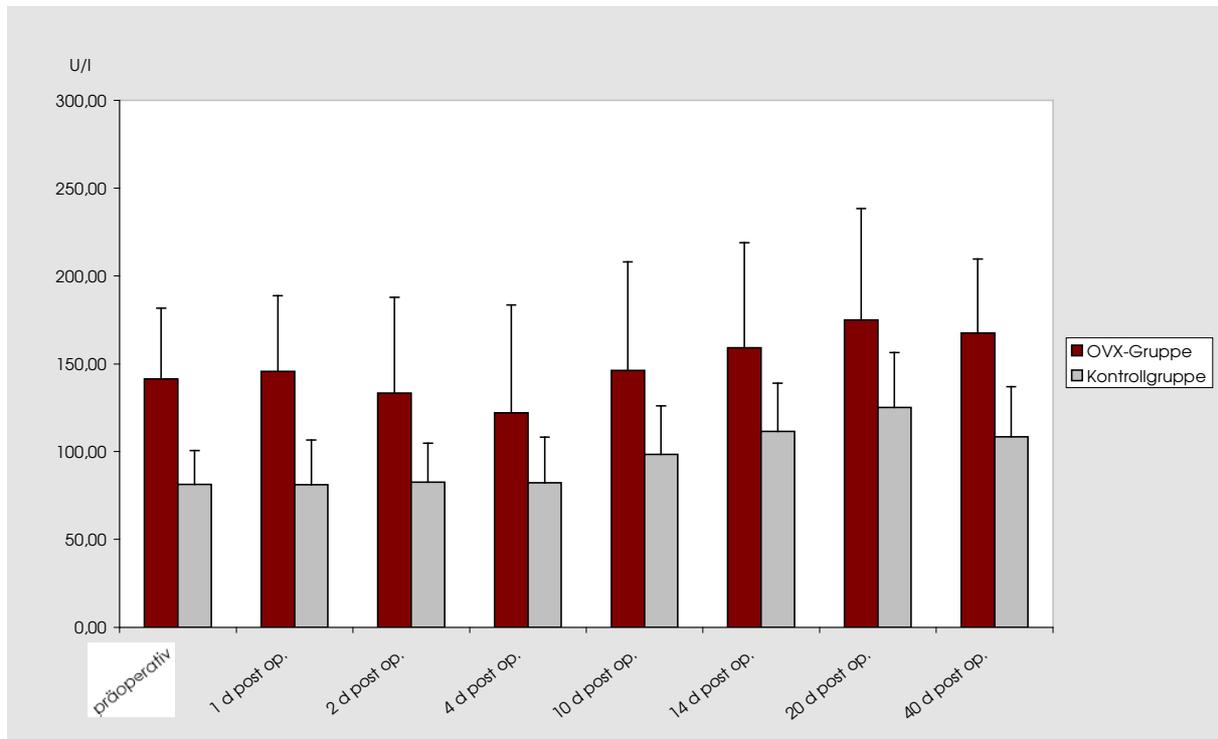


Abbildung 10:

Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase innerhalb der beiden Gruppen

Das osteoblastäre Isoenzym der alkalischen Phosphatase ist als Marker der Knochenformation wesentlich spezifischer als die Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatase, da es ausschließlich die Aktivität der Osteoblasten und die Reifung der extrazellulären Matrix widerspiegelt. In osteoporotischem Knochen ist eine erhöhte Bone Turnover-Rate zu beobachten, wobei es zu einer Entkopplung von Resorption und Formation kommt. Bei verstärkter Resorption ist jedoch die kompensatorische Formation in der Regel unzureichend. Dies könnte die zu allen Messzeitpunkten höhere Konzentration bei den Tieren der Versuchsgruppe erklären. Die Unterschiede sind überwiegend signifikant. Hinsichtlich der Verläufe ist jedoch für keine der beiden Gruppen eine Aussage zu treffen, wenn auch am 20. Tag nach der Tibiaosteotomie in beiden Gruppen die höchste Konzentration gemessen wurde. Dies würde mit der Aussage von Einhorn, nach der die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase am 17. Tag nach Fraktur ihr Maximum erreicht, übereinstimmen (Einhorn 1998) und auch

mit den Beobachtungen, die hinsichtlich der Gesamtaktivität des Enzyms gemacht wurden.

5.4 Verlauf der biochemischen Parameter der Knochenresorption

5.4.1 Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin

Die Collagen-Crosslinks sind Degradationsprodukte der quervernetzten Collagen Typ I-Fibrillen und werden als sehr spezifische Marker der Knochenresorption angesehen, obwohl Pyridinolin in geringem Ausmaß auch in anderen Geweben wie z.B. Knorpel und Sehnen vorkommt (Seibel und Woitge 1999). Nach einer Fraktur spiegeln sie die Entzündungs- und Resorptionsphase der Knochenbruchheilung wider. Verschiedene Studien belegen einen sehr raschen Anstieg der Collagen-Crosslinks bereits ein bis zwei Tage nach Fraktur (Hoesel et al. 2005). Bereits am ersten Tag nach der Osteotomie war auch in dieser Studie bei beiden Markern sowohl in der Versuchsgruppe als auch in der Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg zu beobachten. Die bereits vor der Tibiaosteotomie sowie während des Heilungsverlaufes signifikant höheren Konzentrationen von Pyridinolin als auch Desoxypyridinolin kennzeichnen die bei Osteoporose erhöhte Remodeling-Rate. Zudem bestand in beiden Gruppen ein enger Zusammenhang zwischen diesen beiden Markern, der zu fast allen Zeitpunkten signifikant war.

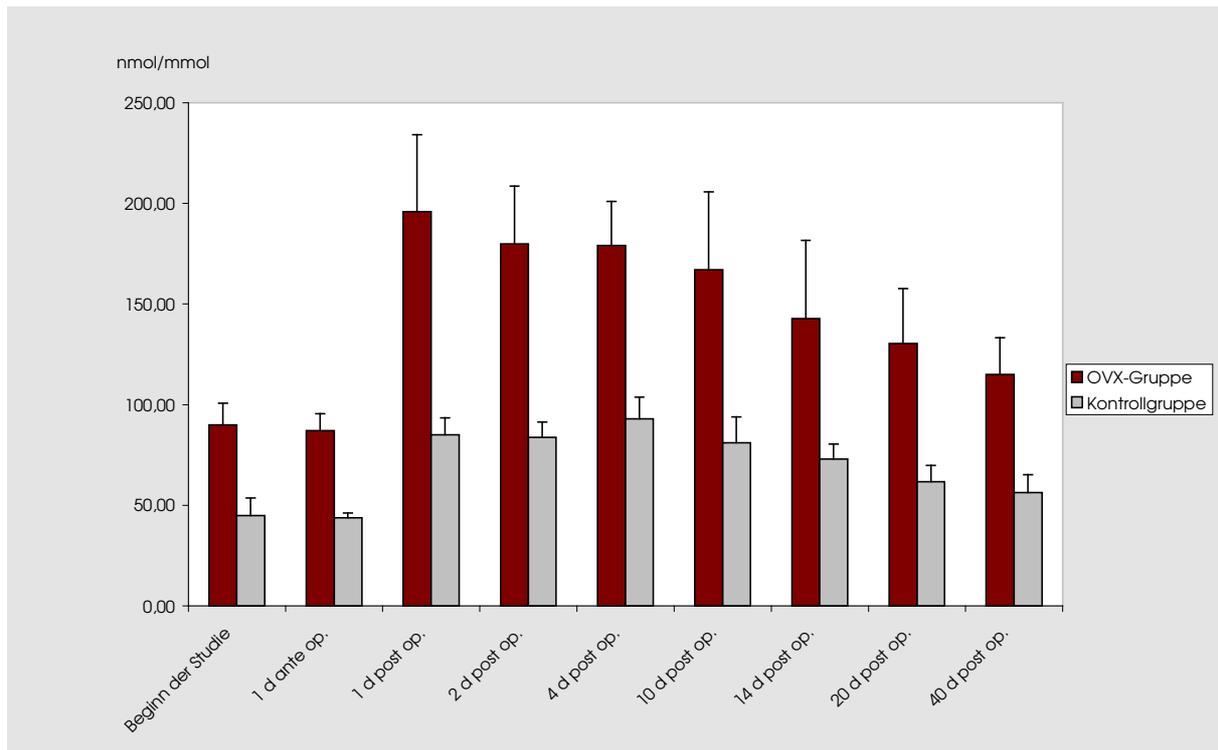


Abbildung 11:
Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Pyridinolin innerhalb der beiden Gruppen

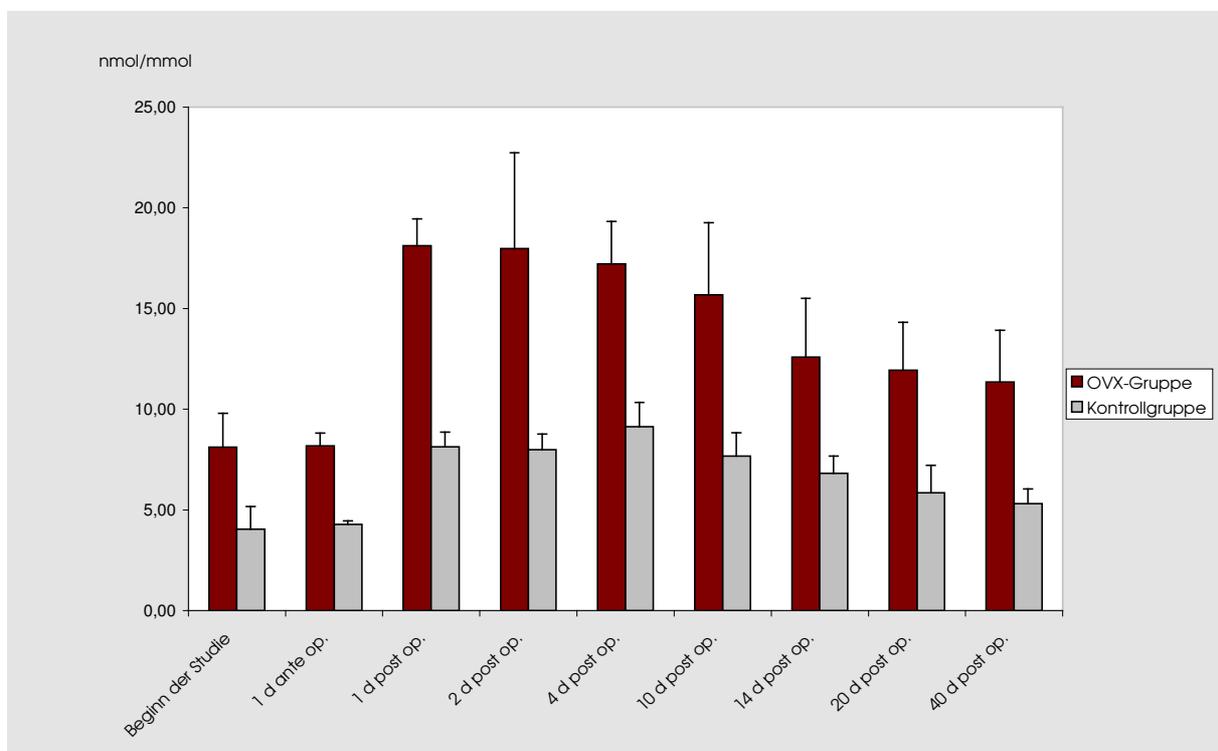


Abbildung 12:
Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Desoxy pyridinolin innerhalb der beiden Gruppen

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass die biochemischen Marker des Knochenstoffwechsels eine Entkopplung von Formation und Resorption sowie eine Beeinträchtigung der Frakturheilung in osteoporotischem Knochen widerspiegeln können. Insbesondere die Collagen-Crosslinks scheinen im Verlauf der Knochenbruchheilung als aussagekräftige Marker zu dienen. Um differenziertere Aussagen treffen zu können, sollten in zukünftigen Studien die Messungen über einen längeren Zeitraum hinweg durchgeführt werden, insbesondere um den Verlauf der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase in der späteren Knochenbruchheilung beurteilen zu können. Alternativ wäre auch die Auswahl eines anderen Formationsmarkers, der eine frühere Reaktion nach Fraktur zeigt (wie zum Beispiel eines Markers der Procollagen-Typ I-Peptide), denkbar.

