

Aus dem Institut für
Physiologie, physiologische Chemie und Tierernährung
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Geschäftsführender Vorstand:
Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. W. A. Rambeck

**Der Einfluss von Phytoöstrogenen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren,
Vitamin D und K auf den Knochenstoffwechsel
und die Mikroarchitektur des Knochens:
Untersuchungen am intakten und ovariohysterektomierten Beagle**

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

von
Susanne Kern
aus München

München 2004

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Prof. Dr. W. Rambeck

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. H. Eisgruber

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht.....	3
2.1. Skelettsystem von Hund und Mensch	3
2.1.1. Gesunder Knochen	3
2.1.1.1. Aufbau.....	3
2.1.1.2. Bestandteile des Knochens.....	4
2.1.1.3. Knochenstoffwechsel (Formation und Resorption)	5
2.1.2. Krankheiten des Knochens bei Hund und Mensch.....	6
2.1.2.1. Angeborene Krankheiten	6
2.1.2.1.1. Aseptische Nekrose des Femurkopfes	6
2.1.2.1.2. Osteogenesis imperfecta	11
2.1.2.1.3. Osteopetrose	13
2.1.2.2. Erworbene Krankheiten.....	14
2.1.2.2.1. Osteomalazie	14
2.1.2.2.2. Rachitis	14
2.1.2.2.3. Osteodystrophia fibrosa generalisata.....	16
2.1.2.2.4. Osteodystrophia deformans (Paget Krankheit) und craniomandibuläre Osteopathie	18
2.1.2.2.5. Panostitis	20
2.1.2.2.6. Entzündungen und Frakturen	21
2.1.2.3. Osteoporotische Veränderungen	21
2.1.2.3.1. Definition Osteoporose	21
2.1.2.3.2. Ursachen und Einteilung.....	22
2.1.2.3.3. Möglichkeiten der Prophylaxe und Therapie.....	23
2.1.3. Möglichkeiten der Diagnostik von Knochenerkrankungen.....	40
2.1.3.1. Biochemische Parameter des Knochenstoffwechsels.....	40
2.1.3.1.1. Biochemische Marker der Knochenformation	42
2.1.3.1.2. Biochemische Marker der Resorption	44
2.1.3.2. Bildgebende Verfahren	48
2.1.3.2.1. Röntgenaufnahmen	48
2.1.3.2.2. Osteodensitometrie.....	48

2.2.	Hunde als Tiermodell für die Osteoporoseforschung	51
3.	Material und Methoden.....	57
3.1.	Versuchstiere und Versuchstierhaltung	57
3.2.	Versuchsfutter	58
3.3.	Energiegehalt und -zuteilung.....	59
3.4.	Versuchsgruppen	62
3.5.	Kapseln	63
3.6.	Versuchsaufbau	64
3.7.	Narkose und Operationsmethode.....	65
3.7.1.	Narkose.....	65
3.7.2.	Ovariohysterektomie	66
3.7.3.	Entnahme der Knochenbiopsien	66
3.7.4.	Postoperative Versorgung.....	68
3.8.	Serum- und Uringewinnung.....	68
3.9.	Bestimmung der Parameter des Knochenstoffwechsels	69
3.9.1.	Bestimmung der Urinparameter	69
3.9.1.1.	Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Deoxypyridinolin	69
3.9.1.2.	Calcium	72
3.9.1.3.	Creatinin.....	72
3.9.2.	Bestimmung der knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase aus dem Serum	72
3.10.	Biochemische Analysen der Knochenbiopsien	73
3.11.	Analyse der Knochenbiopsien durch Mikrocomputer-tomographie.....	73
3.12.	Statistische Auswertung	75
4.	Ergebnisse	76
4.1.	Versuchsaufbau im zeitlichen Ablauf.....	76
4.2.	Allgemeinbefinden und Gewichtsentwicklung.....	76
4.3.	Collagen-Crosslinks im Urin	78
4.4.	Calciumausscheidung im Urin	81
4.5.	Knochenspezifische Alkalische Phosphatase im Serum	82
4.6.	Biochemische Analyse der Knochenbiopsien.....	83
4.7.	Mikrocomputertomographische Analyse der Knochenbiopsien.....	85
4.8.	Korrelationen	87

5. Diskussion	90
5.1. Aufbau und Durchführung des Versuchs.....	90
5.2. Wahl des Tiermodells ovariohysterektomierter Beagle	91
5.3. Gewichtsentwicklung der Tiere.....	92
5.4. Ovariohysterektomie und Entnahme der Knochenbiopsien.....	93
5.5. Bestimmung der Knochenmarker	94
5.6. Calciumausscheidung im Urin	102
5.7. Analyse der Knochenbiopsien	104
5.7.1. Biochemische Analyse	104
5.7.2. Analyse mit Mikrocomputertomographie	105
5.8. Einfluss der Wirkstoffe auf den Knochenstoffwechsel	108
6. Zusammenfassung	111
7. Summary	113
8. Literaturverzeichnis	115
9. Danksagung	143
10. Lebenslauf	145

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Therapiemöglichkeiten bei Morbus Perthes.....	9
Tabelle 2: Therapiemöglichkeiten Osteonekrose.....	11
Tabelle 3: Osteoporosestadien.....	22
Tabelle 4: Einteilung der Osteoporoseformen	23
Tabelle 5: Möglichkeiten der Therapie und Prävention von Osteoporose	24
Tabelle 6: Marker des Knochenstoffwechsels	41
Tabelle 7: Alter zu Beginn des Versuchs (in Monaten), Gruppeneinteilung und durchschnittliche Gewichte der Hunde (MW ± Stabw) während des Versuchs (in kg).....	57
Tabelle 8: Nährstoffgehalte des Versuchsfutters nach institutseigener Weender Analyse	58
Tabelle 9: Mineralstoff- und Spurenelementgehalte und Vitamine des Futters nach institutseigener Analyse (pro kg Futter)	59
Tabelle 10: Berechneter Energiegehalt des Futters (in MJ/100g).....	60
Tabelle 11: Energie- und Futterzuteilung der einzelnen Hunde (MW ± Stabw)	61
Tabelle 12: Mittlere Körpergewichte (MW ± Stabw) in kg der Hunde aus Kontrollgruppe (n=6) und Wirkstoffgruppe (n=6) während des gesamten Versuchszeitraumes über 36 Wochen	77
Tabelle 13: Mittlere Konzentrationen von Pyridinolin (MW ± Stabw) in nmol/mmol Creatinin im Urin der Hunde der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) während des gesamten Versuchszeitraumes.....	79
Tabelle 14: Mittlere Konzentrationen von Deoxypyridinolin (MW ± Stabw) in nmol/mmol Creatinin im Urin der Hunde der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) während des gesamten Versuchszeitraumes.....	80
Tabelle 15: Mittlere Calciumkonzentrationen (MW ± Stabw) in mmol/l bezogen auf Creatininkonzentration in mmol/l im Urin der Hunde der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) während des gesamten Versuchszeitraumes	81
Tabelle 16: Mittlere Konzentrationen der knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase (MW ± Stabw) in U/l im Serum der Hunde der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) während des gesamten Versuchszeitraumes	82

Tabelle 17: Mittlerer Aschegehalt in den Knochenbiopsien der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) in % der Trockensubstanz vor und nach OHX.....	83
Tabelle 18: Mittlerer Calciumgehalt (MW \pm Stabw) in g/kg Knochen TS in den getrockneten Knochenbiopsien der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) vor und nach OHX.....	84
Tabelle 19: Mittlerer Calciumgehalt (MW \pm Stabw) in g/kg Knochenasche in den veraschten Knochenbiopsien der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) vor und nach OHX.....	84
Tabelle 20: Mittlerer Anteil des Knochenvolumens (BV) am Gesamtvolumen (TV) der Knochenbiopsien (MW \pm Stabw) der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) vor und nach OHX.....	85
Tabelle 21: Mittlerer Anteil der Knochenoberfläche (BS) am Knochenvolumen (BV) der Knochenbiopsien (MW \pm Stabw) in mm ² /mm ³ der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) vor und nach OHX	85
Tabelle 22: Mittlere Anzahl der Trabekel (TbN) in 1/mm, mittlere Dicke der Trabekel (TbTh) in mm und mittlerer Abstand der Trabekel (TbSp) in mm in den Knochenbiopsien der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) vor und nach OHX.....	86
Tabelle 23: Korrelationen zwischen knochenspezifischer Alkalischer Phosphatase (bALP), Calcium im Urin (Ca), Pyridinolin (Pyd) und Deoxypyridinolin (Dpd) in der Kontrollgruppe während des gesamten Versuchszeit raumes (R; p).....	88
Tabelle 24: Korrelationen zwischen knochenspezifischer Alkalischer Phosphatase (bALP), Calcium im Urin (Ca), Pyridinolin (Pyd) und Deoxypyridinolin (Dpd) in der Wirkstoffgruppe während des gesamten Versuchszeit raumes (R; p).....	89

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln von Genistein, Daidzein und Östradiol	25
Abbildung 2: Strukturformeln von Vitamin D ₂ und Vitamin D ₃	31
Abbildung 3: Strukturformeln von Vitamin K ₁ , K ₂ und K ₃	35
Abbildung 4: Strukturformeln einiger Fettsäuren	38
Abbildung 5: Entnahme der Knochenbiopsie aus dem Ilium.....	67
Abbildung 6: Knochenbiopate nach Extraktion	67
Abbildung 7: Mikro-CT-Aufnahmen der Knochenbiopsien	87
Abbildung 8: Gewichtsentwicklung der Hunde während des Versuchs	93
Abbildung 9: Ausscheidung von Pyridinolin im Urin während des gesamten Versuchs in nmol/mmol Creatinin	97
Abbildung 10: Ausscheidung von Deoxypyridinolin im Urin während des gesamten Versuchs in nmol/mmol Creatinin	97
Abbildung 11: Knochenspezifische Alkalische Phosphatase im Serum der Hunde in U/l während des Versuchs	99
Abbildung 12: Calciumausscheidung im Urin während des Versuchs	103
Abbildung 13: Dreidimensionales Bild einer Mikro-CT Auswertung.....	107

Abkürzungsverzeichnis

ALA	Alpha-Linolensäure
ALP	gesamtalkalische Phosphatase
bALP	knochenspezifische Alkalische Phosphatase
BGP	bone Gla Protein
BMC	bone mineral content, Knochenmineralgehalt
BMD	bone mineral density, Knochendichte
BS	bone surface, endostale Oberfläche
BV	bone volume, Knochenvolumen
Ca	Calcium
cALP	corticosteroidinduzierte ALP
cm	Zentimeter
Crea	Creatinin
CT	Computertomographie
CTx	carboxyterminales Telopeptid des Typ 1 Collagens
Cu	Kupfer
d	Tag
DE	verdauliche Energie
DEXA	dual energy X-ray absorptiometry
DHA	Docosahexaensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dpd	Deoxypyridinolin
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EPA	Eicosapentaensäure
Fe	Eisen
g	Gramm
GE	Bruttoenergie
Gla	Gamma-Carboxyglutamat-
Glu	Glutanyl-
h	Stunde
HFBA	Heptafluorbuttersäure
HPLC	high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

i.v.	intravenös
ICTP	quervernetztes carboxyterminales Telopeptid des Typ 1 Collagens
IE	Internationale Einheit
IL	Interleukin
IU	International Unit
K	Kalium
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
KM ^{0,75}	metabolische Körpermasse
l	Liter
LA	Linolsäure
ME	umsetzbare Energie
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MGP	Matrix Gla Protein
min	Minute
MJ	Megajoule
MK	Menaquinon
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
Mn	Mangan
MW	arithmetischer Mittelwert
n	Anzahl
Na	Natrium
NaOH	Natronlauge
NfE	N-freie Extraktstoffe
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NTx	aminoternales Telopeptid des Typ 1 Collagens
OC	Osteocalcin
OHX	Ovariohysterektomie
OVX	Ovariectomie

P	Phosphor
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.o.	per os
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PICP	carboxyterminales Endstück des Procollagen Typ 1
PINP	aminoternales Endstück des Procollagen Typ 1
pQCT	periphere quantitative Computertomographie
PTH	Parathormon
PUFA	polyunsaturated fatty acid, mehrfach ungesättigte Fettsäure
Pyd	Pyridinolin
QCT	quantitative Computertomographie
R	Pearsonscher Korrelationskoeffizient
Ra	Rohasche
Rfa	Rohfaser
Rfe	Rohfett
RIA	Radioimmunoassay
Rp	Rohprotein
s.c.	subkutan
SD	standard deviation
SMI	structure model index
Stabw	Standardabweichung
sV	scheinbare Verdaulichkeit
TbN	trabecular number, Anzahl der Trabekel
TbSp	trabecular separation, Abstand der Trabekel
TbTh	trabecular thickness, Durchmesser der Trabekel
TRAP	tartratresistente saure Phosphatase
TS	Trockensubstanz
TV	total volume, Gesamtvolumen
U/l	Units (Einheiten) pro Liter
U/min	Umdrehungen pro Minute
ucOC	untercarboxyliertes Osteocalcin
uS	ursprüngliche Substanz
WHO	World Health Organisation
Zn	Zink

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

1. Einleitung

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die charakterisiert ist durch niedrige Knochenmasse, sowie eine Beeinträchtigung der Mikroarchitektur des Knochengewebes mit daraus folgender, erhöhter Knochenbrüchigkeit und erhöhtem Frakturrisiko (Consensus development conference, 1993).