Die Ergebnisse dieser Studie können lediglich einen Trend aufzeigen, welcher mit Hilfe eines größeren Untersuchungskollektivs zu verifizieren wäre.

6 Zusammenfassung

Die Erkrankung Osteoporose stellt weltweit eines der größten Gesundheitsprobleme dar. Wenn auch Prävention und Therapie die primären Maßnahmen sind, der Erkrankung zu begegnen, ist infolge der hohen Inzidenz osteoporoseassoziiertes Frakturen auch der Frakturversorgung Rechnung zu tragen. Zahlreiche Tiermodelle sind etabliert, die die Erforschung von Ätiologie und Pathogenese ermöglichen und die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien erlauben. Ein Tiermodell, welches orthopädischen und chirurgischen Fragestellungen hinsichtlich Osteosynthesematerialien und Verfahrensweisen der Frakturversorgung von osteoporotischem Knochen genügt, steht bislang nicht zur Verfügung. Um eine Übertragbarkeit auf die Humanmedizin zu ermöglichen, ist eine ausreichende Knochengröße des Modells Voraussetzung.

In vorliegender Studie wurde in Zusammenarbeit mit dem AO Research Institute, Davos, Schweiz, die Fraktur- und Knochendefektheilung am Tiermodell Schaf untersucht, welches als Großtiermodell zukünftig eine Schlüsselstellung einnehmen könnte. Das Ziel der Arbeit war es, Unterschiede im Heilungsverlauf zwischen osteoporotischem und gesundem Knochen mit Hilfe biochemischer Knochenstoffwechselfmarker darzustellen und die Eignung des Schafes für diese Fragestellung zu überprüfen.

Durch die Kombination von Ovariectomie, calcium- und Vitamin D- reduzierter Fütterung sowie Glucocorticoidmedikation konnte ein reproduzierbarer Knochenverlust bei einer Gruppe von sieben Tieren induziert werden. Eine ebenso viele Tiere umfassende Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Die Tiere der Versuchsgruppe waren etwa sieben, diejenigen der Kontrollgruppe etwa drei Jahre alt. Alle Tiere wurden einer Tibiaosteotomie mit anschließender Stabilisierung durch einen Fixateur externe unterzogen. Um die dynamischen Vorgänge des Knochenstoffwechsels während der Frakturheilung in osteoporotischem und gesundem Knochen zu untersuchen, erfolgte über den Zeitraum von 40 Tagen die Bestimmung biochemischer Knochenstoffwechselfparameter in Serum und Urin. Als Marker der Formation wurden die alkalische Phosphatase sowie die

knochenspezifische alkalische Phosphatase gemessen. Als Marker der Resorption dienten die Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin. Zusätzlich wurde die Serumkonzentration von Calcium sowie die Calciumausscheidung bestimmt. Die Gesamttaktivität der alkalischen Phosphatase wird durch extraskellettale Faktoren beeinflusst, weshalb dieser Marker nur bedingt geeignet ist, die Knochenformation darzustellen. Spezifischer repräsentiert die knochenspezifische alkalische Phosphatase als Isoenzym der alkalischen Phosphatase die Phase der Formation. Die Konzentrationen beider Marker unterlagen starken Schwankungen, wenn auch die knochenspezifische alkalische Phosphatase in beiden Gruppen tendenziell eine Zunahme bis zum 20. Tag nach Osteotomie erkennen ließ. In zukünftigen Studien sollte die Untersuchung über einen längeren Zeitraum erfolgen, um mit Hilfe der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase die Phase der Formation besser beurteilen zu können. Beide Collagen-Crosslinks zeigten in beiden Gruppen bereits am ersten Tag nach Osteotomie einen signifikanten Anstieg, wodurch die Entzündungs- und Resorptionsphase der Knochenbruchheilung widergespiegelt wird. Sowohl die Konzentrationen der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase als auch die Konzentrationen von Pyridinolin und Desoxypyridinolin lagen in der Versuchsgruppe zu allen Messzeitpunkten deutlich über denen der Kontrollgruppe, was auf eine Entkopplung von Formation und Resorption in Anwesenheit von Osteoporose und eine Beeinträchtigung der Frakturheilung schließen lässt.

Das Schaf scheint geeignet zu sein, unterschiedliche Heilungsverläufe in osteoporotischem und gesundem Knochen zu untersuchen, insbesondere mit Hilfe von Pyridinolin und Desoxypyridinolin. Dennoch können die Ergebnisse dieser Pilotstudie lediglich einen Trend aufzeigen, welcher mit Hilfe eines größeren Untersuchungskollektivs zu verifizieren wäre.

7 Summary

Susanne Schumacher

Biochemical markers of bone turnover after osteotomy

The sheep as a model for osteoporosis

Osteoporosis is known as one of the major health problems worldwide. Even though preventative measures and therapies are the primary measures to deal with this disease, high incidence rates of fractures associated with osteoporosis refer to the need of adequate fracture care. Numerous animal models have become a reliable basis for research on aetiology and on pathogenesis and thus enable scientists to develop new treatment strategies. So far there has been no animal model available which satisfactorily answers the orthopaedic and surgical questions related to osteosynthesis materials and fracture healing treatments for bones subject to osteoporosis. In order to allow any transfer of knowledge to the human medicine field, an adequate size of the animal bones used for the tests is mandatory.

This study was made in cooperation with the AO Research Institute, located in Davos, Switzerland, conducting research on fracture healing and bone defect curing processes by means of a sheep model. This model could adopt a key position when the tests are run on a large scale. The target of this study was to describe several different curing processes observed on both sound bones and on osteoporotic bones applying a biochemical metabolism indicator and to find an answer to the question whether or not a sheep is the appropriate animal to conduct such tests on.

Due to a combination of ovariectomy, vitamin D-reduced and calcium-reduced feeding, and glucocorticoid medication, a reproducible loss in bone substance could be induced with a flock of seven sheep. Another test flock, also consisting of seven sheep, was not subject to any treatment and was used as the reference flock. The animals of the medical test flock were about seven years old, and the animals of the reference flock were about three years old. All animals had to undergo a tibiaosteomy process with subsequent stabilisation by means of a fixateur externe. The biochemical markers of bone turnover contained in the serum and in the urine

were documented for 40 days in order to examine the dynamic processes of the bone turnover. The markers used were the collagen crosslinks pyridinoline (PYD) and desoxypyridinoline (DPD). In addition, the calcium concentration of the serum as well as the excretion of calcium were documented. As the total activity of the alkaline phosphatase is affected by extraskeletal factors, this marker is appropriate only to a certain extent in terms of bone formation indication. A more specific method to describe the formation process is the bone specific alkaline phosphatase as an isoenzyme of the alkaline phosphatase. The concentrations of the two markers were subject to major variations, although the bone specific alkaline phosphatase showed the tendency to rise until day 20 after osteomy in both flocks. For further studies, the tests could be carried out for a longer period of time to be able to better assess the formation phase by means of the bone specific alkaline phosphatase. Both collagen crosslinks showed in both flocks a significant rise already on the first day after osteomy, which revealed the state of both the inflammation and the absorption phases of the fracture healing process. Both the concentrations of the bone specific alkaline phosphatase and the pyridinoline and desoxypyridinoline concentrations were at any time significantly higher in the test flock compared with the values gathered from the reference flock. This may indicate a separation of formation and resorption in case of osteoporosis as well as a negative impact on the fracture healing process.

The sheep seems to be an appropriate animal for examinations on different healing processes on osteoporotic and sound bones, especially when pyridinoline and desoxypyridinoline are applied. However, the results of this pilot study can only reveal a trend which would have to be verified by means of a major examination collective.

8 Literaturverzeichnis

Albright F., Bloomberg E., Smith P.H. (1940)

Postmenopausal osteoporosis.

Trans Assoc Am Physicians 55: 298–305.

Alhava E.M., Olkkonen H., Puitinen J., Nokso-Koivisto V.M. (1977)

Zinc content of human cancellous bone.

Acta Orthop Scand. 48(1):1-4.

Ammann P., Rizzoli R., Muller K., Slosman D., Bonjour J.P. (1993)

IGF-I and pamidronate increase bone mineral density in ovariectomized adult rats.

Am J Physiol. 265(5 Pt 1):E770-6.

Ammann P., Bourrin S., Bonjour J-P., Meyer J-M., Rizzoli R. (2000)

Protein undernutrition-induced bone loss is associated with decreased IGF-I levels and estrogen deficiency.

J Bone Miner Res. 15(4):683-90.

Arens D., Sigrist I., Alini M., Schawalder P., Schneider E., Eggermann M. (2006)

Seasonal changes in bone metabolism in sheep.

Vet J. doi:10.1016/j.tvjl.2006.10.001.

Bai R.J., Cong D.G., Shen B.Z., Han M.J., Wu Z.H. (2006)

Bone diseases in rabbits with hyperparathyroidism: computed tomography, magnetic resonance imaging and histopathology.

Chin Med J (Engl.) 119(15):1248-55.

Bainbridge K.E., Sowers M., Lin X., Harlow S.D. (2004)

Risk factors for low bone mineral density and the 6-year rate of bone loss among premenopausal and perimenopausal women.

Osteoporos Int. 439-46.

Bakhireva L.N., Barrett-Connor E., Kritz-Silverstein D., Morton D.J. (2004)

Modifiable predictors of bone loss in older men: a prospective study.

Am J Prev Med. 26(5):436-42.

Barker M.E., Blumsohn A. (2003)

Is vitamin A consumption a risk factor for osteoporotic fracture?

Proc Nutr Soc. 62(4):845-50.

- Barkhem T., Carlsson B., Nilsson Y., Enmark E., Gustafsson J., Nilsson S. (1998)
Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists.
Mol Pharmacol. 54(1):105-12.
- Baroncelli G.I., Bertelloni S., Sodini F., Saggese G. (2005)
Osteoporosis in children and adolescents: etiology and management.
Paediatr Drugs. 7(5):295-323.
- Barrett-Connor E., Siris E.S., Wehren L.E., Miller P.D., Abbott T.A., Berger M.L., Santora A.C., Sherwood L.M. (2005)
Osteoporosis and fracture risk in women of different ethnic groups.
J Bone Miner Res. 20(2):185-94.
- Bensen R., Adachi J.D., Papaioannou A., Ioannidis G., Olszynski W.P., Sebaldt R.J., Murray T.M., Josse R.G., Brown J.P., Hanley D.A., Petrie A., Puglia M., Goldsmith C.H., Bensen W. (2005)
Evaluation of easily measured risk factors in the prediction of osteoporotic fractures.
BMC Musculoskelet Disord. 5;6:47.
- Bergstralh E.J., Sinaki M., Offord K.P., Wahner H.W., Melton L.J. III (1990)
Effect of season on physical activity score, back extensor muscle strength, and lumbar bone mineral density.
J Bone Miner Res. 5(4):371-7.
- Bernecker P.M. (2004)
Osteomalazie und Rachitis
(Osteomalacia and rickets)
Wien Med Wochenschr. 154(5-6):102-6.
- Bettica P., Bevilacqua M., Vago T., Norbiato G. (1999)
High prevalence of hypovitaminosis D among free-living postmenopausal women referred to an osteoporosis outpatient clinic in northern Italy for initial screening.
Osteoporos Int. 9(3):226-9.
- Bhattoa H.P., Bettembuk P., Ganacharya S., Balogh A. (2004)
Prevalence and seasonal variation of hypovitaminosis D and its relationship to bone metabolism in community dwelling postmenopausal Hungarian women.
Osteoporos Int. 15(6):447-51.

Bianchi M.L. (2005)

How to manage osteoporosis in children.

Best Pract Res Clin Rheumatol. 19(6):991-1005.

Bikle D.D., Oda Y., Xie Z. (2005)

Vitamin D and skin cancer: a problem in gene regulation.

J Steroid Biochem Mol Biol. 97(1-2):83-91.

Binkley N.C., Schmeer P., Wasnich R.D., Lenchik L. (2002)

International Society for Clinical Densitometry Position Development Panel and Scientific Advisory Committee.

What are the criteria by which a densitometric diagnosis of osteoporosis can be made in males and non-Caucasians?

J Clin Densitom. 5 Suppl:19-27.

Binkley N., Kiebzak G.M., Lewiecki E.M., Krueger D., Gangnon R.E., Miller P.D., Shepherd J.A., Drezner M.K. (2005)

Recalculation of the NHANES database SD improves T-score agreement and reduces osteoporosis prevalence.

J Bone Miner Res. 20(2):195-201.

Bonjour J.P., Theintz G., Law F., Slosman D., Rizzoli R. (1994)

Peak bone mass.

Osteoporos Int. 4 Suppl 1:7-13.

Bonjour J.P., Schurch M.A., Rizzoli R. (1996)

Nutritional aspects of hip fractures.

Bone. 18(3 Suppl):139S-144S.

Bonnick S.L., Shulman L. (2006)

Monitoring osteoporosis therapy: bone mineral density, bone turnover markers, or both?

Am J Med. 119(4 Suppl 1):S25-31.

Boonen S., Aerssens J., Dequeker J., Nicholson P., Cheng X., Lowet G, Verbeke G., Bouillon R. (1997)

Age-associated decline in human femoral neck cortical and trabecular content of insulin-like growth factor I: potential implications for age-related (type II) osteoporotic fracture occurrence.

Calcif Tissue Int. 61(3):173-8.

Bostedt H., Dedie K. (Hrsg.)(1996)

Schaf- und Ziegenkrankheiten.

Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 2. Auflage. 28.

Brown J.E., Cook R.J., Major P., Lipton A., Saad F., Smith M., Lee K.A., Zheng M., Hei Y.J., Coleman R.E. (2005)

Bone turnover markers as predictors of skeletal complications in prostate cancer, lung cancer, and other solid tumors.

J Natl Cancer Inst. 97(1):59-69.

Cagnacci A., Baldassari F., Rivolta G., Arangino S., Volpe A. (2003)

Relation of homocysteine, folate, and vitamin B12 to bone mineral density of postmenopausal women.

Bone. 33(6):956-9.

Calhoun N.R., Smith J.C. Jr, Becker K.L. (1974)

The role of zinc in bone metabolism.

Clin Orthop Relat Res. (103):212-34.

Calvo M.S., Kumar R., Heath H. (1990)

Persistently elevated parathyroid hormone secretion and action in young women after four weeks of ingesting high phosphorus, low calcium diets.

J Clin Endocrinol Metab. 70(5):1334-40.

Caraballo P.J., Heit J.A., Atkinson E.J., Silverstein M.D., O'Fallon W.M., Castro M.R., Melton L.J. III (1999)

Long-term use of oral anticoagulants and the risk of fracture.

Arch Intern Med. 159(15):1750-6.

Carbonell Sala S., Masi L., Marini F., Del Monte F., Falchetti A., Franceschelli F., Brandi M.L. (2005)

Genetics and pharmacogenetics of osteoporosis.

J Endocrinol Invest. 28(10 Suppl):2-7.

Chakkalakal D.A. (2005)

Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair.

Alcohol Clin Exp Res. 29(12):2077-90.

- Chakkalakal D.A., Novak J.R., Fritz E.D., Mollner T.J., McVicker D.L., Garvin K.L., McGuire M.H., Donohue T.M. (2005)
Inhibition of bone repair in a rat model for chronic and excessive alcohol consumption.
Alcohol. 36(3):201-14.
- Chan H.H., Lau E.M., Woo J., Lin F., Sham A., Leung P.C. (1996)
Dietary calcium intake, physical activity and the risk of vertebral fracture in Chinese.
Osteoporos Int. 6(3):228-32.
- Chang K.P., Center J.R., Nguyen T.V., Eisman J.A. (2004)
Incidence of hip and other osteoporotic fractures in elderly men and women: Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study.
J Bone Miner Res. 19(4):532-6.
- Chapuy M.C., Arlot M.E., Delmas P.D., Meunier P.J. (1994)
Effect of calcium and cholecalciferol treatment for three years on hip fractures in elderly women.
BMJ. 308(6936):1081-2.
- Chapuy M.C., Preziosi P., Maamer M., Arnaud S., Galan P., Hercberg S., Meunier P.J. (1997)
Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos Int. 7(5):439-43.
- Chavassieux P., Seeman E., Delmas P.D. (2007)
Insights into Material and Structural Basis of Bone Fragility from Diseases Associated with Fractures: How Determinants of the Biomechanical Properties of Bone Are Compromised by Disease.
Endocr Rev. 0: doi:10.1210/er.2006-0029.
- Chen X., Anderson J.J. (2002)
Isoflavones and bone: animal and human evidence of efficacy.
J Musculoskelet Neuronal Interact. 2(4):352-9.
- Chen T., Berenson J., Vescio R., Swift R., Gilchick A., Goodin S., LoRusso P., Ma P., Ravera C., Deckert F., Schran H., Seaman J., Skerjanec A. (2002a)
Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases.
J Clin Pharmacol. 42(11):1228-36.

- Chen X.W., Garner S.C., Anderson JJ. (2002b)
Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen-receptor-dependent pathway.
Biochem Biophys Res Commun. 295(2):417-22.
- Chen T.C., Chimeh F., Lu Z., Mathieu J., Person K.S., Zhang A., Kohn N., Martinello S., Berkowitz R., Holick M.F. (2007)
Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D.
Arch Biochem Biophys. 460 (2):213-7.
- Clegg M.S., Donovan S.M., Monaco M.H., Baly D.L., Ensunsa J.L., Keen C.L. (1998)
The influence of manganese deficiency on serum IGF-1 and IGF binding proteins in the male rat.
Proc Soc Exp Biol Med. 219(1):41-7.
- Cooley H., Jones G. (2001)
A population-based study of fracture incidence in southern Tasmania: lifetime fracture risk and evidence for geographic variations within the same country.
Osteoporos Int. 12(2):124-30.
- Cooper, A. (1851)
Dislocations and fractures of the joints.
Blanchard and Lea, Philadelphia.
- Cooper C. (1999a)
Epidemiology of osteoporosis.
Osteoporos Int. 9 Suppl 2:S2-8.
- Cooper G.S. (1999b)
Genetic studies of osteoporosis: what have we learned.
J Bone Miner Res. 14(10):1646-8.
- Cooper C., Atkinson E.J., Wahner H.W., O'Fallon W.M., Riggs B.L., Judd H.L., Melton L.J. III. (1992a)
Is caffeine consumption a risk factor for osteoporosis?
J Bone Miner Res. 7(4):465-71.
- Cooper C., Campion G., Melton L.J. III. (1992b)
Hip fractures in the elderly: a world-wide projection.
Osteoporos Int. 2(6):285-9.

- Cooper C., Javaid K., Westlake S., Harvey N., Dennison E. (2005)
The influence of vitamin D on bone health across the life cycle. Developmental origins of osteoporotic fracture: the role of maternal vitamin D insufficiency. *J Nutr.* 135(11):2728S-34S.
- Cumming R.G., Nevitt M.C. (1997)
Calcium for prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 12(9):1321-9.
- Cumming R.G., Cummings S.R., Nevitt M.C., Scott J., Ensrud K.E., Vogt T.M., Fox K. (1997)
Calcium intake and fracture risk: results from the study of osteoporotic fractures. *Am J Epidemiol.* 145(10):926-34.
- Cummings S.R., Melton L.J. (2002)
Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet.* 359(9319):1761-7.
- Cummings S.R., Nevitt M.C., Browner W.S., Stone K., Fox K.M., Ensrud K.E., Cauley J., Black D., Vogt T.M. (1995)
Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med.* 332(12):767-73.
- Dalle Carbonare L., Arlot M.E., Chavassieux P.M., Roux J.P., Portero N.R., Meunier P.J. (2001)
Comparison of trabecular bone microarchitecture and remodeling in glucocorticoid-induced and postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 16(1):97-103.
- De Laet C., van der Klift M., Hofmann A., Pols H.A. (2002)
Osteoporosis in men and women: a story about bone mineral density thresholds and hip fracture risk. *J Bone Miner Res.* 17(12):2231-6.
- De Laet C., Kanis J.A., Oden A., Johanson H., Johnell O., Delmas P., Eisman J.A., Kroger H., Fujiwara S., Garnero P., McCloskey E.V., Mellstrom D., Melton L.J. III, Meunier P.J., Pols H.A., Reeve J., Silman A., Tenenhouse A. (2005)
Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 16(11):1330-8.

Delmas P.D., Genant H.K., Crans G.G., Stock J.L., Wong M., Siris E., Adachi J.D. (2003)
Severity of prevalent vertebral fractures and the risk of subsequent vertebral and nonvertebral fractures: results from the MORE trial.
Bone. 33(4):522-32.

Department of Health and Human Services. (2004)
Bone health and osteoporosis: a report of the Surgeon-General. Rockville: US
Department of Health and Human Services, Office of the Surgeon General.

Devine A., Dick I.M., Islam A.F., Dhaliwal S.S., Prince R.L. (2005)
Protein consumption is an important predictor of lower limb bone mass in elderly women.
Am J Clin Nutr. 81(6):1423-8.

Dhonukshe-Rutten R.A., Lips M., de Jong N., Chin A Paw M.J., Hiddink G.J., van Dusseldorp M., De Groot L.C., van Staveren W.A. (2003)
Vitamin B-12 status is associated with bone mineral content and bone mineral density in frail elderly women but not in men.
J Nutr. 133(3):801-7.

Dimai H.P., Porta S., Wirnsberger G., Lindschinger M., Pamperl I., Dobnig H., Wilders-Truschnig M., Lau K.H. (1998)
Daily oral magnesium supplementation suppresses bone turnover in young adult males.
J Clin Endocrinol Metab. 83(8):2742-8.

Douglas A.S., Robins S.P., Hutchison J.D., Porter R.W., Stewart A., Reid D.M. (1995)
Carboxylation of osteocalcin in post-menopausal osteoporotic women following vitamin K and D supplementation.
Bone. 17(1):15-20.

Dunstan C.R., Somers N.M., Evans R.A. (1993)
Osteocyte death and hip fracture.
Calcif Tissue Int. 53 Suppl 1:S113-6.