Jedes Jahr werden in der EU über 380 000 Patienten mit Hüftfraktur und über 96 000 Patienten mit Wirbelfrakturen in Kliniken behandelt. Die Kosten belaufen sich dabei auf insgesamt über vier Milliarden Euro (Finnern und Sykes, 2003). Aufgrund einer steigenden Lebenserwartung und wegen der zunehmenden Inzidenz von osteoporotischen Frakturen mit dem Alter, wird die Osteoporose in Zukunft noch weiter an Bedeutung gewinnen (Ismail et al., 2002).

Das klinische Bild der Osteoporose ist dabei geprägt von Knochenbrüchen an Wirbelsäule, Oberschenkelhals und Unterarm. Das Auftreten von Frakturen bedeutet für die Patienten erheblichen Leidensdruck, Funktionseinschränkungen und massive Einbußen an Lebensqualität, sowie oft menschliche Isolation.

Für die Therapie und Prävention der Osteoporose gibt es bis heute, trotz jahrzehntelanger Forschung, nur unbefriedigende medizinische Möglichkeiten. Die Hormonersatztherapie, die lange als Mittel der Wahl galt, ist mit nicht unbedenklichen Risiken behaftet. Jüngst hat das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte beschlossen, dass Hormonpräparate für Wechseljahrsbeschwerden mit einem deutlichen Hinweis auf die Risiken der Therapie versehen werden müssen. Eine Studie in den USA wurde drei Jahre vor Versuchsende abgebrochen, da Nebenwirkungen wie Schlaganfall (Wassertheil-Smoller et al., 2003), Herzinfarkt (Manson und Hsia, 2003) und Brustkrebs (Chlebowsky et al., 2003) deutlich zugenommen hatten. Auch in Großbritannien wurde in einer aktuellen Studie bei einer Kombinationstherapie mit Östrogenen und Gestagenen ein erhöhtes Brustkrebsrisiko festgestellt (Million Women Study Colloberators, 2003).

Daher ist die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten der Osteoporose sowohl von wissenschaftlichem, als auch von sozialem und gesundheitspolitischem Interesse.

Eine, in diesem Zusammenhang in den Blickpunkt des Interesses gerückte Substanzgruppe, sind die Phytoöstrogene. Sie weisen strukturelle Ähnlichkeiten zu im menschlichen Organismus vorhandenem Östrogen auf und können dadurch ihre

östrogenartige Wirkung am Knochen und anderen Organen entfalten. Der erst 1996 entdeckte Östrogenrezeptor beta scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen, da Phytoöstrogene mit hoher Affinität an diesen Rezeptor binden. Dabei können sie ihre knochenprotektive Wirkung offenbar ohne die negativen Folgen der Östrogene (z.B. Erhöhung des Brustkrebsrisikos) ausüben.

Auch den mehrfach ungesättigten Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) wird eine regulatorische Wirkung auf Knochen- und Calciummetabolismus zugeschrieben. Sie können die Calciumabsorption im Darm erhöhen, die Calciumexkretion im Urin senken, sowie über lokale Faktoren Einfluss auf den Knochen ausüben.

Eine Kombination mit den knochenwirksamen Vitaminen D und K kann dabei einen zusätzlichen positiven Effekt auf den Knochen bewirken. Vitamin D bewirkt eine Steigerung der intestinalen Calciumabsorption, sowie eine Hemmung der Knochenresorption. Vitamin K ist am Knochen für die Hydroxylierung von verschiedenen Proteinen notwendig, die dadurch in der Lage sind Calcium zu binden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die knochenprotektiven Effekte einer Kombination der Wirkstoffe Genistein, ungesättigte Fettsäuren sowie Vitamin D und K erstmals am Osteoporosemodell „Ovariectomierte Beagle“ zu untersuchen. Die Kombination der einzelnen Wirkstoffe wurde dabei aus früheren Untersuchungen übernommen, bei denen verschiedene Dosierungen der Wirksubstanzen an ovariectomierten Ratten untersucht wurden (Krammer, 2001).

Die Beurteilung der Wirkung auf den Knochenstoffwechsel sollte über Knochenmarker erfolgen, wobei für die Formation die knochenspezifische Alkalische Phosphatase im Serum gemessen wurde, für die Resorption die Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Deoxypyridinolin, sowie Calcium im Urin. Die Entnahme von Knochenbiopsien zum Zeitpunkt der Ovariectomie sowie am Ende des Versuchs und deren Vermessung mittels Mikrocomputertomographie sollten genauere Aussagen über die Mikroarchitektur des Knochens liefern. Die Operationen wurden im Rahmen einer interdisziplinären Zusammenarbeit mit dem Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München durchgeführt, die mikrocomputertomographischen Messungen in Zusammenarbeit mit dem Anatomischen Institut der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

2. Literaturübersicht

2.1. Skelettsystem von Hund und Mensch

2.1.1. Gesunder Knochen

2.1.1.1. Aufbau

Knochen besteht aus dem außen liegenden Knochenmantel (Substantia compacta, Compacta), bzw. an den Knochenenden aus der Knochenrinde (Substantia corticalis, Corticalis) und dem inneren, trabekulären oder spongiösen Gewebe (Substantia spongiosa, Spongiosa).

Die Compacta und die Corticalis verleihen dem Knochen aufgrund ihrer lamellenartigen Struktur hohe Widerstandskraft gegen Druck-, Zug- und Scherkräfte. Sie übernehmen auch den größten Teil der Stützfunktion des Skelettes.

Die Spongiosa besteht aus einem feinverzweigten Netzwerk aus Knochenbälkchen, -blättchen, und -röhrchen. In ihr befinden sich das Knochenmark, sowie Fettgewebe und Gefäße.

Der Knochen wird von der Knochenhaut (Periost) überzogen. Diese besteht aus einer derbfibrösen, äußeren Schicht (Fibrosa) und der inneren, locker gefügten Schicht (Cambium), die reich an Gefäßen und sensiblen Nerven ist.

Histologisch unterscheidet man Geflechtknochen und Lamellenknochen. Geflechtknochen entsteht während der embryonalen Phase und bei Knochenzubildungen aus lose gepackten Collagenfibrillen. Er wird später von lamellärem Knochen ersetzt und kommt im gesunden, adulten Skelett fast nicht mehr vor. Lamellenknochen besteht aus parallel angeordneten Collagenlamellen. Die Osteone, die strukturelle Einheit des lamellären Knochens, bestehen aus einem Kanal (Haversschen Kanal), der Gefäße und Nervenzellen enthält, und aus konzentrisch um diesen Kanal angeordneten Knochenlamellen. Sie sind parallel zur Längsachse des Knochens ausgerichtet. Die durch Kittlinien (sogenannte „cement

lines“) getrennten Osteone stehen über Volkmannsche Kanäle, die quer zu den Knochenlamellen verlaufen, miteinander und mit dem Periost in Verbindung. Bei der Ratte sind allerdings im Gegensatz zu Mensch und Hund keine Haversschen Kanäle vorhanden.

Auch im trabekulären Knochen bestehen die Knochenbälkchen aus Osteonen, die unregelmäßig angeordnet sind und keine Gefäße enthalten. Die Versorgung geschieht über Canaliculi ossei von der Oberfläche aus.

2.1.1.2. Bestandteile des Knochens

Knochengewebe setzt sich aus Zellen und Interzellulärsubstanz zusammen. Die Interzellulärsubstanz kann wiederum in organische und anorganische Matrix unterteilt werden.

Die organische Matrix besteht zu 90% aus Typ 1 Collagen, das über Disulfidbrücken und Quervernetzungen, sogenannte Crosslinks, dreidimensional vernetzt ist. Etwa 10% sind nichtcollagene Proteine wie Osteocalcin, Osteonectin und Bone Sialoprotein.

Die anorganische Matrix besteht größtenteils aus Calcium und Phosphor. In der Verbindung Calciumhydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ist es in Form von Kristallen, in Nadel-, Plättchen- oder Stäbchenform im Knochen angeordnet. Diese befinden sich zwischen oder innerhalb der Collagenfibrillen. 99% des Calciums des Körpers sind hier gespeichert, weitere Bestandteile sind Carbonate, Citrate, Magnesium, Natrium, Fluor und Strontium.

Zu den Knochenzellen gehören die Knochenvorläuferzellen, die aus mesenchymalen Stammzellen entstehen. Aus ihnen entwickeln sich die Osteoblasten, die die Knochenmatrix synthetisieren. Sie bilden eine glykoproteidreiche Grundsubstanz, das Osteoid, das anschließend extrazellulär calcifiziert wird. Die Osteoblasten werden, wenn sie von der mineralisierten Matrix eingeschlossen werden, zu Osteozyten. Aus den Osteoblasten können sich auch endostale Belegzellen (sogenannte „lining cells“) bilden, die als flache längliche Zellen die endostalen Knochenoberflächen, die sich nicht im Umbau befinden, bedecken.

Die Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die aus einer Monozytenpopulation hervorgehen. Sie sind für die Resorption von Knochenmatrix verantwortlich.

2.1.1.3. Knochenstoffwechsel (Formation und Resorption)

Knochenaufbau (Formation) erfolgt durch Differenzierung von Fibroblasten und Mesenchymzellen zu Osteoblasten. Diese sondern Osteoid ab, das nachfolgend mineralisiert wird. Werden die Osteoblasten in die mineralisierte Matrix eingebaut, so werden sie zu Osteozyten.

Bei der desmalen Ossifikation entstehen aus den Vorgängerzellen direkt Osteoblasten. Bei der chondralen Ossifikation entstehen erst Chondroblasten, dann Osteoblasten. Dabei werden durch die Chondroblasten knorpelige Vorstufen gebildet, die durch Chondroklasten abgebaut und durch Knochen ersetzt werden. Dies spielt bei wachsenden Tieren eine Rolle, da die Knochen ihre Funktion bereits erfüllen, aber in Länge und Dicke noch zunehmen. Die chondrale Ossifikation findet hier vor allem in Wachstumszonen statt.

Der Knochenabbau (Resorption) wird durch die Osteoklasten durchgeführt. Durch die Produktion und Sekretion von Wasserstoffionen, freien Radikalen und lysosomalen Enzymen wird die mineralisierte Matrix aufgelöst und von den Osteoklasten abtransportiert. Nachfolgend wird die organische Matrix abgebaut. Es entstehen Resorptionslakunen (sogenannte Howshipsche Lakunen).