DVO-Leitlinie Osteoporose nach der Menopause und im Alter (2006)
Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Frauen ab der Menopause, bei Männern ab dem 60. Lebensjahr.
S3-Leitlinie des Dachverbandes der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V.

Egermann M., Goldhahn J., Schneider E. (2005)
Animal models for fracture treatment in osteoporosis.
Osteoporos Int. 16 Suppl 2:S129-38.

Eghbali-Fatourehchi 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.
J Clin Invest. 111(8):1221-30.

Einhorn T.A. (1998)
The cell and molecular biology of fracture healing.
Clin Orthop Relat Res. (355 Suppl):S7-21.

Eisman J.A. (1999)
Genetics of osteoporosis.
Endocr Rev. 20(6):788-804.

Elders P.J., Lips P., Netelenbos J.C., van Ginkel F.C., Khoe E., van der Vijgh W.J., van der Stelt P.F. (1994)
Long-term effect of calcium supplementation on bone loss in perimenopausal women.
J Bone Miner Res. 9(7):963-70.

Ensrud K.E., Ewing S.K., Stone K.L., Cauley J.A., Bowman P.J., Cummings S.R. (2003)
Intentional and unintentional weight loss increase bone loss and hip fracture risk in older women.
J Am Geriatr Soc. 51(12):1740-7.

Epstein S., Inzerillo A.M., Caminis J., Zaidi M. (2003)
Disorders associated with acute rapid and severe bone loss.
J Bone Miner Res. 18(12):2083-94.

Ettlinger B., Ray G.T., Pressman A.R., Gluck O. (2003)
Limb fractures in elderly men as indicators of subsequent fracture risk.
Arch Intern Med. 163(22):2741-7.

Falahati-Nini A., Riggs B.L., Atkinson E.J., O'Fallon W.M., Eastell R., Khosla S. (2000)
Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men.
J Clin Invest. 106(12):1553-60.

Ferrari S.L. (2005)

Osteoporosis: a complex disorder of aging with multiple genetic and environmental determinants.

World Rev Nutr Diet. 95:35-51.

Feskanich D., Willett W., Colditz G. (2002)

Walking and leisure-time activity and risk of hip fracture in postmenopausal women.

JAMA. 288(18):2300-6.

Feskanich D., Willett W.C., Colditz G.A. (2003)

Calcium, vitamin D, milk consumption, and hip fractures: a prospective study among postmenopausal women.

Am J Clin Nutr. 77(2):504-11.

Food and Drug Administration (1994)

Draft- guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. Division of metabolism and endocrine drug product.

Francis R.M. (2006)

Calcium, vitamin D and involutional osteoporosis.

Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 9(1):13-7.

Frassetto L.A., Todd K.M., Morris R.C. Jr, Sebastian A. (2000)

Worldwide incidence of hip fracture in elderly women: relation to consumption of animal and vegetable foods.

J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 55(10):M585-92.

Friedman A.J., Ravnkar V.A., Barbieri R.L. (1987)

Serum steroid hormone profiles in postmenopausal smokers and nonsmokers.

Fertil Steril. 47(3):398-401.

Fujita T., Fujii Y., Kitagawa R., Fukase M. (1993)

Calcium supplementation in osteoporosis.

Osteoporos Int. 3 Suppl 1:159-62.

Garnero P., Delmas P.D. (1996)

New Developments in Biochemical Markers for Osteoporosis.

Calcif Tissue Int. 59(Suppl 1):S2-S9.

Garnero P., Delmas P.D. (2004)

Contribution of bone mineral density and bone turnover markers to the estimation of risk of osteoporotic fracture in postmenopausal women.

J Musculoskelet Neuronal Interact. 4(1):50-63.

Garnero P., Arden N.K., Griffiths G., Delmas P.D., Spector T.D. (1996)

Genetic influence on bone turnover in postmenopausal twins.

J Clin Endocrinol Metab. 81(1):140-6.

Gasser R.W., Finkenstedt G. (1999)

Rationale Befunderhebung: Differentialdiagnose verschiedener Osteoporoseformen. (Systematic diagnostic workup: differential diagnosis of various forms of osteoporosis)

Wien Med Wochenschr. 149(16-17):479-84.

Gaugris S., Heaney R.P., Boonen S., Kurth H., Bantkover J.D., Sen S.S. (2005)

Vitamin D inadequacy among post-menopausal women: a systematic review.

OJM. 98(9):667-76.

Gillberg P., Olofsson H., Mallmin H., Blum W.F., Ljunghall S., Nilsson A.G. (2002)

Bone mineral density in femoral neck is positively correlated to circulating insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein (IGFBP)-3 in Swedish men.

Calcif Tissue Int. 70(1):22-9.

Goldhahn J., Jenet A., Schneider E., Lill C.A. (2005)

Slow rebound of cancellous bone after mainly steroid-induced osteoporosis in ovariectomized sheep.

J Orthop Trauma. 19(1):23-8.

Gordon C.M., Grace E., Emans S.J., Feldman H.A., Goodman E., Becker K.A., Rosen C.J., Gundberg C.M., LeBoff M.S. (2002)

Effects of oral dehydroepiandrosterone on bone density in young women with anorexia nervosa: a randomized trial.

J Clin Endocrinol Metab. 87(11):4935-41.

Gordon C.M., DePeter K.C., Feldman H.A., Grace E., Emans S.J. (2004)

Prevalence of vitamin D deficiency among healthy adolescents.

Arch Pediatr Adolesc Med. 158(6):531-7.

Haentjens P., Autier P., Collins J., Velkeniers B., Vanderschueren D., Boonen S. (2003)

Colles fracture, spine fracture, and subsequent risk of hip fracture in men and women. A meta-analysis.

J Bone Joint Surg Am. 85-A(10):1936-43.

Halioua L., Anderson J.J. (1989)

Lifetime calcium intake and physical activity habits: independent and combined effects on the radial bone of healthy premenopausal Caucasian women.
Am J Clin Nutr. 49(3):534-41.

Hall S.L., Greendale G.A. (1998)

The relation of dietary vitamin C intake to bone mineral density: results from the PEPI study.
Calcif Tissue Int. 63(3):183-9.

Hautanen A., Manttari M., Kupari M., Sarna S., Manninen V., Frick M.H., Adlercreutz H. (1993)

Cigarette smoking is associated with elevated adrenal androgen response to adrenocorticotropin.
J Steroid Biochem Mol Biol. 46(2):245-51.

Heaney R.P. (1993)

Nutritional factors in osteoporosis.
Annu Rev Nutr. 13:287-316.

Heaney R.P. (2000)

Vitamin D: how much do we need, and how much is too much?
Osteoporos Int. 11(7):553-5.

Heaney R.P. (2003)

Advances in therapy for osteoporosis.
Clin Med Res. 1(2):93-9.

Heaney R.P. (2004)

Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency.
Am J Clin Nutr. 80(6 Suppl):1706S-9S.

Heaney R.P., Nordin B.E. (2002)

Calcium effects on phosphorus absorption: implications for the prevention and co-therapy of osteoporosis.
J Am Coll Nutr. 21(3):239-44.

Heiss C., Hoesel L.M., Wehr U., Keller T., Horas U., Meyer C., Rambeck W., Schnettler R. (2004)

Vitamin K in combination with other biochemical markers to diagnose osteoporosis.
Biomarkers. 9(6):479-88.

Heshmati H.M., Khosla S. (1998)

Idiopathic osteoporosis: a heterogeneous entity.
Ann Med Interne (Paris). 149(2):77-81.

Hickey L., Gordon C.M., (2004)

Vitamin D deficiency: new perspectives on an old disease.
Endocrinol Diabetes. 11:18-25.

Hodgen G.D., Goodman A.L., O'Connor A., Johnson D.K. (1977)

Menopause in rhesus monkeys: model for study of disorders in the human climacteric.
Am J Obstet Gynecol. 127(6):581-4.

Hodgson S.F., Watts N.B., Bilezikian J.P., Clarke B.L., Gray T.K., Harris D. W., Johnston C.C., Kleerekoper M., Lindsay R., Luckey M.M., McClung M.R., Nankin H.R., Petak S.M., Recker R.R. (2001)

American Association of Clinical Endocrinologists. Medical Guidelines for Clinical Practice for the Prevention and Management of Postmenopausal Osteoporosis.
Endocr Pract. 7(4):293-312.

Hoesel L.M., Wehr U., Rambeck W.A., Schnettler R., Heiss C. (2005)

Biochemical bone markers are useful to monitor fracture repair.
Clin Orthop Relat Res. 440:226-32.

Hofbauer L.C., Gori F., Riggs B.L., Lacey D.L., Dunstan C.R., Spelsberg T.C., Khosla S. (1999)

Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis.
Endocrinology. 140(10):4382-9.

Holbrook T.L., Barrett-Connor E., Wingard D.L. (1988)

Dietary calcium and risk of hip fracture: 14-year prospective population study.
2(8619):1046-9.

Holick M.F. (2004)

Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease.
Am J Clin Nutr. 80(6 Suppl):1678S-88S.

Holick M.F. (2005)

Vitamin D for health and in chronic kidney disease.
Semin Dial. 18(4):266-75.

Holick M.F (2006)

High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health.
Mayo Clin Proc. 81(3):353-73.

Holick M.F., Siris E.S., Binkley N., Beard M.K., Khan A., Katzner J.T., Petruschke R.A., Chen E., de Papp A.E. (2005)

Prevalence of Vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy.
J Clin Endocrinol Metab. 90(6):3215-24.

Hotta M., Fukuda I., Sato K., Hizuka N., Shibasaki T., Takano K. (2000)

The relationship between bone turnover and body weight, serum insulin-like growth factor (IGF) I, and serum IGF-binding protein levels in patients with anorexia nervosa.
J Clin Endocrinol Metab. 85(1):200-6.

Hyun T.H., Barrett-Connor E., Milne D.B. (2004)

Zinc intakes and plasma concentrations in men with osteoporosis: the Rancho Bernardo Study.
Am J Clin Nutr. 80(3):715-21.

Javaid M.K., Cooper C. (2002)

Prenatal and childhood influences on osteoporosis.
Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 16(2):349-67.

Jayo M.J., Jerome C.P., Lees C.J., Rankin S.E., Weaver D.S. (1994)

Bone mass in female cynomolgus macaques: a cross-sectional and longitudinal study by age.
Calcif Tissue Int. 54(3):231-6.

Johnell O., Hertzman P. (2006)

What evidence is there for the prevention and screening of osteoporosis?
WHO Regional Office for Europe, Copenhagen.
(Health Evidence Network report; <http://www.euro.who.int/document/e88668.pdf>).

Johnell O., Oden A., De Laet C., Garnero P., Delmas P.D., Kanis J.A. (2002)

Biochemical indices of bone turnover and the assessment of fracture probability.
Osteoporos Int. 13(7):523-6.

Johnell O., Kanis J.A., Oden A., Sernbo I., Redlund-Johnell I., Petterson C., De Laet C., Jonsson B. (2003)

Mortality after osteoporotic fractures.
Osteoporos Int. 15(1):38-42.

Kamphues J., Schneider D., Leibetseder J. (Hrsg.)(1999)

Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung.
Verlag M.&H. Schaper, Alfeld-Hannover, 9. Auflage. 143 und 194.

Kanis J.A. (1999)

The use of calcium in the management of osteoporosis.
Bone. 24(4):279-90.

Kanis J.A. (2000)

An update on the diagnosis of osteoporosis.
Curr Rheumatol Rep. 2(1):62-6.

Kanis J.A., Gluer C.C. (2000)

An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry.
Committee of Scientific Advisors, International Osteoporosis Foundation.
Osteoporos Int. 11(3):192-202.

Kanis J.A., Johnell O., Oden A., Jonsson B., De Laet C., Dawson A. (2000a)

Risk of hip fracture according to the World Health Organization criteria for osteopenia and osteoporosis.
Bone. 27(5):585-90.

Kanis J.A., Torgerson D., Cooper C. (2000b)

Comparison of the European and USA practice guidelines for Osteoporosis.
Trends Endocrinol Metab. 11(1):28-32.

Kanis J.A., Johansson H., Oden A., Johnell O., de Laet C., Melton III L.J., Tenenhouse

A., Reeve J., Silman A.J., Pols H.A., Eisman J.A., McCloskey E.V., Mellstrom D. (2004a)
A meta-analysis of prior corticosteroid use and fracture risk.
J Bone Miner Res. 19(6):893-9.

Kanis J.A., Johnell O., De Laet C., Johansson H., Oden A., Delmas P., Eisman J., Fujiwara S., Garnero P., Kroger H., McCloskey E.V., Mellstrom D., Melton L.J., Pols H., Reeve J., Silman A., Tenenhouse A. (2004b)

A meta-analysis of previous fracture and subsequent fracture risk.
Bone. 35(2):375-82.

- Kanis J.A., Johnell O., Oden A., de Laet C., Mellstrom D. (2004c)
Epidemiology of osteoporosis and fracture in men.
Calcif Tissue Int. 75(2):90-9.
- Kanis J.A., Borgstrom F., de Laet C., Johansson H., Johnell O., Jonsson B., Oden A., Zethraeus N., Pflieger B., Khaltaev N. (2005a)
Assessment of fracture risk.
Osteoporos Int. 16(6):581-9.
- Kanis J.A., Johansson H., Johnell O., Oden A., De Laet C., Eisman J.A., Pols H., Tenenhouse A. (2005b)
Alcohol intake as a risk factor for fracture.
Osteoporos Int. 16(7):737-42.
- Kanis J.A., Johnell O., Oden A., Johansson H., de Laet C., Eisman J.A., Fujiwara S., Kroger H., McCloskey E.V., Mellstrom D., Melton L.J., Pols H., Reeve J., Silman A., Tenenhouse A. (2005c)
Smoking and fracture risk: a meta-analysis.
Osteoporos Int. 16(2):155-62.
- Kanis J.A., Stevenson M., McCloskey E.V., Davis S., Lloyd-Jones M. (2007)
Glucocorticoid-induced osteoporosis: a systematic review and cost-utility analysis.
Health Technol Assess. 11(7):1-256.
- Kapoor D., Jones T.H. (2005)
Smoking and hormones in health and endocrine disorders.
Eur J Endocrinol. 152(4):491-9.
- Kaptoge S., Welch A., McTaggart A., Mulligan A., Dalzell N., Day N.E., Bingham S., Khaw K.T., Reeve J. (2003)
Effects of dietary nutrients and food groups on bone loss from the proximal femur in men and women in the 7th and 8th decades of age.
Osteoporos Int. 14(5):418-28.
- Kawahara T.N., Krueger D.C., Engelke J.A., Harke J.M., Binkley N.C. (2002)
Short-term vitamin A supplementation does not affect bone turnover in men.
J Nutr. 1169-72.
- Kelly P.J., Pocock N.A., Sambrook P.N., Eisman J.A. (1990)
Dietary calcium, sex hormones, and bone mineral density in men.
BMJ. 300(6736):1361-4.

Kerstetter J.E., Caseria D.M., Mitnick M.E., Ellison A.F., Gay L.F., Liskov T.A., Carpenter T.O., Insogna K.L. (1997)

Increased circulating concentrations of parathyroid hormone in healthy, young women consuming a protein-restricted diet.

Am J Clin Nutr. 66(5):1188-96.

Kerstetter J.E., Looker A.C., Insogna K.L. (2000)

Low dietary protein and low bone density.

Calcif Tissue Int. 66(4):313.

Kerstetter J.E., O'Brien K.O., Insogna K.L. (2003a)

Dietary protein, calcium metabolism, and skeletal homeostasis revisited.

Am J Clin Nutr. 78(3 Suppl):584S-592S.

Kerstetter J.E., O'Brien K.O., Insogna K.L. (2003b)

Low protein intake: the impact on calcium and bone homeostasis in humans.

J Nutr. 133(3):855S-861S.

Kettler D.B. (2001)

Can manipulation of the ratios of essential fatty acids slow the rapid rate of postmenopausal bone loss?

Altern Med Rev. 6(1):61-77.

Khaw K.T., Tazuke S., Barrett-Connor E. (1988)

Cigarette smoking and levels of adrenal androgens in postmenopausal women.

N Engl J Med. 318(26):1705-9.

Khaw K.T., Sneyd M.J., Compston J. (1992)

Bone density parathyroid hormone and 25-hydroxyvitamin D concentrations in middle aged women.

BMJ. 305(6848):273-7.

Khosla S., Lufkin E.G., Hodgson S.F., Fitzpatrick L.A., Melton L.J. III. (1994)

Epidemiology and clinical features of osteoporosis in young individuals.

Bone. 15(5):551-5.

Kimmel D.B. (1996)

Animal models for in vivo experimentation in osteoporosis research.

In: Osteoporosis. Marcus R., Feldman D., Kelsey J. (editors).

Academic Press, San Diego, pp. 671-90.

Klein R.F. (1997)

Alcohol-induced bone disease: impact of ethanol on osteoblast proliferation.
Alcohol Clin Exp Res. 21(3):392-9.

Knoke J.D., Barrett-Connor E. (2003)

Weight loss: a determinant of hip bone loss in older men and women. The Rancho Bernardo Study.
Am J Epidemiol. 158(12):1132-8.

Kraft W., Dürr U.M. (Hrsg.) (1999)

Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.
Schattauer, Stuttgart, 5. Auflage. 255.

Krassas G.E. (2000)

Idiopathic juvenile osteoporosis.
Ann N Y Acad Sci. 900:409-12.

Kruger M.C., Coetzer H., de Winter R., Gericke G., van Papendorp D.H. (1998)

Calcium, gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid supplementation in senile osteoporosis.
Aging (Milano). 10(5):385-94.

Kulkarni M.L., Keshavamurthy K.S. (2004)

Juvenile idiopathic osteoporosis.
Indian Pediatr. 41(7):737-40.

Kurland E.S., Rosen C.J., Cosman F., McMahon D., Chan F., Shane E., Lindsay R., Dempster D., Bilezikian J.P. (1997)

Insulin-like growth factor-I in men with idiopathic osteoporosis.
J Clin Endocrinol Metab. 82(9):2799-805.

Laitinen K., Valimaki M. (1991)

Alcohol and bone.
Calcif Tissue Int. 49 Suppl:S70-3.

Lamichhane A.P. (2005)

Osteoporosis-an update.
JNMA J Nepal Med Assoc. 44(158):60-6.

Lanyon L.E. (1993)

Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling.
Calcif Tissue Int. 1993;53 Suppl 1:S102-6.

- Lee L.L., Lee J.S., Waldman S.D., Casper R.F., Grynblas M.D. (2002)
Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause bone loss in an ovariectomized rat model.
Bone. 30(6):917-23.
- Lerner U.H. (2006)
Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis.
J Dent. Res. 85(7):584-95.
- Leveille S.G., LaCroix A.Z., Koepsell T.D., Beresford S.A., Van Belle G., Buchner D.M. (1997)
Dietary vitamin C and bone mineral density in postmenopausal women in Washington State, USA.
J Epidemiol Community Health. 51(5):479-85.
- Lidgren L. (2003)
The bone and joint decade 2000 – 2010.
Bull World Health Organ. 81(9):629.
- Lill C.A., Fluegel A.K., Schneider E. (2002)
Effect of ovariectomy, malnutrition and glucocorticoid application on bone properties in sheep: a pilot study.
Osteoporos Int. 13(6):480-6.
- Lips P. (2001)
Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications.
Endocr Rev. 22(4):477-501.
- Lips P. (2006)
Vitamin D physiology.
Prog Biophys Mol Biol. 92(1):4-8.
- Liu W., Hellman P., Li Q., Yu W.R., Juhlin C., Nordlinder H., Rollman O., Akerstrom G., Torma H., Melhus H. (1996)
Biosynthesis and function of all-trans- and 9-cis-retinoic acid in parathyroid cells.
Biochem Biophys Res Commun. 229(3):922-9.
- Lloyd T., Johnson-Rollings N., Egli D.F., Kieselhorst K., Mauger E.A., Cusatis D.C. (2000)
Bone status among postmenopausal women with different habitual caffeine intakes: a longitudinal investigation.
J Am Coll Nutr. 19(2):256-61.

Lombardi A., Ross P.D. (2001)

The assessment of bone mass in men.

Calcif Tissue Int. 69(4):222-4.

Lunt M., O'Neill T.W., Felsenberg D., Reeve J., Kanis J.A., Cooper C., Silman A.J.;

European Prospective Osteoporosis Study Group. (2003)

Characteristics of a prevalent vertebral deformity predict subsequent vertebral fracture: results from the European Prospective Osteoporosis - and second-year effects in trials of calcium supplementation on the loss of bone density in postmenopausal women.

Bone. 21(6):527-33.

Mackerras D., Lumley T. (1997)

First- and second-year effects in trials of calcium supplementation on the loss of bone density in postmenopausal women.

Bone. 21(6):527-33.

Mann D.R., Gould K.G., Collins D.C. (1990)

A potential primate model for bone loss resulting from medical oophorectomy or menopause.

J Clin Endocrinol Metab. 71(1):105-10.

Manolagas S.C. (2000a)

Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis.

Endocr Rev. 21(2):115-37.

Manolagas S.C. (2000b)

Corticosteroids and fractures: a close encounter of the third cell kind.

J Bone Miner Res. 15(6):1001-5.

Marshall D., Johnell O., Wedel H. (1996)

Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures.

BMJ. 312(7041):1254-9.

Massey L.K. (1998)

Caffeine and the elderly.

Drugs Aging. 13(1):43-50.

Massey L.K., Whiting (1993)

Caffeine, urinary calcium, calcium metabolism and bone.

J Nutr. 123(9):1611-4.

Melhus H., Michaelsson K., Holmberg L., Wolk A., Ljunghall S. (1999)

Smoking, antioxidant vitamins, and the risk of hip fracture.

J Bone Miner Res. 14(1):129-35.

Melton L.J. III, Chrischilles E.A., Cooper C., Lane A.W., Riggs B.L. (1992)

How many women have osteoporosis? JBMR Anniversary Classic. JBMR, Volume 7, Number 9, 1992.

J Bone Miner Res. 20(5):886-92.

Melton L.J. III, Khosla S., Atkinson E.J., O'Fallon W.M., Riggs B.L. (1997)

Relationship of bone turnover to bone density and fractures.

J Bone Miner Res. 12(7):1083-91.

Mora S., Gilsanz V. (2003)

Establishment of peak bone mass.

Endocrinol Metab Clin North Am. 32(1):39-63.

Morris R.C. Jr, Schmidlin O., Tanaka M., Forman A., Frassetto L., Sebastian A. (1999)

Differing effects of supplemental KCl and KHCO₃: pathophysiological and clinical implications.

Semin Nephrol. 19(5):487-93.