Durch das Zusammenspiel von Formation und Resorption kann Knochen lebenslang ersetzt und umgebaut werden. Im Wachstum wird dies als Modeling bezeichnet, wobei vor allem ein formender Knochenaufbau stattfindet, beim ausgewachsenen Tier findet ein Remodeling, ein ständiger Umbau des Knochengewebes statt. Dies geht sowohl vom Haversschen System aus, als auch von den periostalen und endostalen Oberflächen. Spongiöser Knochen kann daher aufgrund der größeren Oberfläche schneller umgebaut werden als kompakter. Bei der Ratte findet allerdings aufgrund fehlender Haversscher Gefäße kein intracorticales Remodeling statt. Außerdem zeigt die Ratte, im Gegensatz zum Menschen eine lebenslange Modeling Aktivität.

Die Regulation des Knochenstoffwechsels erfolgt durch Hormone und lokale Faktoren. Parathormon (PTH) wird bei einem Absinken des Calciumspiegels im Blut verstärkt in der Nebenschilddrüse (Epithelkörperchen) gebildet und sezerniert. Es

steigert die Knochenresorption über lokale Zellsignale der Osteoblasten, die wiederum die Osteoklasten aktivieren und setzt so Calcium und Phosphat frei. Außerdem steigert es die renale, tubuläre Reabsorption, sowie die intestinale Absorption von Calcium. Auch 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ steigert die intestinale Calciumabsorption und die Rückresorption von Calcium in der Niere. Es unterliegt, wie auch das Parathormon, einem negativen „Feedback“ Mechanismus. Calcitonin aus den C-Zellen der Schilddrüse wird bei einer Erhöhung des Calciumspiegels freigesetzt. Es hemmt direkt die Aktivität der Osteoklasten und steigert so den Einbau von Calcium in den Knochen. Auch Insulin, Wachstumshormone und Östrogene sind an der Regulation des Knochenstoffwechsels beteiligt. Lokal produzierte Faktoren, die meist von den Osteoblasten stammen, spielen ebenfalls eine Rolle. Eicosanoide, wie Prostaglandine und Leukotriene, Wachstumsfaktoren und Cytokine können einen lokalen Einfluss auf den Knochen ausüben (Raisz, 1999).

2.1.2. Krankheiten des Knochens bei Hund und Mensch

2.1.2.1. Angeborene Krankheiten

2.1.2.1.1. Aseptische Nekrose des Femurkopfes

Bei den aseptischen oder auch ischämischen Knochennekrosen handelt es sich um abakterielle, lokal begrenzte Nekroseareale, die in verschiedenen Knochen entstehen können. Da der Femurkopf, so lange der Epiphysenfugenknorpel besteht, hauptsächlich über die Gefäße der Gelenkkapsel versorgt wird, kann es bei Störungen der Blutversorgung zur aseptischen Nekrose des Femurkopfes kommen.

Die idiopathische Osteonekrose des Hüftgelenkes im frühkindlichen Alter wurde schon 1910 von Legg, Calve und Perthes unabhängig voneinander beschrieben (Calve, 1910; Legg, 1910; Perthes, 1910).

Beim Menschen wird diese Krankheit im Wesentlichen bei Kindern im Alter von drei bis zwölf Jahren angetroffen, wobei Jungen wesentlich häufiger erkranken als Mädchen (Krauspe und Raab, 1997). Meist ist nur eine Körperseite von der Krankheit betroffen.

Die Ätiologie ist immer noch ungeklärt, ursächlich wird jedoch eine vaskuläre Insuffizienz angenommen, die in Folge einer hypoplastischen Gefäßanlage auftreten kann. Auch erhöhter intraossärer Druck durch venöse Abflussbehinderung in Folge einer Thrombophilie wird als Ursache diskutiert. Ein direkter Zusammenhang zwischen Morbus Perthes und Thrombophilie konnte jedoch nicht gezeigt werden (Hresko et al., 2002). Liu und Ho (1991) konnten bei Patienten mit Morbus Perthes auch im frühen Stadium der Krankheit erhöhten intraossären Druck aufgrund venöser Abflussstörungen nachweisen. Außerdem konnten sie durch Obstruktion des venösen Abflusses im Femurkopf von Hunden eine aseptische Nekrose auslösen und so ein Tiermodell entwickeln. Auch eine verzögerte Skelettreifung kann eine Rolle spielen, wobei die verzögert ossifizierte Epiphyse instabil ist und das Gewicht nicht tragen kann. Bei Morbus Perthes in aktiven Stadien fanden Vila-Verde und da Silva (2001) bei 93% der Patienten eine verzögerte Knochenreifung. Durch den Zusammenbruch der Epiphyse kann es dann zur vaskulären Okklusion kommen (Kitoh et al., 2003).

Zu Beginn der Erkrankung kommt es zum Knochenmarksödem, nachfolgend zum Absterben von Fett- und Knochenzellen im Epiphysenkern des Femurkopfes (Initialstadium).

Daraus folgt eine Verlangsamung und schließlich ein Sistieren der enchondralen Ossifikation des Femurkopfes mit Ausnahme des Gelenkknorpels, der über Diffusion ernährt wird und meist überschießend weiterwächst. Es kommt zur Nekrose des Femurkopfes und zur Ablagerung von neugebildetem Faserknochen auf den nekrotischen Knochen trabekeln (Kondensationsphase).

Durch die Umbauvorgänge und das überschießende Knorpelwachstum erfolgt eine laterale Subluxation des Femurkopfes. Während des Umbaus kann es zu Frakturen und zur Resorption von Trabekeln kommen (Fragmentationsphase).

Im Reparationsstadium kommt es dann zur Ossifikation der Epiphyse und der Remodellierung des Hüftkopfes.

Die Einteilung je nach Ausmaß der Erkrankung, bzw. radiologisch erkennbaren Kriterien ist allerdings nicht einheitlich. Catterall (1971) klassifiziert unterschiedliche Schweregrade je nach Ausmaß der Nekrose. Salter und Thompson (1984) orientieren sich an der Ausdehnung der subchondralen Frakturlinie und dem Ausmaß

der darunter liegenden Knochenresorption. Herring et al. (1992) teilen den Hüftkopf in drei Säulen und berücksichtigen besonders die radiologischen Veränderungen der lateralen Säule.

Ziel der Therapie ist es immer eine Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung der Zentrierung des Femurkopfes („containment“) zu erreichen und damit präarthrotische Deformierungen und sekundäre Coxarthrose zu vermeiden (Krauspe und Raab, 1997). Der Erfolg der Therapie wird dabei im Wesentlichen vom Alter zu Beginn der Erkrankung, sowie vom Ausmaß der Nekrose beeinflusst (Roposch et al., 2003). Eine operative Therapie muss dabei in erster Linie dem Femurkopf eine Heilung unter optimalen Bedingungen ermöglichen, da bei Kindern ein funktionierender Reparaturmechanismus vorhanden ist (Hubbard und Dormans, 1995).

Bei Hunden sind vor allem kleinwüchsige Junghunde, meist Zwergrassen oder Terrier betroffen. Hier ist keine geschlechtsgebundene Häufung zu beobachten (Lee und Fry, 1969). Beim Hund wird eine genetische Disposition mit autosomal rezessivem Erbgang (Pidduck und Webbon, 1978) oder multifaktorieller Vererbung in Betracht gezogen (Vasseur et al., 1989). Die Krankheit tritt im Alter von drei bis dreizehn Monaten auf, meist zwischen dem fünften und achten Lebensmonat (Lee und Fry, 1969).

Auch beim Hund konnte die Ätiologie noch nicht geklärt werden, daher kann trotz vieler Ähnlichkeiten nicht davon ausgegangen werden, dass es sich um identische Krankheitsbilder handelt (Mickelson et al., 1981). Allerdings ist die Pathogenese der Erkrankung beim Hund der des Menschen sehr ähnlich.

Therapeutisch wird beim Hund meist eine Resektion von Femurkopf und –hals vorgenommen.

**Tabelle 1: Therapiemöglichkeiten bei Morbus Perthes
(nach Krauspe und Raab, 1997)**

Therapiemöglichkeiten beim Menschen	
Frühstadium mit Schmerz, Bewegungseinschränkung und intraartikulärem Erguss	Konservative Therapie <ul style="list-style-type: none"> • Analgetisch-antiphlogistische Medikamente • Kurzfristige Bettruhe • Krankengymnastik
Kleine Nekrose, Epiphyse bis maximal 50% betroffen	Konservative Therapie <ul style="list-style-type: none"> • Bewegungstherapie • Klinische und röntgenologische Kontrollen
Kinder > 3 Jahre, ohne Schmerzen und Erguss, Nekrose der Epiphyse >50%	Konservative Therapie <ul style="list-style-type: none"> • Schienenbehandlung mit verschiedenen Beuge-Abduktionsschienen
Erkrankungsbeginn > 4 Jahre Nekrose der Epiphyse > 50% Lateralisation des Hüftkopfes	Operative Therapie: <ul style="list-style-type: none"> • Varisierende, derotierende Umstellungsosteotomie des Femurs • Beckenosteotomie nach Salter • Kombination von Becken- und Femurosteotomie • Dreifach-Beckenosteotomie nach Tönnis • Valgisationsosteotomie • „salvage procedures“ zur Minimierung von Spätfolgen
Therapiemöglichkeiten beim Hund	
Minimale klinische und radiologische Erscheinungen	Konservative Therapie <ul style="list-style-type: none"> • Ruhe und Analgetika
Lahmheit und Veränderungen im Röntgenbild	Operative Therapie <ul style="list-style-type: none"> • Resektion des Femurkopfes und -halses

Auch bei Erwachsenen kann eine Osteonekrose des Hüftgelenkes beobachtet werden. Neben der posttraumatischen Osteonekrose, bei der es durch Fraktur, Luxation oder Prellung zur Ischämie der versorgenden Hüftkopfgefäße kommt, ist bei der nichttraumatischen Osteonekrose die Pathophysiologie nicht eindeutig geklärt. Es wird aber wiederum eine Insuffizienz der Gefäßversorgung über die Arteria circumflexa femoris medialis angenommen. Durch Permeabilitätsstörungen und Stauung der Gefäße kommt es zum Knochenmarködem. Der daraus folgende erhöhte intraossäre Druck drosselt die Gefäßversorgung weiter.

Die Krankheit wird an Hand ihrer Pathophysiologie und Klinik von der internationalen Association Circulation Osseus in fünf Stadien eingeteilt (Mont und Hungerford, 1995).

Im Initialstadium sind nur histologische Veränderungen, wie kleine Marknekrosen, erkennbar. In diesem Stadium ist die Krankheit meist asymptomatisch und noch reversibel. Im reversiblen Frühstadium beginnt die Nekrose, die sich vor allem lateral ausbreitet. Das folgende, irreversible Frühstadium ist gekennzeichnet von Arealen vermehrter Knochenneubildung neben Bereichen osteoklastischer Resorption, vor allem im subchondralen Knochen. Kommt es zu einer subchondralen Fraktur des Femurkopfes, so ist das Übergangsstadium erreicht. Durch Einbrüche und Zusammensintern kommt es zur Abflachung und Entrundung des Femurkopfes. Bei Fortschreiten der Erkrankung beginnen sekundärarthrotische Veränderungen, die auch das Acetabulum mit einbeziehen; nun ist das Spätstadium erreicht.

Auch bei der Osteonekrose im Erwachsenenalter sind häufiger männliche als weibliche Patienten betroffen, bei 30 bis 70% tritt die Erkrankung beidseitig auf (Hofmann et al., 2002).

Die Therapie der Osteonekrosen ist ein noch ungelöstes Problem. Nur in den reversiblen Frühstadien kann eine konservative Therapie erfolgreich sein (Lavernia et al., 1999). Da jedoch bei einer manifesten Osteonekrose keine Therapie die Nekroseareale zum Abheilen bringen kann, stellen alle Therapiemöglichkeiten nur einen Zeitgewinn bis zum Einsetzen eines künstlichen Hüftgelenkes dar.

**Tabelle 2: Therapiemöglichkeiten Osteonekrose
(nach Dotti et al., 2002)**

Konservative Therapie	Operative Therapie
<ul style="list-style-type: none"> • Mechanische Entlastung • Magnetfeldtherapie • Stoßwellenbehandlung • Verschiedene Medikamente 	<ul style="list-style-type: none"> • Entlastungsbohrung • Umstellungsosteotomie • Knochentransplantate • Gefäßgestielte Transplantate • Gelenkersatz

2.1.2.1.2. Osteogenesis imperfecta

Die Osteogenesis imperfecta, im Deutschen auch Glasknochenkrankheit genannt, ist eine erbliche Bindegewebserkrankung, die zu vermehrter Knochenbrüchigkeit führt.