Murphy S., Khaw K.T., Prentice A., Compston J.E. (1993)

Relationships between parathyroid hormone, 25-hydroxyvitamin D, and bone mineral density in elderly men.

Age Ageing. 22(3):198-204.

National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Panel on Osteoporosis (2001)

Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy.

JAMA 285(6):785-95.

National Osteoporosis Foundation (NOF) (2003)

Physician's guide to prevention and treatment of osteoporosis.

Washington, DC; National Osteoporosis Foundation.

Nevitt M.C., Cummings S.R., Stone K.L., Palermo L., Black D.M., Bauer D.C., Genant H.K., Hochberg M.C., Ensrud K.E., Hillier T.A., Cauley J.A. (2005)

Risk factors for a first-incident radiographic vertebral fracture in women \geq 65 years of age: the study of osteoporotic fractures.

J Bone Miner Res. 20(1):131-40.

Newton B.I., Cooper R.C., Gilbert J.A., Johnson R.B., Zardiackas L.D. (2004)

The ovariectomized sheep as a model for human bone loss.

J Comp Pathol. 130(4):323-6.

Newton K.M., LaCroix A.Z., Levy L., Li S.S., Qu P., Potter J.D., Lampe J.W. (2006)

Soy protein and bone mineral density in older men and women: a randomized trial.

Maturitas. 55(3):270-7.

Nieves J.W. (2005)

Osteoporosis: the role of micronutrients.

Am J Clin Nutr. 81(5):1232S-1239.

North American Menopause Society (2002)

Management of postmenopausal osteoporosis: position statement of the North American Menopause Society.

Menopause. 9:84-101

Norton R., Yee T., Rodgers A., Gray H., MacMahon S. (1997)

Regional variation in the incidence of hip fracture in New Zealand.

N Z Med J. 110(1039):78-80.

Ono K., Kaneko H., Choudhary S., Pilbeam C.C., Lorenzo J.A., Akatsu T., Kugai N., Raisz L.G. (2005)

Biphasic effect of prostaglandin E2 on osteoclast formation in spleen cell cultures: role of the EP2 receptor.

J Bone Miner Res. 20(1):23-9.

Orwoll E.S., Klein R.F. (1995)

Osteoporosis in men.

Endocr Rev. 16(1):87-116.

Pacifici R. (1996)

Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis.

J Bone Miner Res. 11(8):1043-51

Palacios C. (2006)

The role of nutrients in bone health, from A to Z.
Crit Rev Food Sci Nutr. 46(8):621-8.

Parkinson I.H., Fazzalari N.L. (2003)

Interrelationships between structural parameters of cancellous bone reveal accelerated structural change at low bone volume.
J Bone Miner Res. 18(12):2200-5.

Pasco J.A., Henry M.J., Wilkinson L.K., Nicholson G.C., Schneider H.G., Kotowicz M.A. (2006)

Antioxidant vitamin supplements and markers of bone turnover in a community sample of nonsmoking women.
J Womens Health (Larchmt). 15(3):295-300.

Pearce G., Ryan P.F., Delmas P.D., Tabensky D.A., Seeman E. (1998a)

The deleterious effects of low-dose corticosteroids on bone density in patients with polymyalgia rheumatica.
Br J Rheumatol. 37(3):292-9.

Pearce G., Tabensky D.A., Delmas P.D., Baker H.W., Seeman E. (1998b)

Corticosteroid-induced bone loss in men.
J Clin Endocrinol Metab. 83(3):801-6.

Peel N.F., Moore D.J., Barrington N.A., Bax D.E., Eastell R. (1995)

Risk of vertebral fracture and relationship to bone mineral density in steroid treated rheumatoid arthritis.
Ann Rheum Dis. 54(10):801-6.

Penniston K.L., Tanumihardjo S.A. (2006)

The acute and chronic toxic effects of vitamin A.
Am J Clin Nutr. 83(2):191-201.

Pfeifer M., Begerow B., Minne H.W. (2002)

Vitamin D and muscle function.
Osteoporos Int. 13(3):187-94.

Plaza S.M., Lamson D.W. (2005)

Vitamin K₂ in bone metabolism and osteoporosis.
Altern Med Rev. 10(1):24-35.

Pludowski P., Lebedowski M., Olszaniecka M., Marowska J., Matusik H., Lorenc R.S. (2006)

Idiopathic juvenile osteoporosis--an analysis of the muscle-bone relationship. *Osteoporos Int.* 17(11):1681-90.

Priemel M., Münch C., Beil F.T., Ritzel H., Amling M. (2006)

Pathophysiologie und Pathomorphologie der Osteoporose. (Pathophysiology and pathomorphology of osteoporosis.) *Radiologe.* 46(10):831-8.

Raisz L.G., Niemann I. (1969)

Effect of phosphate, calcium and magnesium on bone resorption and hormonal responses in tissue culture. *Endocrinology.* 85(3):446-52.

Ralston S.H. (2005)

Genetic determinants of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol.* 17(4):475-9.

Ralston S.H., de Crombrughe B. (2006)

Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes Dev.* 20(18):2492-506.

Rapuri P.B., Gallagher J.C., Haynatzka V. (2003)

Protein intake: effects on bone mineral density and the rate of bone loss in elderly women. *Am J Clin Nutr.* 77(6):1517-25.

Rapuri P.B., Gallagher J.C., Nawaz Z. (2007)

Caffeine decreases vitamin D receptor protein expression and 1,25(OH)(2)D(3) stimulated alkaline phosphatase activity in human osteoblast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 103(3-5):368-71.

Rauch F., Travers R., Norman M.E., Taylor A., Parfitt A.M., Glorieux F.H. (2002)

The bone formation defect in idiopathic juvenile osteoporosis is surface-specific. *Bone.* 31(1):85-9.

Reed B.Y., Zerwekh J.E., Sakhaee K., Breslau N.A., Gottschalk F., Pak C.Y. (1995)

Serum IGF 1 is low and correlated with osteoblastic surface in idiopathic osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 10(8):1218-24.

Reginster J.Y. (2005)

The high prevalence of inadequate serum vitamin D levels and implications for bone health.

Curr Med Res Opin. 21(4):579-86.

Reid I.R., Ames R.W., Evans M.C., Gamble G.D., Sharpe S.J. (1993)

Effect of calcium supplementation on bone loss in postmenopausal women.

N Engl J Med. 328(7):460-4.

Reid I.R., Ames R.W., Evans M.C., Gamble G.D., Sharpe S.J. (1995)

Long-term effects of calcium supplementation on bone loss and fractures in postmenopausal women: a randomized controlled trial.

Am J Med. 98(4):331-5.

Relea P., Revilla M., Ripoll E., Arribas I., Villa L.F., Rico H.. (1995)

Zinc, biochemical markers of nutrition, and type I osteoporosis.

Age Ageing. 24(4):303-7.

Riggs B.L., Melton L.J. III (1986)

Involutional osteoporosis.

N Engl J Med. 314(26):1676-86.

Riggs B.L., Khosla S., Melton L.J. III (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.

J Bone Miner Res. 13(5):763-73.

Riggs B.L., Khosla S., Melton L.J. III (2002)

Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton.

Endocr Rev. 23(3):279-302.

Riis B.J.(1995)

The role of bone loss.

Am J Med. 98(2A):29S-32S.

Riis B., Thomsen K., Christiansen C. (1987)

Does calcium supplementation prevent postmenopausal bone loss? A double-blind, controlled clinical study.

N Engl J Med. 316(4):173-7.

- Rizzoli R., Bonjour J.P. (1999)
Unterernährung und Osteoporose.
(Malnutrition and osteoporosis)
Z Gerontol Geriatr. 32 Suppl 1:131-7.
- Rodgers J.B., Monier-Faugere M.C., Malluche H. (1993)
Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function.
Bone. 14(3):369-77.
- Rogers A., Hannon R.A., Eastell R. (2000)
Biochemical markers as predictors of rates of bone loss after menopause.
J Bone Miner Res. 15(7):1398-404.
- Rohde C.M., DeLuca H. (2003)
Bone resorption activity of all-trans retinoic acid is independent of vitamin D in rats.
J Nutr. 133(3):777-83.
- Rosen C.J., Kurland E.S., Vereault D., Adler R.A., Rackoff P.J., Craig W.Y., Witte S.,
Rogers J., Bilezikian J.P. (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.
J Clin Endocrinol Metab. 83(7):2286-90.
- Ross P.D., Genant H.K., Davis J.W., Miller P.D., Wasnich R.D. (1993)
Predicting vertebral fracture incidence from prevalent fractures and bone density
among non-black, osteoporotic women.
Osteoporos Int. 3(3):120-6.
- Rubin M.R., Schussheim D.H., Kulak C.A., Kurland E.S., Rosen C.J., Bilezikian J.P., Shane
E. (2005)
Idiopathic osteoporosis in premenopausal women.
Osteoporos Int. 16(5):526-33.
- Rude R.K., Kirchen M.E., Gruber H.E., Stasky A.A., Meyer M.H. (1998)
Magnesium deficiency induces bone loss in the rat.
Miner Electrolyte Metab. 24(5):314-20.
- Sakaguchi K., Morita I., Murota S. (1994)
Eicosapentaenoic acid inhibits bone loss due to ovariectomy in rats.
Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 50(2):81-4.

- Salvini S., Stampfer M.J., Barbieri R.L., Hennekens C.H. (1992)
Effects of age, smoking and vitamins on plasma DHEAS levels: a cross-sectional study in men.
J Clin Endocrinol Metab. 74(1):139-43.
- Sambrook P., Cooper C. (2006)
Osteoporosis.
Lancet. 367(9527):2010-8.
- Sampson H.W. (1997)
Alcohol, osteoporosis, and bone regulating hormones.
Alcohol Clin Exp Res. 21(3):400-3.
- Schwartz G.G., Whitlatch L.W., Chen T.C., Lokeshwar B.L., Holick M.F. (1998)
Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D3 from 25-hydroxyvitamin D3.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 7(5):391-5.
- Schwartz A.V., Kelsey J.L., Maggi S., Tuttleman M., Ho S.C., Jonsson P.V., Poor G., Sisson de Castro J.A., Xu L., Matkin C.C., Nelson L.M., Heyse S.P. (1999)
International variation in the incidence of hip fractures: cross-national project on osteoporosis for the World Health Organization Program for Research on Aging.
Osteoporos Int. 9(3):242-53.
- Seelig M.S., Altura B.M., Altura B.T. (2004)
Benefits and risks of sex hormone replacement in postmenopausal women.
J Am Coll Nutr. 23(5):482S-496S.
- Seeman E. (1993)
Osteoporosis in men: epidemiology, pathophysiology, and treatment possibilities.
Am J Med. 95(5A):22S-28S.
- Seeman E. (1999)
The structural basis of bone fragility in men.
Bone. 25(1):143-7.
- Seeman E. (2003a)
Bone quality.
Osteoporos Int. 14 Suppl 5:3-7.
- Seeman E. (2003b)
Invited Review: Pathogenesis of osteoporosis.
J Appl Physiol. 95(5):2142-51.

Seeman E. (2004)

Estrogen, androgen, and the pathogenesis of bone fragility in women and men.
Curr Osteoporos Rep. 2(3):90-6.

Seeman E., Bianchi G., Khosla S., Kanis J.A., Orwoll E. (2006)

Bone fragility in men - where are we?
Osteoporos Int. 17(11):1577-83.

Seibel M.J. (2005)

Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability.
Clin Biochem Rev. 26(4):97-122.