Collagen Typ 1, das im Knochengewebe zu etwa 30 bis 35% enthalten ist, besteht aus drei Polypeptidsträngen (sogenannte alpha-Ketten, davon zwei alpha 1-Ketten und eine alpha 2-Kette), die in Tripelhelixform angeordnet sind. Aufgrund von Genmutationen des COL1A1- oder des COL1A2-Gens, kommt es zu einer verminderten Synthese von normalem Typ 1 Collagen oder zur Synthese von strukturell verändertem Collagen oder beidem. Auch durch Mutationen der beteiligten Enzyme können fehlerhafte Collagenfibrillen entstehen. Die Mutationen werden je nach Verlaufsform autosomal dominant, autosomal rezessiv oder genetisch heterogen vererbt.

Sekundär zu den Veränderungen in der Collagensynthese sind Störungen in der Mineralisation vorhanden (Tortolani et al., 2002). Außerdem spielen auch eine erhöhte Knochenresorption, sowie eine reduzierte Formationsrate eine Rolle (Brenner, 1994). Bei normaler Knorpelentwicklung erfolgt eine unzureichende Knochenentwicklung. Auch Bindegewebsknochen und das periostale Appositionswachstum bleiben im Wachstum zurück. Folgen sind erhöhte Knochenbrüchigkeit, Skelettdeformierungen und multiple Callusbildungen.

Beim Menschen wird die Osteogenesis imperfecta in vier Formen eingeteilt (Sillence et al., 1979).

Typ 1 ist die häufigste und mildeste Form und wird autosomal dominant weitervererbt. Sie ist gekennzeichnet durch leichte Osteopenie und Knochenfragilität. Meist sind blaue Skleren vorhanden, häufig auch Dentinogenesis imperfecta und Schwerhörigkeit.

Typ 2 ist die schwerste Form der Osteogenesis imperfecta. Meist werden die Kinder mit multiplen Frakturen tot geboren oder sterben innerhalb der ersten Lebensstage aufgrund Lungeninsuffizienz.

Typ 3 ist bei Kindern, die die perinatale Phase überleben, die schwerste Form. Knochenfragilität und Osteopenie sind schwer und progressiv. Es kommt zu multiplen Frakturen, Deformationen und Verbiegungen der langen Röhrenknochen, außerdem zu einer deutlichen Wachstumsverzögerung. Ein Drittel der Patienten überlebt bis zum Erwachsenenalter, zwei Drittel sterben an cardiorespiratorischen Komplikationen und pulmonaler Hypertension. Diese Form wird autosomal rezessiv vererbt.

Typ 4 ist gekennzeichnet durch leichte bis mäßige Knochenfragilität und Osteopenie und daraus folgender Knochendeformierung, sowie kleiner Statur. Die Skleren sind bei der Geburt weiß, hellblau oder grau, normalisieren sich bis zum Erwachsenenalter. Auch Dentinogenesis imperfecta kann vorhanden sein.

Erst vor kurzem wurden auch andere Formen der Osteogenesis imperfecta beschrieben, die als Typ 5 und 6 bezeichnet werden (Glourieux et al., 2002). Bei diesen Formen wurden keine Mutationen der Gene COL1A1 bzw. COL1A2 und auch keine Veränderungen im Typ 1 Collagen gefunden.

Als Therapie können Bisphosphonate den klinischen Verlauf meist verbessern (Cole, 2002). Außerdem müssen die vorhandenen Frakturen meist chirurgisch versorgt werden, wobei die Immobilisationsphase kürzer als bei Gesunden sein sollte, um die erhöhte Resorptionsrate nicht noch zusätzlich zu verstärken. In jüngster Zeit wird auch die Therapie mit Stammzellen versucht (Oreffo und Triffitt, 1999).

Auch beim Hund konnten Mutationen des COL1A1-, wie auch des COL1A2-Gens als Ursache für Osteogenesis imperfecta identifiziert werden (Campbell et al., 2000; Campbell et al., 2001). Es wurde von Fällen berichtet, die der Osteogenesis imperfecta Typ 3 und Typ 4 entsprechen (Campbell et al., 1997).

Beim Hund werden nur in leichten Fällen die Frakturen versorgt. Bei multiplen oder wiederholten Knochenbrüchen wird meist eine Euthanasie vorgenommen.

2.1.2.1.3. Osteopetrose

Bei der Osteopetrose oder Osteosclerosis congenita diffusa handelt es sich um eine angeborene Störung der Ossifikation. Durch Insuffizienz oder Fehlen von Osteoklasten bei erhaltener Knochenformation fehlt der modellierende Ab- und Umbau von Knochen besonders im Bereich der Spongiosa (Marks, 1982). Die primäre Spongiosa bleibt erhalten und bildet verdichtete Herde oder füllt diffus die Markräume aus. Dies kann bis zu einer aplastischen Anämie führen. Durch Verzögerung der endostalen Resorption kommt es außerdem zu einer Verdickung des corticalen Knochens. Da den Knochen Elastizität fehlt, werden sie brüchig und neigen zu Frakturen.

Beim Menschen wird diese Krankheit auch Marmorknochenkrankheit genannt, da die Knochen im Röntgenbild sehr dicht erscheinen, obwohl sie zu Frakturen neigen.

Es werden zwei Formen unterschieden: Die maligne Form wird autosomal rezessiv vererbt, ist von schweren klinischen Symptomen gekennzeichnet und führt häufig zu einem frühen Tod (Brown und Dent, 1971). Bei dieser Form können Mutationen der Protonenpumpe der Osteoklasten oder auch der Carboanhydrase an der Krankheit beteiligt sein (De Vernejoul und Benichou, 2001). Die zweite, autosomal dominant vererbte Form (Albers-Schönberg-Krankheit) verläuft häufig asymptomatisch. Selten treten Spontanfrakturen, geringgradige Anämie oder Lähmungen der Gesichtsnerven auf (Senel et al., 2002). Sie stellt eine benigne Form der Krankheit dar, die keinen Einfluss auf die Lebenserwartung des Patienten hat. Es wurden wiederum verschiedene Typen der benignen Form beschrieben, die sich in biochemischen und klinischen Parametern unterscheiden (Stoker, 2002). Dies spricht dafür, dass die Knochenresorption und die Funktion der Osteoklasten auf verschiedenen Stufen beeinträchtigt sein kann (Bollerslev und Andersen, 1988). Die Gene, die für die autosomal dominant vererbte Form verantwortlich sind, wurden jedoch noch nicht identifiziert (Vernejoul und Benichou, 2001).

Die einzige Therapiemöglichkeit für die maligne Form stellt die Transplantation von Knochenmark dar (Wilson und Vellodi, 2000). Bei der benignen Form ist eine regelmäßige Röntgenkontrolle, sowie symptomatische Therapie angezeigt (Bollerslev und Mosekilde, 1993).

Beim Hund ist diese Erkrankung nur vereinzelt beschrieben worden (Lees und Sautter, 1979).

2.1.2.2. Erworbene Krankheiten

2.1.2.2.1. Osteomalazie

Bei dieser Skeletterkrankung wird das gebildete Osteoid nicht ausreichend mineralisiert. Meist kommt es durch Vermehrung der Osteoklasten und gesteigerte Knochenresorption zum Abbau sowohl von Spongiosa, als auch von Compacta. Daraus resultieren eine Erweichung der Knochen mit gesteigerter Frakturbereitschaft, Knochenverbiegungen und Deformierungen. Ursachen sind ein absoluter Phosphor- oder Vitamin D-Mangel oder eine langanhaltende Störung des Calcium-Phosphor-Verhältnisses in der Nahrung.

2.1.2.2.2. Rachitis

Auch bei der Rachitis kommt es zur mangelhaften Mineralisierung des Skelettes. Sie tritt aber ausschließlich beim jugendlichen, noch wachsenden Knochen auf. Der Knorpel ordnet sich zwar als Säulenknorpel im Bereich der Wachstumszone des Knochens an, wird aber nicht mineralisiert. Damit kommt es zu einer mangelhaften Degeneration des Knorpels und zu einer Verbreiterung der Epiphysenknorpelzone. Es entstehen Störungen des Knochenwachstums, der Knochenreifung und eine verbreiterte, weiche Epiphysenzone. Klinisch treten diese Veränderungen beim Tier vor allem an den Gelenken der Extremitäten und den Rippenknorpeln in Erscheinung, beim Mensch ist häufig auch die Wirbelsäule betroffen.

Ursachen für die Rachitis können direkter oder indirekter Vitamin D-Mangel, sowie Calcium- oder Phosphor-Mangel sein, aber auch congenitale Erkrankungen, die den Vitamin D- oder Phosphorhaushalt betreffen.

Rachitis ist heute immer noch ein Problem in Entwicklungsländern, sowohl in Asien, als auch in Afrika. Hier ist der Zusammenhang mit einer niedrigen Calciumaufnahme

ein weiterer pathogenetischer Faktor. Aber auch in industrialisierten Ländern können Säuglinge, die ausschließlich Muttermilch erhalten, an Rachitis erkranken (Pettifor, 2002).

Bei den Erbkrankheiten werden verschiedene Formen unterschieden: Typ 1 der Vitamin D-abhängigen Rachitis beruht auf einem autosomal rezessiv vererbten Defekt der 1 alpha-Hydroxylase. Typ 2 ist gekennzeichnet durch eine autosomal rezessiv vererbte Mutation des Vitamin D-Rezeptors, der dadurch nicht mehr in der Lage ist auf 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ zu reagieren (Kitanaka et al., 2001). Dabei kann die Mutation sowohl die DNA-bindende Domäne, als auch die Ligand-bindende Domäne betreffen (Kato et al., 2002).

Eine weitere Form der Rachitis kann sekundär durch Hypophosphatämie entstehen. Diese kann entweder durch Tumoren induziert werden oder eine congenitale hypophosphatämische Form der Rachitis sein (Di Meglio und Econs, 2001).

Durch den Mangel an Vitamin D kommt es zu einer Hypocalcämie mit nachfolgendem sekundären Hyperparathyreoidismus, wodurch wiederum Calcium aus dem Skelett freigesetzt wird. Die ersten Veränderungen sind meist an den Schädelknochen erkennbar. Außerdem entstehen Auftreibungen an den metaphysären Wachstumszonen, sowie Erweiterungen der distalen Röhrenknochen durch Störung des Knorpelabbaus und Anlagerung von nicht verkalktem Osteoid.

Hunde und Katzen sind, im Gegensatz zu Herbi- und Omnivoren Spezies nicht in der Lage mit Hilfe von UV-Licht Vitamin D₃ in der Haut zu synthetisieren (How et al., 1994). Dennoch kommt beim Hund Rachitis durch Vitamin D-Mangel äußerst selten vor. Einerseits liegt dies am niedrigen Bedarf des Hundes an Vitamin D, der laut Meyer und Zentek (1998) bei 10 IU/kg Körpergewicht liegt. Neueste Angaben gehen von einem täglichen Bedarf von 0,18 µg/kg Körpergewicht aus, was 7,2 IU/kg entspricht (NRC, 2003). Andererseits ist in kommerziell erhältlichem Hundefutter ein ausreichender Gehalt an Vitamin D vorhanden. Allerdings kann experimentell Rachitis durch Vitamin D-Mangel induziert werden.

Die Heilung von Rachitis wurde erstmals von Mellanby (1918) an Hunden beschrieben, der den Tieren Hafermehl fütterte bis sie Symptome von Rachitis entwickelten und dies dann durch die Gabe von Fischleberöl verhindern und heilen konnte. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden Lebertran, sowie die Bestrahlung mit UV-Licht als Therapie verwendet. Heute sind die tägliche Einnahme von

Vitamin D in therapeutischer Dosis oder eine intramuskuläre Stoßtherapie, sowie eine ausreichende Versorgung mit Calcium Mittel der Wahl. Bei hypophosphatämischer Rachitis ist zusätzlich zur Gabe von Vitamin D auch eine Supplementierung mit Phosphat nötig. Für die Vitamin D-abhängige Rachitis Typ 2 ist allerdings bis heute keine befriedigende Therapie vorhanden (Mughal, 2002).

2.1.2.2.3. Osteodystrophia fibrosa generalisata

Bei dieser Krankheit wird vollständig mineralisierter Knochen durch gesteigerte Osteoklastentätigkeit resorbiert und durch nicht vollständig mineralisiertes Osteoid oder collagenes Bindegewebe ersetzt. Die Knochen werden weich, biegsam und schneidbar. Ursache ist ein Überschuss an Parathormon aufgrund eines Hyperparathyreoidismus, einer Überfunktion der Epithelkörperchen der Schilddrüse. Dies hat einen Abbau des Knochengewebes durch Osteoklasten und damit eine Freisetzung von Calcium zur Folge.

Der primäre Hyperparathyreoidismus entsteht durch idiopathische Hyperplasien oder endokrin aktive Tumoren der Nebenschilddrüse. Bei Hunden sind vereinzelt Adenome der Epithelkörperchen gefunden worden (Dämmrich, 1981). Insgesamt ist diese Form beim Tier jedoch sehr selten. Durch die Freisetzung von Calcium kommt es zur Hypercalcämie, Hypercalcurie und Nephrocalcinose oder Urolithiasis. Beim Menschen ist aber immer häufiger ein asymptomatischer primärer Hyperparathyreoidismus vorhanden (Bilezikian et al., 2002). Hier sind klinische Erscheinungen an Skelett und Niere selten, die Diagnose des Hyperparathyreoidismus beruht auf labordiagnostischen Methoden (Rao et al., 2002). Der sekundäre Hyperparathyreoidismus entsteht als Reaktion auf längeranhaltende Hypocalcämie und/oder Vitamin D₃-Mangel. Dabei kommt es zur Freisetzung von Calcium zuerst aus dem metabolischen, nachfolgend aber auch aus dem funktionellen Knochengewebe.

Der sekundäre Hyperparathyreoidismus wird in zwei Formen unterteilt.

Beim renalen Hyperparathyreoidismus kommt es durch chronische oder angeborene Niereninsuffizienz zur Verminderung der glomerulären Filtrationsrate und zu einer vermehrten Phosphorretention. Durch diese Hyperphosphatämie entsteht eine erhöhte Konzentration an schwer löslichem Calciumphosphat im Blut, wodurch

indirekt eine verminderte Calciumkonzentration vorhanden ist. Phosphor hat zusätzlich einen direkt stimulierenden Effekt auf die Parathormonsekretion und die Zellproliferation von Zellen in der Nebenschilddrüse (Llach und Forero, 2001). Außerdem ist die insuffiziente Niere nicht in der Lage ausreichend 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ zu bilden, was wiederum die Calciumresorption im Darm senkt und so zur Hypocalcämie beiträgt. Auch der negative „Feedback“ Mechanismus von Vitamin D-Metaboliten über Vitamin D-Rezeptoren in der Nebenschilddrüse ist beeinträchtigt (Elder, 2002). Des Weiteren ist die insuffiziente Niere nicht in der Lage auf die gesteigerte Sekretion von Parathormon zu reagieren und eine Steigerung der Phosphorausscheidung, sowie eine Verminderung der Calciumexkretion zu bewirken.

Beim alimentären Hyperparathyreoidismus führt ein Überschuss an Phosphor in der Nahrung zur Erhöhung des Phosphor- und Erniedrigung des Calciumspiegels im Blut. Beim Hund ist dies bei reiner Fleischfütterung der Fall, da viel Phosphor jedoch wenig Calcium aufgenommen wird und somit ein unausgeglichenes Calcium-Phosphor-Verhältnis vorliegt. Der niedrige Calciumgehalt im Blut führt dann zur Aktivierung der Nebenschilddrüse, zur Ausschüttung von Parathormon und zur Resorption von Knochengewebe (Cook et al., 1983).

Der tertiäre Hyperparathyreoidismus entsteht aus dem sekundären. Die Funktionssteigerung der Nebenschilddrüse wird zu einer selbstständigen Krankheit mit adenomatöser Hyperplasie der Epithelkörperchen und autonomer Parathormonsekretion.

Klinisch kommt es zu einem Abbau des Knochengewebes und dessen Ersatz durch Fasergewebe. Meist sind die ersten Veränderungen an den Kiefer- und Schädelknochen erkennbar. Allerdings muss bei dieser Erkrankung zwischen corticalem und spongiösem Knochen unterschieden werden, da die gesteigerte PTH-Sekretion unterschiedliche Auswirkungen hat. An der Corticalis wird Knochen resorbiert, der corticale Knochen wird dünner und poröser. An der Spongiosa bleiben Knochenmasse und -architektur erhalten, es wird allerdings der Knochenumbau erhöht. Daher bleibt die Knochenmasse oft lange erhalten. Dies ist allerdings nur bei milden Erkrankungen der Fall, wird die Krankheit schwerer, so führt sie dennoch zum Verlust an Knochenmasse und zu einem erhöhten Frakturrisiko (Eriksen, 2002).

Die Therapie der Osteodystrophia fibrosa, bzw. des Hyperparathyreoidismus richtet sich nach der Ursache der Erkrankung. Beim primären Hyperparathyreoidismus ist

eine Parathyreoidektomie angezeigt. Bei asymptomatischen Patienten kann auch eine Therapie mit Bisphosphonaten versucht werden (Rodan, 2002). Sekundärer Hyperparathyreoidismus wird durch Therapie der Grundkrankheit behandelt. Bei Niereninsuffizienz muss schon in frühen Stadien der Phosphorspiegel im Blut gesenkt werden. Dies ist durch Restriktion des mit der Nahrung aufgenommenen Phosphors sowie durch Phosphatbinder wie Calciumcarbonat und -acetat oder auch durch Phosphatbinder, die kein Calcium enthalten und damit den Calciumspiegel nicht verändern, möglich (Martin und Gonzalez, 2001). Bei Dialysepatienten mit fortgeschrittener Niereninsuffizienz werden Vitamin D-Metabolite mit weniger Nebenwirkungen auf den Calcium- und Phosphorspiegel verabreicht, sowie zusätzlich Phosphatbinder. Bei Skelettkomplikationen, die nicht therapeutisch beeinflussbar sind, kann eine Parathyreoidektomie oder Teilparathyreoidektomie notwendig sein. Dies kann auch noch nach einer Nierentransplantation unvermeidlich sein. Auch die Einnahme von Bisphosphonaten oder Vitamin D₃ kann nach einer Transplantation den Verlust an Knochenmasse vermindern (Elder, 2002).

Ebenso steht beim Tier die Behandlung der Nierenerkrankung im Vordergrund. Zusätzlich kann Vitamin D₃, sowie die Gabe von Calciumcarbonat bei Hypocalcämie und Hyperphosphatämie sinnvoll sein.

Beim alimentären Hyperparathyreoidismus ist demnach beim Hund als Therapie ein im Mineralstoffgehalt ausgewogenes Futter, sowie die Substitution von Vitamin D₃ angezeigt.

2.1.2.2.4. Osteodystrophia deformans (Paget Krankheit) und craniomandibuläre Osteopathie

Bei der Paget Krankheit des Knochens handelt es sich um eine lokale Störung des Knochen-Remodelings. Eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten, die sowohl vergrößert sind, als auch eine erhöhte Anzahl an Zellkernen vorweisen, verursacht eine gesteigerte Knochenresorption. Gleichzeitig mit der Osteolyse beginnt eine gesteigerte Knochenformation, bei der unorganisierter Knochen angelagert wird.

Meist wird die Krankheit bei Patienten über fünfzig Jahren diagnostiziert (Morales-Piga et al., 2000).

Die Ätiologie ist noch nicht eindeutig geklärt. Eine Infektion mit einem Paramyxovirus wurde mit der Krankheit in Zusammenhang gebracht, es wurde sowohl eine Infektion mit Staupevirus („canine distemper virus“), als auch mit Masernvirus vermutet. Genetische Ursachen scheinen jedoch auch eine Rolle zu spielen (Siris, 1998).

Mee et al. (1995a) vermuteten, dass canines Staupevirus, ein Paramyxovirus, bei der Ätiologie der Paget Krankheit eine Rolle spielt. In einer Kultur von Knochenmarkszellen konnte eine Infektion mit Staupeviren die Anzahl und Größe, sowie die Anzahl der Zellkerne in den Osteoklasten erhöhen. Außerdem wurde eine erhöhte Expression von Interleukin 6 und dem Proto-Onkogen c-Fos beobachtet, was wiederum zu einer Osteoklastenaktivierung führt. All diese Beobachtungen werden auch bei Paget gemacht. Daher können auch Knochenmarkszellen des Hundes, die mit Staupevirus infiziert werden, als in vitro-Modell für Morbus Paget dienen (Mee et al., 1995b). Khan et al. (1996) fanden bei Personen, die einen Hund besitzen, der nicht gegen Staupe geimpft war, ein erhöhtes Risiko an Paget zu erkranken. Allerdings konnten neuere Studien in Knochenmarkskulturen von Patienten mit Paget kein Staupevirus identifizieren (Ooi et al., 2000). Friedrichs et al. (2002) fanden jedoch das Gen für das Nucleocapsid des Masernvirus in voller Länge und auch in Teilen in Knochenmarkszellen von Patienten mit Paget Krankheit. Außerdem konnten sie multiple Mutationen des Gens nachweisen, was wiederum für eine Persistenz des Virus über viele Jahre spricht, da der Reparaturmechanismus der Polymerase nicht vorhanden ist.

Zur Therapie von Paget kommen vor allem Bisphosphonate oder Calcitonin zum Einsatz, die die Knochenresorption senken (Drake et al., 2001).

Beim Hund wird die craniomandibuläre Osteopathie mit der Paget Krankheit des Menschen verglichen (Pool und Leighton, 1969). Hier liegen vor allem histologische Ähnlichkeiten vor. Auch bei dieser Erkrankung ist die Ursache unbekannt. Im Gegensatz zur Paget Krankheit sind jedoch vor allem junge Tiere betroffen, meist im Alter von drei bis sechs Monaten.

Die proliferative Knochenerkrankung tritt am Unterkieferkörper oder an der Bulla tympanica auf. Meist sind Scotch-, Cairn- oder West-Highland-Terrier betroffen, was einen genetischen Zusammenhang vermuten lässt (La Fond et al., 2002). Lamellärer Knochen wird resorbiert und vermehrt primäre Spongiosa angelagert. Es entsteht grober Geflechtknochen mit unregelmäßig angeordneten Trabekeln. Auch die

Markhöhle kann mit Spongiosa ausgefüllt sein. Die Krankheit ist selbstlimitierend und mit zunehmender Reifung des Skeletts wird der spongiöse Knochen wieder durch lamellären ersetzt.

Bei der Therapie kommen nichtsteroidale Antiphlogistika und Corticosteroide zum Einsatz. Außerdem muss die Nahrungsaufnahme des Tieres evtl. parenteral gesichert werden, falls das Maul nicht geöffnet werden kann.

2.1.2.2.5. Panostitis

Die Panostitis ist eine spontan auftretende Krankheit der langen Röhrenknochen, die bei jungen Hunden großer Rassen vorkommt. Besonders häufig tritt sie beim Deutschen Schäferhund auf. Sie wird auch als juvenile Osteomyelitis oder Enostitis bezeichnet.

Die Ätiologie der Erkrankung ist ungeklärt. Eine erbliche Komponente wird jedoch vermutet. Männliche Tiere erkranken wesentlich häufiger als weibliche (Stead et al., 1983). Zum Zeitpunkt der Erkrankung sind die Tiere meist zwischen fünf und zwölf Monaten alt (Böhning et al., 1970).

Schwalder et al. (2002) vermuten eine intraossäre Drucksteigerung durch die osmotische Wirkung von Proteinen als Ursache der Erkrankung. Diese soll ein intraossäres Ödem verursachen, was wiederum im nicht dehnbaren Knochen zur Kompression von Blutgefäßen und zur ossären Ischämie führen soll.