Seibel M.J. (2006a)

Biochemical Markers of Bone Turnover Part II: Clinical Applications in the
Management of Osteoporosis.
Clin Biochem Rev. 27(3):123-38.

Seibel M.J. (2006b)

Clinical application of biochemical markers of bone turnover.
Arg Bras Endocrinol Metabol. 50(4):603-20.

Seibel M.J., Woitge H.W. (1999)

Basic principles and clinical applications of biochemical markers of bone
metabolism: biochemical and technical aspects.
J Clin Densitom. 2(3):299-321.

Sellmeyer D.E., Stone K.L., Sebastian A., Cummings S.R. (2001)

A high ratio of dietary animal to vegetable protein increases the rate of bone loss
and the risk of fracture in postmenopausal women. Study of Osteoporotic Fractures
Research Group.
Am J Clin Nutr. 73(1):118-22.

Setchell K.D., Lydeking-Olsen E. (2003)

Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo,
human observational, and dietary intervention studies.
Am J Clin Nutr. 78(3 Suppl):593S-609S.

Shen V., Dempster D.W., Birchman R., Mellish R.W., Church E., Kohn D., Lindsay R.
(1992)

Lack of changes in histomorphometric, bone mass, and biochemical parameters in
ovariohysterectomized dogs.
Bone. 13(4):311-6.

Smith R. (1995)

Idiopathic juvenile osteoporosis: experience of twenty-one patients.
Br J Rheumatol. 34(1):68-77.

Souberbielle J.C., Friedlander G., Kahan A., Cormier C. (2006)

Evaluating vitamin D status. Implications for preventing and managing osteoporosis and other chronic diseases.
Joint Bone Spine. 73(3):249-53.

Spencer G.R. (1979)

Pregnancy and lactational osteoporosis. Animal model: porcine lactational osteoporosis.
Am J Pathol. 95(1):277-80.

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.
Curr Med Res Opin. 21(7):1015-26.

Sun L., Peng Y., Sharrow A.C., Iqbal J., Zhang Z., Papachristou D.J., Zaidi S., Zhu L.L., Yaroslavskiy B.B., Zhou H., Zallone A., Sairam M.R., Kumar T.R., Bo W., Braun J., Cardoso-Landa L., Schaffler M.B., Moonga B.S., Blair H.C., Zaidi M. (2006)
FSH directly regulates bone mass.
Cell 125(2):247-260.

Suzawa T., Miyaura C., Inada M., Maruyama T., Sugimoto Y., Ushikubi F., Ichikawa A., Narumiya S., Suda T. (2000)

The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs.
Endocrinology. 141(4):1554-9.

Szulc P., Chapuy M.C., Meunier P.J., Delmas P.D. (1996)

Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture: a three year follow-up study.
Bone. 18(5):487-8.

Szulc P., Hofbauer L.C., Heufelder A.E., Roth S., Delmas P.D. (2001a)

Osteoprotegerin serum levels in men: correlation with age, estrogen, and testosterone status.
J Clin Endocrinol Metab. 86(7):3162-5.

Szulc P., Munoz F., Claustrat B., Garnero P., Marchand F., Duboeuf F., Delmas P.D. (2001b)

Bioavailable estradiol may be an important determinant of osteoporosis in men: the MINOS study.

J Clin Endocrinol Metab. 86(1):192-9.

Takata S., Yasui N. (2001)

Disuse osteoporosis.

J Med Invest. 48(3-4):147-56.

Takeda E., Yamamoto H., Nashiki K., Sato T., Arai H., Taketani Y. (2004)

Inorganic phosphate homeostasis and the role of dietary phosphorus.

J Cell Mol Med. 8(2):191-200.

Tangpricha V., Pearce E.N., Chen T.C., Holick M.F. (2002)

Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults.

Am J Med. 112(8):659-62.

Tanko L.B., Christiansen C. (2004)

An update on the antiestrogenic effect of smoking: a literature review with implications for researchers and practitioners.

Menopause. 11(1):104-9.

The EPOS Study Group (2002)

Incidence of vertebral fracture in Europe: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS).

J Bone Miner Res, 17:716-24.

Thissen J.P., Ketelslegers J.M., Underwood L.E. (1994)

Nutritional regulation of the insulin-like growth factors.

Endocr Rev. 15(1):80-101.

Thomas M.K., Demay M.B. (2000)

Vitamin D deficiency and disorders of vitamin D metabolism.

Endocrinol Metab Clin North Am. 29(3):611-27.

Thomas M.K., Lloyd-Jones D.M., Thadhani R.I., Shaw A.C., Deraska D.J., Kitch B.T.,

Vamvakas E.C., Dick I.M., Prince R.L., Finkelstein J.S. (1998)

Hypovitaminosis D in medical inpatients.

N Engl J Med. 338(12):777-83.

Thompson D.D., Simmons H.A., Pirie C.M., Ke H.Z. (1995)
FDA Guidelines and animal models for osteoporosis.
Bone. 17(4 Suppl):125S-133S.

Toba Y., Kajita Y., Masuyama R., Takada Y., Suzuki K., Aoe S. (2000)
Dietary magnesium supplementation affects bone metabolism and dynamic strength of bone in ovariectomized rats.
J Nutr. 130(2):216-20.

Tucker K.L. (2003)
Dietary intake and bone status with aging.
Curr Pharm Des. 9(32):2687-704.

Tucker K.L., Hannan M.T., Chen H., Cupples L.A., Wilson P.W., Kiel D.P. (1999)
Potassium, magnesium, and fruit and vegetable intakes are associated with greater bone mineral density in elderly men and women.
Am J Clin Nutr. 69(4):727-36.

Tucker K.L., Morita K., Qiao N., Hannan M.T., Cupples L.A., Kiel DP. (2006)
Colas, but not other carbonated beverages, are associated with low bone mineral density in older women: The Framingham Osteoporosis Study.
Am J Clin Nutr. 84(4):936-42.

Turner R.T. (2000)
Skeletal response to alcohol.
Alcohol Clin Exp Res. 24(11):1693-701.

Turner A.S. (2001)
Animal models of osteoporosis--necessity and limitations.
Eur Cell Mater. 1:66-81.

Turner A.S. (2002)
The sheep as a model for osteoporosis in humans.
VetJ. 163(3):232-9.

Turner A.S., Alvis M., Myers W., Stevens M.L., Lundy M.W. (1995)
Changes in bone mineral density and bone-specific alkaline phosphatase in ovariectomized ewes.
Bone. 17(4 Suppl):395S-402S.

- Tylavsky F.A., Anderson J.J., Talmage R.V., Taft T.N. (1992)
Are calcium intakes and physical activity patterns during adolescence related to radial bone mass of white college-age females?
Osteoporos Int. 2(5):232-40.
- Uusi-Rasi K., Sievanen H., Pasanen M., Oja P., Vuori I. (2001)
Maintenance of body weight, physical activity and calcium intake helps preserve bone mass in elderly women.
Osteoporos Int. 12(5):373-9.
- Uusi-Rasi K., Sievanen H., Pasanen M., Oja P., Vuori I. (2002)
Association of physical activity and calcium intake with the maintenance of bone mass in premenopausal women.
Osteoporos Int. 13(3):211-7.
- Van der Klift M., de Laet C.E., McCloskey E.V., Johnell O., Kanis J.A., Hofman A., Pols H.A. (2004)
Risk factors for incident vertebral fractures in men and women: the Rotterdam Study.
J Bone Miner Res. 19(7):1172-80.
- Van Meurs J.B., Dhonukshe-Rutten R.A., Pluijm S.M., van der Klift M., de Jonge R., Lindemans J., de Groot L.C., Hofman A., Witteman J.C., van Leeuwen J.P., Breteler M.M., Lips P., Pols H.A., Uitterlinden A.G. (2004)
Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture.
N Engl J Med. 350(20):2033-41.
- Van Staa T.P. (2006)
The pathogenesis, epidemiology and management of glucocorticoid-induced osteoporosis.
Calcif Tissue Int. 79(3):129-37.
- Van Staa T.P., Leufkens H.G., Abenhaim L., Zhang B., Cooper C. (2000)
Use of oral corticosteroids and risk of fractures.
J Bone Miner Res. 15(6):993-1000.
- Van Staa T.P., Leufkens H.G., Cooper C. (2002)
The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis.
Osteoporos Int. 13(10):777-87.

Van Staa T.P., Geusens P., Pols H.A., de Laet C., Leufkens H.G., Cooper C. (2005)
A simple score for estimating the long-term risk of fracture in patients using oral glucocorticoids.

OJM. 98(3):191-8.

Vestergaard P., Rejnmark L., Mosekilde L. (2005)

Fracture risk associated with systemic and topical corticosteroids.

J Intern Med. 257(4):374-84.

Warburton D.E., Nicol C.W., Bredin S.S. (2006)

Health benefits of physical activity: the evidence.

CMAJ. 174(6):801-9.

Weitzmann M.N., Pacifici R. (2006a)

Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale.

J Clin Invest. 116(5):1186-94.

Weitzmann MN, Pacifici R. (2006b)

Estrogen regulation of immune cell bone interactions.

Ann N Y Acad Sci. 1068:256-74.

Welten D.C., Kemper H.C., Post G.B., van Staveren W.A. (1995)

A meta-analysis of the effect of calcium intake on bone mass in young and middle aged females and males.

J Nutr. 125(11):2802-13.

WHO Scientific Group on the Prevention and Management of Osteoporosis (2003)

Prevention and management of osteoporosis.

World Health Organ Tech Rep Ser. 921:1-164.

Writing Group for the ISCD Position Development Conference. (2004)

Diagnosis of osteoporosis in men, premenopausal women, and children.

J Clin Densitom. 7(1):17-26.

Wronski T.J., Yen C-F. (1991)

The ovariectomized rat as an animal model for postmenopausal bone loss.

Eur Cell Mater Suppl. 1:69-74.

Wronski T.J., Dann L.M., Scott K.S., Cintron M. (1989)

Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton.

Calcif Tissue Int. 45(6):360-6.

Yamagishi T., Otsuka E., Hagiwara H. (2001)

Reciprocal control of expression of mRNAs for osteoclast differentiation factor and OPG in osteogenic stromal cells by genistein: evidence for the involvement of topoisomerase II in osteoclastogenesis.

Endocrinology. 142(8):3632-7.

Yamaguchi M. (1998)

Role of zinc in bone formation and bone resorption.

J Trace Elem Exp Med. 11:119-35.

Yamaguchi M., Gao Y.H. (1998)

Anabolic effect of genistein and genistin on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissues of elderly rats: the genistein effect is enhanced by zinc.

Mol Cell Biochem. 178(1-2):377-82.

Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M., Mochizuki S., Tomoyasu A., Yano K., Goto M., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K., Udagawa N., Takahashi N., Suda T. (1998)

Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL.

Proc Natl Acad Sci U S A. 95(7):3597-602.

Zhang J., Munger R.G., West N.A., Cutler D.R., Wengreen H.J., Corcoran C.D. (2006)

Antioxidant intake and risk of osteoporotic hip fracture in Utah: an effect modified by smoking status.

Am J Epidemiol. 163(1):9-17.

Zofkova I. (2003)

Pathophysiological and clinical importance of insulin-like growth factor-I with respect to bone metabolism.

Physiol Res. 52(6):657-79.

9 Anhang

9.1 Abbildungen

Abbildung 1: Osteoporosedefinition anhand des T-Scores gemäß der WHO	3
Abbildung 2: Darstellung von T-Score und Z-Score am Beispiel einer 62 jährigen Frau modifiziert nach Writing Group for the ISCD 2004.....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung pathophysiologischer Zusammenhänge bei Vitamin D-Mangel und unzureichender Calciumaufnahme modifiziert nach Reginster 2005.	24
Abbildung 4: Vereinfachte und schematisierte Darstellung des Versuches.....	58
Abbildung 5: Änderung der Steroiddosierung und -form während des Versuchs	62
Abbildung 6: Umsetzung von p-Nitrophenylphosphat durch die alkalische Phosphatase	66
Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Calcium im Serum innerhalb der beiden Gruppen.	108
Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Calcium im Urin (mmol/l) bezogen auf Creatinin (mmol/l) innerhalb der beiden Gruppen.	109
Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der alkalischen Phosphatase innerhalb der beiden Gruppen.....	110
Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase innerhalb der beiden Gruppen.....	112
Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Pyridinolin innerhalb der beiden Gruppen.	114
Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Desoxypyridinolin innerhalb der beiden Gruppen.	114

9.2 Tabellen

Tabelle 1: Übersicht über derzeit messbare Marker der Knochenformation, modifiziert nach Seibel 2005.....	9
Tabelle 2: Übersicht über derzeit messbare Marker der Knochenresorption, modifiziert nach Seibel 2005.....	10
Tabelle 3: Risikofaktoren, die die Entstehung von Osteoporose und das Auftreten osteoporotischer Frakturen begünstigen	13
Tabelle 4: Idiopathische Osteoporoseformen: Klassifikation nach pathogenetischen Kriterien.....	40
Tabelle 5: Auswahl verschiedener Medikamente sowie Erkrankungen und Stoffwechselstörungen, die eine sekundäre Osteoporose induzieren können.....	48
Tabelle 6: Versuchstierdaten und Operationszeitpunkte.....	57
Tabelle 7: Calcium-, Phosphor- und Vitamin D-Bedarf (Kamphues et al. 1999) im Vergleich zur zugeführten Menge	60
Tabelle 8: Zusammensetzung des Diätfutters 8277 der Fa. EBERLE NAFAG	61
Tabelle 9: In Serum bzw. Urin bestimmte Parameter des Knochenstoffwechsels.....	65
Tabelle 10: Für die Bestimmung der alkalischen Phosphatase und knochen-spezifischen alkalischen Phosphatase verwendete Reagenzien, Materialien und Apparate	68
Tabelle 11: Reagenzien, Materialien und Apparate für die Bestimmung der Collagen-Crosslinks im Urin	69
Tabelle 12: Chromatographische Parameter	71
Tabelle 13: Reagenzien, Material und Apparate zum Nachweis von Creatinin im Urin	73
Tabelle 14: Anzahl der Tiere der Versuchs- und der Kontrollgruppe sowie Alter und Körpergewicht zu Versuchsbeginn.....	74

- Tabelle 15: Durchschnittliche Konzentrationen ($\bar{x} \pm s_x$) der alkalischen Phosphatase (AP) (U/l) im Serum bei den ovariectomierten Tieren und den Tieren der Kontrollgruppe präoperativ sowie 1, 2, 4, 10, 14, 20 und 40 Tage nach der Tibiaosteotomie..... 76
- Tabelle 16: Durchschnittliche Konzentrationen ($\bar{x} \pm s_x$) der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase (bAP) (U/l) im Serum bei den ovariectomierten Tieren und den Tieren der Kontrollgruppe präoperativ sowie 1, 2, 4, 10, 14, 20 und 40 Tage nach der Tibiaosteotomie..... 78
- Tabelle 17: Durchschnittliche Konzentrationen ($\bar{x} \pm s_x$) an Pyridinolin (PYD) im Urin (nmol/l) bezogen auf Creatinin im Urin (mmol/l) bei den ovariectomierten Tieren und den Tieren der Kontrollgruppe zu Beginn der Studie, 1 Tag vor und 1, 2, 4, 10, 14, 20 und 40 Tage nach Tibiaosteotomie..... 80
- Tabelle 18: Durchschnittliche Konzentrationen ($\bar{x} \pm s_x$) an Desoxypyridinolin (DPD) im Urin (nmol/l) bezogen auf Creatinin im Urin (mmol/l) bei den ovariectomierten Tieren und den Tieren der Kontrollgruppe zu Beginn der Studie sowie 1 Tag vor und 1, 2, 4, 10, 14, 20 und 40 Tage nach Tibiaosteotomie..... 82
- Tabelle 19: Durchschnittliche Konzentrationen ($\bar{x} \pm s_x$) an Calcium (mmol/l) im Urin bezogen auf Creatinin (mmol/l) im Urin bei den ovariectomierten Tieren und den Tieren der Kontrollgruppe zu Beginn der Studie sowie 1 Tag vor und 1, 2, 4, 10, 14, 20 und 40 Tage nach Tibiaosteotomie 84
- Tabelle 20: Durchschnittliche Konzentrationen ($\bar{x} \pm s_x$) an Calcium (mmol/l) im Serum bei den ovariectomierten Tieren und den Tieren der Kontrollgruppe präoperativ sowie 1, 2, 4, 10, 14, 20 und 40 Tage nach Tibiaosteotomie..... 86
- Tabelle 21: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker im Urin bei den ovariectomierten Tieren zu Beginn der Studie..... 87
- Tabelle 22: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker im Urin bei den ovariectomierten Tieren 1 d ante operationem 88

Tabelle 23: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker im Serum bei den ovarektomierten Tieren zum Zeitpunkt „präoperativ“	88
Tabelle 24: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den ovarektomierten Tieren 1 d post operationem	89
Tabelle 25: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den ovarektomierten Tieren 2 d post operationem	90
Tabelle 26: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den ovarektomierten Tieren 4 d post operationem	91
Tabelle 27: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den ovarektomierten Tieren 10 d post operationem	91
Tabelle 28: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den ovarektomierten Tieren 14 d post operationem	92
Tabelle 29: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den ovarektomierten Tieren 20 d post operationem	93
Tabelle 30: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den ovarektomierten Tieren 40 d post operationem	94
Tabelle 31: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker im Urin bei den Tieren der Kontrollgruppe zu Beginn der Studie.....	95
Tabelle 32: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker im Urin bei den Tieren der Kontrollgruppe 1 d ante operationem	95
Tabelle 33: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker im Serum bei den Tieren der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt „präoperativ“	96
Tabelle 34: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den Tieren der Kontrollgruppe 1 d post operationem.....	97
Tabelle 35: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den Tieren der Kontrollgruppe 2 d post operationem.....	97
Tabelle 36: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den Tieren der Kontrollgruppe 4 d post operationem	98

Tabelle 37: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den Tieren der Kontrollgruppe 10 d post operationem.....	99
Tabelle 38: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den Tieren der Kontrollgruppe 14 d post operationem.....	99
Tabelle 39: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den Tieren der Kontrollgruppe 20 d post operationem.....	100
Tabelle 40: Korrelationen der biochemischen Knochenmarker bei den Tieren der Kontrollgruppe 40 d post operationem.....	101

9.3 Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
bAP	Knochenspezifische alkalische Phosphatase
BMD	Bone mineral density
BMI	Body mass index
BMU	Basic multicellular unit
BSP	Bone Sialoprotein
Ca	Calcium
COX	Cyclooxygenase
Crea	Creatinin
CT	Computertomographie
CTX-1	Carboxyterminales quervernetztes Telopeptid des Typ-1-Collagens
DBP	Vitamin-D-Bindungsprotein
DHA	Docosahexaensäure
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DPD	Desoxypyridinolin
DVO	Dachverband Osteologie
DXA	Dual energy x-ray absorptiometry
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPA	Eicosapentaensäure
EPOS	European Prospective Osteoporosis Study
ER	Östrogenrezeptor
FDA	Food and Drug Administration
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GLA	γ -Linolensäure
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
HFBA	Hepta-Fluor-Buttersäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

iAP	Intestinale alkalische Phosphatase
ICPT	Carboxyterminales quervernetztes Telozeptid des Typ I Collagen
ID-Nr.	Identifikationsnummer
IE	Internationale Einheiten
IGF	Insulin like growth factor
IL	Interleukin
IOF	International Osteoporosis Foundation
ISCD	International Society for Clinical Densitometry
IU	International Units
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KM	Körpermasse
LBM	Lean body mass
LM	Lebendmasse
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NHANES III	Third National Health and Nutrition Examination Survey
NIH	National Institutes of Health
NOF	National Osteoporosis Foundation
n.s.	Nicht signifikant
NTX-1	Aminoterminales quervernetztes Telozeptid des Typ-1-Collagens
OC	Osteocalcin
OPG	Osteoprotegrin
OVX	Ovarektomiert
P	Phosphor
p	Signifikanzwert
PAH	Polyzyklisches aromatisches Hydrocarbon
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PICP	Carboxyterminales Propeptid des Typ I Procollagen
PINP	Aminoterminales Propeptid des Typ I Procollagen
pQCT	Periphere quantitative Computertomographie
PRAL	Potential renal acid loads
PTH	Parathormon
PYD	Pyridinolin

qCT	Quantitative Computertomographie
RANK	Receptor Activator of NF-kappa B
RANKL	Receptor Activator of NF-kappa B-ligand
RP-HPLC	Ionenpaar-Reversed-Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
SAS	Statistical analysis system
SD	Standardabweichung
SERMs	Selektive Östrogenrezeptormodulatoren
s _x	Standardabweichung
tALP	Gesamtalkalische Phosphatase
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAcP	Tartratresistente saure Phosphatase
T-Score	Abweichung eines mittels DXA an Lendenwirbelsäule und/oder proximalem Femur gemessenen Wertes der durchschnittlichen Knochendichte gesunder Frauen im Alter von 30 Jahren, angegeben in Standardabweichungen
U	Unit, Einheit
U/l	Units pro Liter
uOC	Untercarboxyliertes Osteocalcin
uS	Ursprüngliche Substanz
VDR-Gen	Vitamin-D-Rezeptor-Gen
WHO	World Health Organisation
\bar{x}	Mittelwert
Z – Score	Abweichung eines mittels DXA an Lendenwirbelsäule und/oder proximalem Femur gemessenen Wertes der durchschnittlichen Knochendichte gleichaltriger Personen, angegeben in Standardabweichungen

10 Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. W. A. Rambeck danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas und das in mich gesetzte Vertrauen sowie für die stetige Ermutigung, die überaus freundliche Betreuung und große Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ulrich Wehr für die immer freundliche und kompetente Unterstützung und sein überaus großes Engagement insbesondere in der „Endphase“ der Anfertigung dieser Arbeit.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung danke ich Herrn Professor Dr. Osterkorn und Herrn Dr. Stanglmeier.

Frau Wetzel, Frau Kleiner und Herrn Hesselbach danke ich für die zuvorkommende und kompetente Hilfe während der Laborarbeiten und für ihr Interesse.

Meinen wunderbaren Freunden danke ich für die stetige Ermutigung und Unterstützung, insbesondere Frau Eva Döhla, Frau Dr. Nina Gerhardt-Metzger, Frau Dr. Sonja Hartnack, Herrn Peter Heeren, Familie Dr. Reinhold Schmid, Herrn Ulfried Ullstrand, Frau Dr. Sigrid Vogl und vor allem Frau Annette Lein.

Ganz herzlich danke ich meinen Eltern für die immerwährende Unterstützung während des Studiums, der Doktorandenzeit und der ersten Berufsjahre.

Mein inniger Dank gilt meinem Mann und meiner Tochter, ohne deren Rücksichtnahme und Kooperationsbereitschaft die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.