Primär ist bei dieser Krankheit das Fettmark der Knochen betroffen, sekundär der Knochen selbst. Es kommt zur Degeneration von medullären Adipocyten im Bereich des Foramen nutritium, woraufhin Stromazellen proliferieren. Diese Zellen lagern Osteoid und Collagenfasern in der Markhöhle, sowie am Periost und Endost an. Im Bereich des Endost kommt es zu neuer Knochenformation und es breiten sich unregelmäßige Knochenbälkchen nach proximal und distal in die Markhöhle hinein aus. Auch subperiostal wird neuer Knochen angelagert (Stead et al., 1983). Das neugebildete Knochengewebe wird allerdings rasch wieder resorbiert und durch Knochenmark ersetzt. Die Krankheit ist selbstlimitierend.

Die Therapie erfolgt symptomatisch mit Analgetika, die jedoch den Heilungsverlauf nicht beschleunigen.

Beim Menschen ist die Panostitis in dieser Form nicht bekannt. Als Panostitis wird hier eine Entzündung aller Gewebe des Knochens bezeichnet, also eine Periostitis et Ostitis et Osteomyelitis diffusa.

2.1.2.2.6. Entzündungen und Frakturen

Sowohl Entzündungen des Knochens, als auch Frakturen können bei Menschen und Hunden in unterschiedlichen Formen auftreten.

Aseptische Entzündungen werden meist durch Traumata ausgelöst, septische Entzündungen können durch Verletzungen des Knochens oder durch hämatogene Infektion entstehen.

Frakturen werden durch mechanische Traumen oder ungewöhnliche Kontraktionen der am Knochen ansetzenden Muskeln hervorgerufen. Kann eine Fraktur durch ein minimales Trauma ausgelöst werden, so spricht man von einer pathologischen Fraktur oder Spontanfraktur. Sie kann durch degenerative Knochenerkrankungen, Knochentumoren oder Entzündungen hervorgerufen werden. Beim Menschen treten pathologische Frakturen bei Osteoporose auf, beim Hund ist dies allerdings nicht der Fall (Newman et al., 1995).

2.1.2.3. Osteoporotische Veränderungen

2.1.2.3.1. Definition Osteoporose

Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch verminderte Knochenmasse, Beeinträchtigung der Mikroarchitektur und daraus folgender erhöhter Frakturanfälligkeit gekennzeichnet ist. So wurde die Osteoporose auf der Consensus development conference on osteoporosis 1993 in Hongkong definiert.

Die WHO stellte darauf basierend 1994 eine konkrete Definition auf: Eine Erniedrigung des Knochenmineralgehaltes (BMC) oder der Knochendichte (BMD) von mehr als 2,5 Standardabweichungen (SD) unter den Mittelwert für junge Erwachsene (T-Wert) gilt als Osteoporose. Schwere oder klinisch manifeste

Osteoporose besteht, wenn eine oder mehrere Frakturen aufgetreten sind. Eine Osteopenie liegt dann vor, wenn die Knochendichte zwischen 1 und 2,5 SD unter dem Mittelwert liegt.

**Tabelle 3: Osteoporosestadien
(nach WHO, 1994)**

Osteoporosestadium	Knochendichte (SD vom T-Wert)
Physiologischer Befund	Knochenmineralgehalt unverändert (bis $-1,0$ SD)
Osteopenie	Knochenmineralgehalt vermindert ($-1,0$ bis $-2,5$ SD) Keine Fraktur
Osteoporose ohne Fraktur Präklinische Osteoporose	Knochenmineralgehalt vermindert (unter $-2,5$ SD) Keine Fraktur
Osteoporose mit Fraktur Klinische Osteoporose	Knochenmineralgehalt vermindert (unter $-2,5$ SD) Wirbelfrakturen ohne adäquates Trauma

Jedes Jahr werden in der EU über 380 000 Patienten mit Hüftfraktur und über 96 000 Patienten mit Wirbelfrakturen stationär behandelt (Finnern und Sykes, 2003). Laut Compston et al. (1998) wird sich in der Europäischen Union die Anzahl an Menschen über 65 Jahren bis 2040 verdoppeln. Aufgrund der steigenden Lebenserwartung und weil die Inzidenz von osteoporotischen Frakturen mit steigendem Alter zunimmt, wird die Osteoporose in Zukunft noch weiter an Bedeutung zunehmen (Ismail et al., 2002). Dies hat auch große wirtschaftliche Auswirkungen, da in der EU jährlich mehr als 4 Milliarden Euro für die stationäre Versorgung aufgebracht werden müssen (Finnern und Sykes, 2003).

2.1.2.3.2. Ursachen und Einteilung

Die Osteoporose kann je nach Ursache in primäre und sekundäre Form unterteilt werden.

Bei der primären Osteoporose sind das Alter, sowie die Einstellung der Hormonproduktion durch die Geschlechtsorgane der Auslöser der Erkrankung. Die primäre Form umfasst mit der postmenopausalen und der senilen Osteoporose vor allem altersabhängige Veränderungen des Knochenstoffwechsels. Bei der

postmenopausalen Osteoporose (Typ 1 Osteoporose) der Frau kommt es zu einem östrogenabhängigen, trabekulären Knochenverlust nach der Menopause. Bei der senilen Osteoporose von Mann und Frau (Typ 2 Osteoporose) tritt ein altersabhängiger corticaler und trabekulärer Knochenverlust auf. Bei Patienten mit Typ 2 Osteoporose findet ein langsamer, aber lang andauernder Knochenabbauprozess statt. Trifft keines der oben genannten Kriterien zu, so spricht man von idiopathischer Osteoporose.

Bei den sekundären Osteoporosen ist eine Ätiologie bekannt, oft handelt es sich um Endokrinopathien. Es können aber auch Kombinationen von Grunderkrankung, Risikofaktoren und Medikamenten zu einer Erkrankung beitragen.

Tabelle 4: Einteilung der Osteoporoseformen
(nach Kraenzlin, 1995; Stracke, 1992)

Primäre Osteoporose	<ul style="list-style-type: none"> • Postmenopausale Osteoporose (Typ 1) • Senile Osteoporose (Typ 2) • Idiopathische Osteoporose
Sekundäre Osteoporose (als Folge einer Grundkrankheit)	<ul style="list-style-type: none"> • Endokrin • Iatrogen/medikamentös • Gastrointestinal/alimentär • Myelogen/onkologisch • Parainfektös/immunogen • Genetisch • Inaktivität/Immobilisation • Komplexe Osteopathien • Andere Ursachen

2.1.2.3.3. Möglichkeiten der Prophylaxe und Therapie

Neben der Möglichkeit eine bestehende Osteoporose zu therapieren und die Knochenmasse zu erhöhen, ist eine Verhinderung des Verlustes an Knochenmasse von entscheidender Bedeutung. Eine Prophylaxe der Osteoporose sollte daher schon prämenopausal begonnen werden, um eine möglichst hohe „peak bone mass“ zu erreichen und während der Menopause weitergeführt werden.

Tabelle 5: Möglichkeiten der Therapie und Prävention von Osteoporose

Therapie
Hemmung der Knochenresorption
Östrogene/Gestagene Bisphosphonate Calcitonin Selektive Östrogenrezeptor Modulatoren (SERM) Vitamin D-Metabolite Calcium
Stimulation der Knochenformation
Fluoride Parathormon Vitamin D-Metabolite
Prävention
Bedarfsgerechte Calciumzufuhr
Vitamin D
Körperliche Aktivität

Knochenwirksame Substanzen

Im Folgenden werden nur die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen und ihre Wirkung auf den Knochenstoffwechsel behandelt.

Phytoöstrogene

Phytoöstrogene sind Pflanzeninhaltsstoffe, die sexualhormonartige, biologische Aktivität besitzen und mit der Nahrung aufgenommen werden können. Zum ersten Mal wurde in den vierziger Jahren bei der „clover disease“ australischer Schafe erkannt, dass Pflanzeninhaltsstoffe eine hormonartige Wirkung entfalten können (Bennetts et al., 1946).

Die Phytoöstrogene lassen sich in die Unterklassen der Lignane und der Isoflavonoide, diese wiederum in die Isoflavone, die Isoflavane und die Coumestane unterteilen (Davis et al. 1999). Zu den Isoflavonen gehören die wichtigsten Vertreter Genistein und Daidzein, sowie Biochanin A, Formononetin und Glycitin. Sie kommen vor allem in Sojabohnen vor, aber auch in Produkten wie Sojamehl, Sojamilch und Tofu (Reinli und Block, 1996).

Aufgrund ihrer chemischen Struktur ähneln die Isoflavone dem 17 beta-Östradiol, sie bestehen aus zwei Phenolringen, die durch einen heterocyclischen Pyranring verbunden werden. Dadurch sind sie in der Lage an Östrogenrezeptoren zu binden und in unterschiedlicher Weise Reaktionen auszulösen.

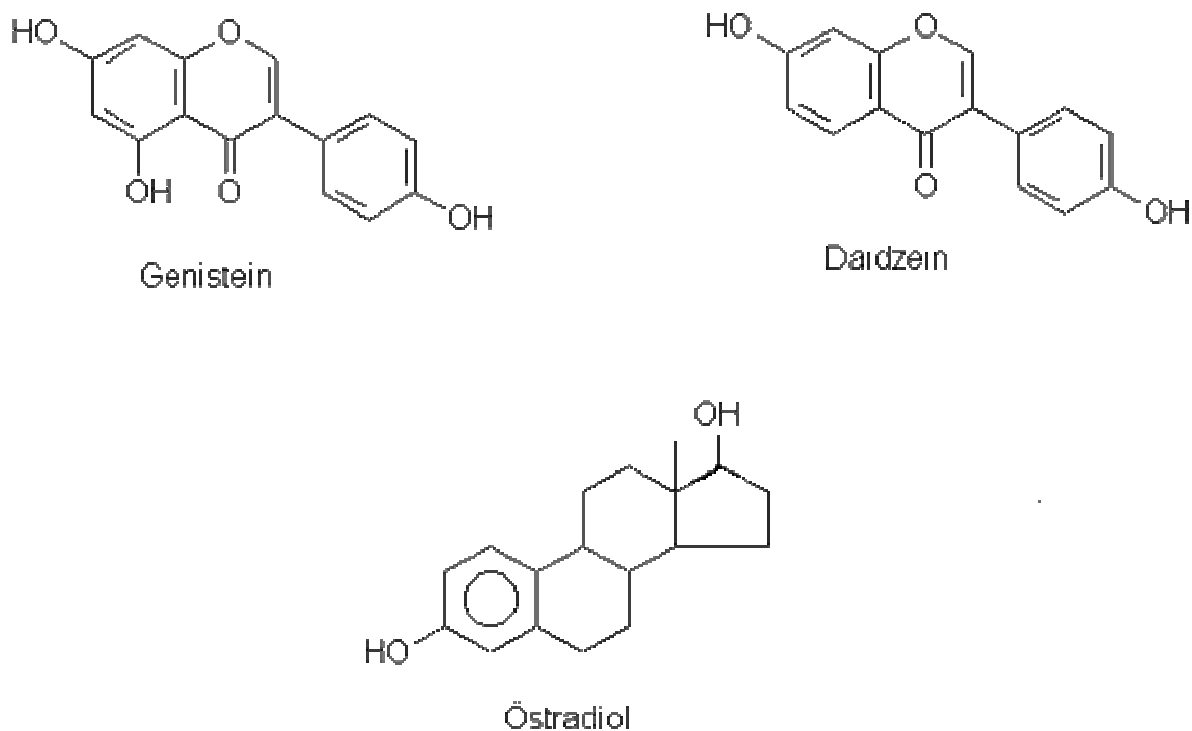


Abbildung 1: Strukturformeln von Genistein, Daidzein und Östradiol

Mosselmann et al. (1996) konnten einen neuen Östrogenrezeptor identifizieren, der in Thymus, Milz, Ovarien, Hoden und anderen Geweben vorhanden ist. Dieser Östrogenrezeptor beta unterscheidet sich in der C-terminalen Domäne, an die der Ligand bindet und an der N-terminalen Transaktivierungsdomäne vom Östrogenrezeptor alpha. Phytoöstrogene binden besser an den Östrogenrezeptor beta, wobei Genistein die stärkste Bindungsaffinität besitzt. Obwohl Genistein genau so effizient an den Östrogenrezeptor beta bindet wie 17 beta-Östradiol, benötigt es

eine 10 000-fach höhere Konzentration um eine Transkription zu induzieren. Da auch zur Stimulation des Wachstums von Krebszellen eine deutlich höhere Konzentration notwendig ist, kann dies auch eine mögliche Erklärung sein, wie durch Phytoöstrogene das Krebsrisiko gesenkt werden kann (Morito et al., 2001). Phytoöstrogene können sowohl als Agonisten als auch als Antagonisten am Östrogenrezeptor wirken. Dies ist unter anderem von der An- bzw. Abwesenheit von Östrogen abhängig. Sie können daher z.B. vor und nach der Menopause unterschiedliche Wirkung auf Gewebe haben (Migliaccio and Anderson, 2003). Phytoöstrogene können allerdings auch nicht-genomische Effekte auslösen, die nicht durch den Östrogenrezeptor vermittelt werden. Sie können als Tyrosinkinase-Inhibitor wirken und unabhängig von der Bindung an die Zelle Reaktionen auslösen (Blair et al., 1996). Auch eine Wirkung über den Mediator Stickstoffmonoxid wird vermutet (Albertazzi, 2002).

Phytoöstrogene können daher in unterschiedlichster Weise auf den Körper wirken. So wird unter anderem ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Phytoöstrogenen und einem verminderten Risiko an verschiedenen Krebsarten zu erkranken angenommen. Hormonabhängige Tumoren, wie Brust- Endometriums- und Prostatakrebs haben in Asien eine niedrigere Inzidenz als in westlichen Ländern, was unter anderem auf die höhere Aufnahme von Phytoöstrogenen zurückgeführt wird (Adlercreutz et al., 1995). Sowohl im Tiermodell, als auch in Studien mit Tumorzelllinien wurde diese Annahme bestätigt (Barnes, 1995). Ebenso zeigen Studien an prä- und postmenopausalen Frauen bei hoher Phytoöstrogenaufnahme ein erniedrigtes Brustkrebsrisiko (Ingram et al., 1997).

Auch eine Wirkung bei kardiovaskulären Erkrankungen, typisch „westlichen“ Krankheiten, wurde festgestellt. Die Aufnahme von Sojaprotein kann die Lipide im Plasma senken (Anderson et al., 1995) und Phytoöstrogene, vor allem in Form von Soja können coronare Herzerkrankungen verhindern (Adlercreutz und Mazur, 1997). Dies konnte auch am Tiermodell, ovariektomierte Kaninchen unter Cholesterinfütterung, bestätigt werden (Alexandersen et al., 2001).

Phytoöstrogene haben außerdem einen Einfluss auf den Sexualzyklus der Frau. Die tägliche Einnahme von Sojaprotein mit einem Gehalt von 45 mg Isoflavonen kann den Menstruationszyklus durch zeitliche Ausdehnung der folliculären Phase

verlängern (Cassidy et al., 1994). Dies scheint auch ein Grund für die Reduzierung des Brustkrebsrisikos zu sein, da der zeitliche Einfluss der Östrogene auf das Brustgewebe verkürzt wird.

Außerdem können Wechseljahrsbeschwerden wie z.B. Hitzewallungen, durch Phytoöstrogene reduziert werden (Albertazzi et al., 1998; Kronenberg und Fugh-Bergman, 2002).

In Osteoblasten sind beide Isoformen des Östrogenrezeptors vorhanden und werden während des Lebenszyklus des Osteoblasten in unterschiedlicher Weise reguliert und synthetisiert (Arts et al., 1997). Daher können Phytoöstrogene auch auf Knochenzellen eine Wirkung ausüben.

Aufgrund der niedrigeren Inzidenz von Hüftfrakturen in Asien, wird schon lange ein Zusammenhang mit den Lebensgewohnheiten vermutet (Fujita, 1996). Ein Anstieg des Problems der Osteoporose in Asien wird außerdem mit einem Wandel in der Ernährung und einer sinkenden Aufnahme von Phytoöstrogenen in Verbindung gebracht (Adlercreutz und Mazur, 1997).

Verschiedene epidemiologische Studien konnten diesen Zusammenhang bestätigen. Somekawa et al. (2001) zeigten, dass bei postmenopausalen Frauen eine hohe Aufnahme von Isoflavonen mit einer höheren Knochendichte korreliert. Eine Aufnahme von mehr als 50 mg/d Isoflavonen stand dabei sowohl in der frühen, als auch in der späten Postmenopause mit einer höheren Knochendichte in Beziehung. Auch Mei et al. (2001) fanden einen Zusammenhang zwischen Isoflavonaufnahme und Knochendichte der Lendenwirbel. Postmenopausale Frauen mit einer mittleren Aufnahme von 53,3 g/d an Isoflavonen hatten, sowohl an der Lendenwirbelsäule, als auch am Femur eine höhere Knochendichte als Frauen mit einer mittleren Isoflavonaufnahme von 2,1 mg/d. Außerdem fanden sie bei höherer Isoflavonaufnahme einen niedrigeren Osteocalcinspiegel im Serum und weniger N-Telopeptid im Urin. Bei prämenopausalen Frauen mit hohen Östrogenspiegeln wurde dagegen kein Zusammenhang festgestellt. Horiuchi et al. (2000) konnten einen positiven Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Sojaprotein und der Knochendichte der Lendenwirbelsäule nachweisen. Die Ausscheidung von Deoxyypyridinolin im Urin war bei hoher Sojaproteinaufnahme ebenfalls erniedrigt. Ähnliche Ergebnisse konnten auch Ho et al. (2003) feststellen. Postmenopausale

Frauen mit einer Aufnahme von durchschnittlich 40 mg/d Isoflavonen hatten eine um 2,9% höhere Knochendichte, sowie einen höheren Knochenmineralgehalt, verglichen mit Frauen, die weniger als 2,7 mg/d aufnahmen.

Auch in Interventionsstudien wurde ein Einfluss von Phytoöstrogenen auf den Knochen festgestellt. In einer Studie von Alekel et al. (2000) wurde erstmals der Einfluss auf perimenopausale Frauen untersucht. Hierbei vermochte die Aufnahme von isoflavonreichem Soja über sechs Monate zur Zeit der Menopause den Verlust von Knochenmasse abschwächen. Die Gabe von Sojaprotein mit einem hohen Isoflavongehalt (80,4 mg/d) hatte dabei eine deutlichere Wirkung auf BMD und BMC als Sojaprotein mit niedrigem Isoflavongehalt (4,4 mg/d). Potter et al. (1998) erreichten durch Zugabe von isoflavonreichem Sojaprotein (90 mg/d) über sechs Monate bei postmenopausalen Frauen sogar eine Erhöhung der Knochendichte und des Mineralgehaltes. Auch Arjmandi et al. (2003) konnten durch die Aufnahme von 40 g Sojaprotein über drei Monate bei postmenopausalen Frauen eine Verringerung der Knochenresorption, gemessen an der Ausscheidung von Deoxypyridinolin im Urin, erreichen. Außerdem konnte eine Erhöhung der Calciumexkretion im Urin, die bei der Kontrollgruppe beobachtet wurde, verhindert werden. Diese Beobachtungen konnten allerdings nur bei Frauen gemacht werden, die keine Hormonersatztherapie einnahmen. Dies zeigt wiederum, dass die Wirkung von Phytoöstrogenen von der An- bzw. Abwesenheit von Östrogen abhängt.

Insgesamt lassen diese Zusammenhänge darauf schließen, dass Phytoöstrogene, wohl ähnlich den Östrogenen, die Knochenresorption hemmen und dadurch den Knochenverlust vermindern.

Andere Studien konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen Isoflavonaufnahme und Knochenstoffwechsel nachweisen. Allerdings wurden bei diesen Studien nur geringe Mengen an Isoflavonen aufgenommen (Nagata et al., 2002) bzw. die Exkretion von Phytoöstrogenen im Urin als Parameter für deren Aufnahme verwendet (Wangen et al., 2000).

Allerdings sind immer noch sehr wenige Studien vorhanden, die den Einfluss einer langfristigen Aufnahme von Phytoöstrogenen untersuchen.

Auch am Tiermodell ovariektomierte Ratten wurde die Wirkung von Phytoöstrogenen auf den Knochen genauer untersucht.

Anderson et al. (1995) waren unter den ersten, die an ovariectomierten Ratten als Modell für die postmenopausale Osteoporose einen protektiven Effekt von Genistein zeigen konnten.

Arjmandi et al. (1996) fütterten Ratten nach Ovariectomie Protein aus Sojabohnen. Dadurch konnte, wie auch durch 17 beta-Östradiol ein Verlust von physikalisch bestimmter Knochendichte an Femur und Wirbeln verhindert werden. Außerdem bewiesen Arjmandi et al. (1998), dass die Wirkung auf den Knochen durch den Isoflavongehalt beeinflusst wird. Der Verlust von Knochendichte bei ovariectomierten Ratten konnte durch die Fütterung von Sojaprotein verhindert werden, nicht aber durch Sojaprotein mit vermindertem Isoflavongehalt. Durch die Gabe von Sojaprotein konnten Harrison et al. (1998) einen höheren Asche- und Calciumgehalt in Tibia und Femur erreichen. Der Effekt entsprach auch hier der Gabe von Östradiol.

Hörmann (2000) konnte durch die Fütterung der Reinsubstanz Genistein (30 mg/kg), bzw. einer Kombination aus Genistein (30 mg/kg) und Daidzein (5 mg/kg) bei Ratten den Verlust an Knochendichte nach OVX sogar in größerem Maße als durch Östrogen vermindern. Auch hier wurde eine Verringerung der Knochenresorption beobachtet, da es zu einem Absinken der Collagen-Crosslinks im Urin kam. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch Krammer (2001). Durch die Fütterung von 15 mg/kg Genistein an Ratten nach OVX wurde die Knochenresorption deutlich gehemmt, die Formation allerdings wenig beeinflusst.

Fanti et al. (1998) injizierten ovariectomierten Ratten subkutan Genistein. In der Histomorphometrie zeigte sich bei den behandelten Ratten weniger trabekulärer Knochenverlust, eine höhere Knochenformationsrate, sowie mehr Osteoblasten. Die Knochenresorptionsparameter waren unverändert. Dies lässt vermuten, dass Phytoöstrogene auch die Knochenformation steigern können.

Auch der Verlust an Mikrostruktur des trabekulären Knochens nach OVX kann durch Genistein verhindert werden. Ishimi et al. (1999) konnten zeigen, dass Genistein nicht nur einen Verlust an Knochendichte verringert. In der Mikrocomputertomographie konnte ein Erhalt der Trabekelstruktur dargelegt werden. Dabei hatte Genistein, im Gegensatz zu Östrogen, keinen hypertrophen Effekt auf den Uterus.

Zusätzlich wurde der Effekt von Genistein auf Knochenzellen in Zellkulturen untersucht. Dabei wurde sowohl der Effekt auf Osteoblasten, als auch auf Osteoklasten genauer analysiert.

In Zelllinien aus Osteoblasten bewirkt Genistein eine Steigerung der Knochenformation mit erhöhter Sekretion von Alkalischer Phosphatase. Dabei wurde bei steigender Konzentration ein biphasischer Effekt festgestellt, der bei hohen Dosierungen rapide abnimmt (Anderson und Garner, 1998). Yoon et al. (1998) konnten durch Genistein eine Steigerung der Zellproliferation von Osteoblasten erreichen.

An Osteoklasten konnte eine Verringerung der Knochenresorption durch Genistein gezeigt werden. Yamaguchi und Gao (1997) zeigten, dass Genistein in einer Zellkultur aus Rattenknochen die Knochenresorption durch Parathormon, Prostaglandin E₂ und Lipopolysacchariden verhindern kann und direkt die Knochenresorption vermindert. In einer weiteren Studie untersuchten Gao und Yamaguchi (1999) diesen Vorgang genauer. Sie fanden heraus, dass Genistein die Anzahl der Osteoklasten in der Zellkultur senkt, indem es die Bildung von Osteoklasten aus Vorläuferzellen verhindert. Außerdem wirkt Genistein wahrscheinlich durch Induktion von Apoptose direkt suppressiv auf die Osteoklasten. In einer Studie von Viereck et al. (2002) konnte die antiresorptive Wirkung von Genistein durch die gesteigerte Synthese von Osteoprotegerin erklärt werden. Dieses Glycoprotein gehört zur Superfamilie der Tumor Nekrose Faktor-Rezeptoren und wird von Osteoblasten sezerniert, die andererseits auch einen Aktivator der Osteoklasten freisetzen. Osteoprotegerin ist in der Lage den Osteoklastenaktivator zu neutralisieren und kann damit die Knochenresorption vermindern.

Vitamin D

Die D-Vitamine gehören zur Gruppe der Steroide. Die wichtigsten Vertreter sind Cholecalciferol (Vitamin D₃) und Ergocalciferol (Vitamin D₂).

Der menschliche Körper kann Cholecalciferol aus Cholesterol selbst herstellen. Dabei wird mit Hilfe von ultraviolettem Licht aus 7-Dehydrocholesterin in der Haut Vitamin D₃ gebildet und in die Zirkulation abgegeben. Vitamin D₃ kann aber, wie auch Vitamin D₂, mit der Nahrung aufgenommen werden.

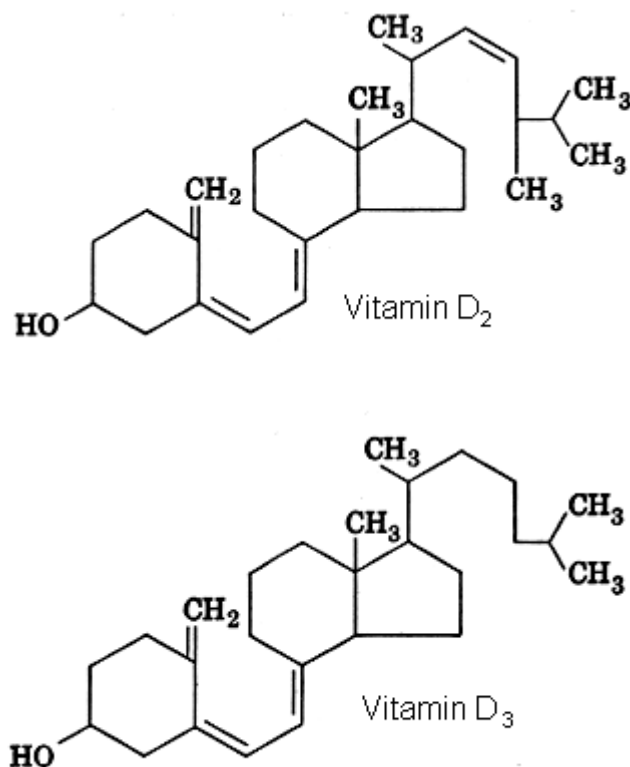


Abbildung 2: Strukturformeln von Vitamin D₂ und Vitamin D₃

Vitamin D wird in der Leber zu 25-Hydroxyvitamin D₃ hydroxyliert. In der Niere findet eine weitere Hydroxylierung statt, es entsteht, 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol). Dies stellt das biologisch aktive Vitamin D-Hormon dar, das auf verschiedene Zielorgane wirkt. Seine Hauptfunktion ist es, den Serumspiegel von Calcium aufrecht zu erhalten, um neuromuskuläre und zelluläre Funktionen zu gewährleisten.

Im Darm bewirkt Calcitriol eine Steigerung der intestinalen Calciumabsorption. Dies geschieht sowohl durch gesteigerte Synthese des Calbindins („calcium binding proteins“), als auch über Calciumkanäle, die einen transzellulären Calciumtransport ermöglichen (Bouillon et al., 2003).

Außerdem stimuliert es die Mineralisation von neu gebildetem Osteoid und Knorpel und die Reifung von Knochengewebe (New, 1999). Anscheinend ist Calcitriol auch in der Lage die Aktivität von Knochenzellen zu fördern, ohne die Anzahl der Zellen zu erhöhen (Malluche et al., 1986a) und hierbei vor allem die Aktivität von Osteoblasten zu steigern (Malluche et al., 1988). Allerdings ist ein direkter Zusammenhang zwischen Calcitriol und Mineralisation des Knochens nicht geklärt und es wird

vermutet, dass schon durch die Aufrechterhaltung des Calciumspiegels im Serum die Einlagerung von Hydroxylapatit in neu gebildetes Osteoid gewährleistet wird (Holick, 1996).

In der Niere steigert 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ die tubuläre Rückresorption von Calcium und erhöht gleichzeitig die Ausscheidung von Phosphat. Außerdem kann es sowohl direkt als auch indirekt die Ausschüttung von Parathormon in der Nebenschilddrüse hemmen.

Zusammen mit Parathormon aus der Nebenschilddrüse und Calcitonin aus den C-Zellen der Schilddrüse ist Calcitriol für die Aufrechterhaltung des Calciumspiegels im Serum verantwortlich. Parathormon bewirkt über eine Verminderung der Calciumausscheidung in der Niere und eine Freisetzung von Calcium aus dem Knochen eine Erhöhung des Calciumspiegels. Außerdem wird die Bildung von Calcitriol in der Niere verstärkt, was wiederum die Calciumresorption im Darm und die Rückresorption in der Niere erhöht. Calcitonin dagegen bewirkt bei hohem Calciumspiegel eine Einlagerung von Calcium in den Knochen und eine gesteigerte Ausscheidung über die Niere.

In vielen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen Vitamin D-Mangel und einer verminderten Mineralisation des Knochens, sowie zwischen Vitamin D-Mangel und einem gesteigerten Knochenverlust und einer daraus resultierenden erniedrigten Knochendichte nachgewiesen. Jesudason et al. (2002) fanden bei einem niedrigen Serumspiegel an 25-Hydroxyvitamin D erhöhte Marker der Knochenresorption. Auch ein erhöhtes Risiko für eine Hüftfraktur steht im Zusammenhang mit einem Mangel an Vitamin D (Lips, 1994).

Eine Supplementierung mit Vitamin D, vor allem bei Patienten mit Vitamin D-Mangel, resultiert dagegen in Verminderung des Knochenverlustes, Steigerung der Knochendichte und verminderter Inzidenz von Frakturen.

In einer Studie von Lukert et al. (1992) wurde festgestellt, dass eine höhere Aufnahme von Vitamin D mit einem höheren Mineralgehalt des Knochens zusammenhängt.

Gallagher (1990) konnte bei Frauen mit Osteoporose durch die Gabe von Vitamin D den Knochenturnover senken und einen Knochenverlust verhindern. Auch Shiraki, (1993) konnte durch den Vitamin D-Metaboliten 1 alpha-Hydroxyvitamin D₃ eine

Hemmung der Knochenresorption, sowohl bei seniler Osteoporose, als auch nach Ovariohysterektomie erzielen.

Sairanen et al. (2000) untersuchten die Gabe von 0,5µg 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bei postmenopausalen Frauen über vier Jahre. Während der Therapie war bei den behandelten Frauen die Knochendichte am Femurhals und an der Lendenwirbelsäule immer höher als bei Frauen aus der Kontrollgruppe. Außerdem wurde eine erhöhte Calciumausscheidung festgestellt, sowie niedrigere Parathormonspiegel. Osteocalcin als Formationsmarker, als auch carboxyterminales Telozeptid des Typ 1 Collagen als Resorptionsmarker waren um 27% bzw. 33% erniedrigt. Es wurde damit eine Verminderung des Knochenturnovers festgestellt, außerdem konnte eine Erhöhung der intestinalen Calciumabsorption durch die Gabe von Strontium nachgewiesen werden.

In weiteren Studien konnte die Gabe von Vitamin D₃ und Calcium nicht nur den Knochenverlust verringern, sondern auch das Risiko von Frakturen deutlich reduzieren (Chapuy et al., 1992; Dawson-Hughes et al., 1997).

In einer Metaanalyse von Daten aus verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass Vitamin D und Vitamin D-Metaboliten die Inzidenz vertebraler und wohl auch nichtvertebraler Frakturen senken, sowie einen positiven Effekt auf die Knochendichte haben kann. Allerdings kann auf Grund der Heterogenität der Studien keine sichere Aussage darüber getroffen werden, in welcher Form und Dosierung, sowie über welchen Zeitraum eine Supplementierung den größten Nutzen beinhaltet (Papadimitropoulos, 2002).

Auch am Tiermodell konnte Vitamin D den Knochenturnover senken und einen Knochenmasseverlust nach Ovariectomie verhindern. In einer Studie mit ovariectomierten Ratten konnte Calcitriol allein oder in Kombination mit dem Vitamin D-Metaboliten 1,24R,25-Trihydroxyvitamin D₃ den trabekulären Knochenverlust am Wirbelkörper verhindern, den Knochenturnover senken und die erhöhte Knochenresorption nach OVX vermindern (Erben et al., 1992). Nakamura et al. (1992) erreichten bei ovariectomierten Beagles durch Gabe des Vitamin D-Metaboliten 24R,25-Dihydroxyvitamin D₃ eine verringerte Ausscheidung an Hydroxyprolin, sowie niedrigere Osteocalcinspiegel im Serum. Der Mineralgehalt des Knochens und die Knochendichte wurden durch die Gabe von

24R,25-Dihydroxyvitamin D₃ erhöht, der durch OVX erhöhte Knochenturnover wurde reduziert. Malluche et al. (1988) konnten durch die Gabe von Calcitriol bei Beagles einen Verlust an Knochen nach OHX verhindern.

Allerdings muss beachtet werden, dass Hunde, im Gegensatz z.B. zur Ratte, nicht in der Lage sind Vitamin D₃ in der Haut zu synthetisieren und daher auf die Aufnahme mit der Nahrung angewiesen sind (How et al., 1994).

Vitamin K

Vitamin K kommt in verschiedenen Formen in der Natur vor. Als Vitamin K₁ (Phylloquinon) wird es vor allem in den Chloroplasten von grünen Pflanzen synthetisiert. Vitamin K₂ (Menaquinon) wird von Bakterien gebildet und kann eine unterschiedlich lange Seitenkette enthalten. Daher werden diese Substanzen auch Menaquinon-n genannt (MK-n), wobei n für die Anzahl an ungesättigten Isoprenylgruppen in der Seitenkette steht. MK-4 kommt in tierischen Produkten (Milch, Fleisch) vor und ist hier aus Vitamin K₁ entstanden. Außerdem gibt es noch das synthetisch hergestellte, wasserlösliche Vitamin K₃ (Menadion), das allerdings nur in der Tierernährung zugelassen ist.

Die wichtigste Funktion von Vitamin K ist die Beteiligung an der gamma-Carboxylierung von Glutamyresten (Glu) zu gamma-Carboxyglutamatresten (Gla). Dabei stellt es einen Cofaktor der mikrosomalen Carboxylase dar. Dieser Vorgang spielt vor allem bei der Blutgerinnung bei der Aktivierung verschiedenster Faktoren eine Rolle.

Auch im Knochen sind Proteine vorhanden, die gamma-Carboxyglutamatreste besitzen (Gla-Proteine). Die zwei Gla-Proteine Osteocalcin und Matrix Gla-Protein (MGP) stehen im Zusammenhang mit der Knochenformation (Hauschka et al., 1989), wobei Osteocalcin einen Marker für die Aktivität der Osteoblasten darstellt. MGP ist auch in anderen Geweben, wie Knorpel und Epithel vorhanden.

Osteocalcin im Knochengewebe besitzt drei Gla-Reste und kann mit hoher Spezifität und Affinität an Calciummoleküle des Hydroxylapatit binden (Hauschka und Reid 1978). In vitro erhöht Vitamin K₂ die gamma-Carboxylierung von Osteocalcin und damit auch die Anreicherung von Osteocalcin in der extrazellulären Matrix und steigert so die Mineralisation (Koshihara und Hoshi, 1997).

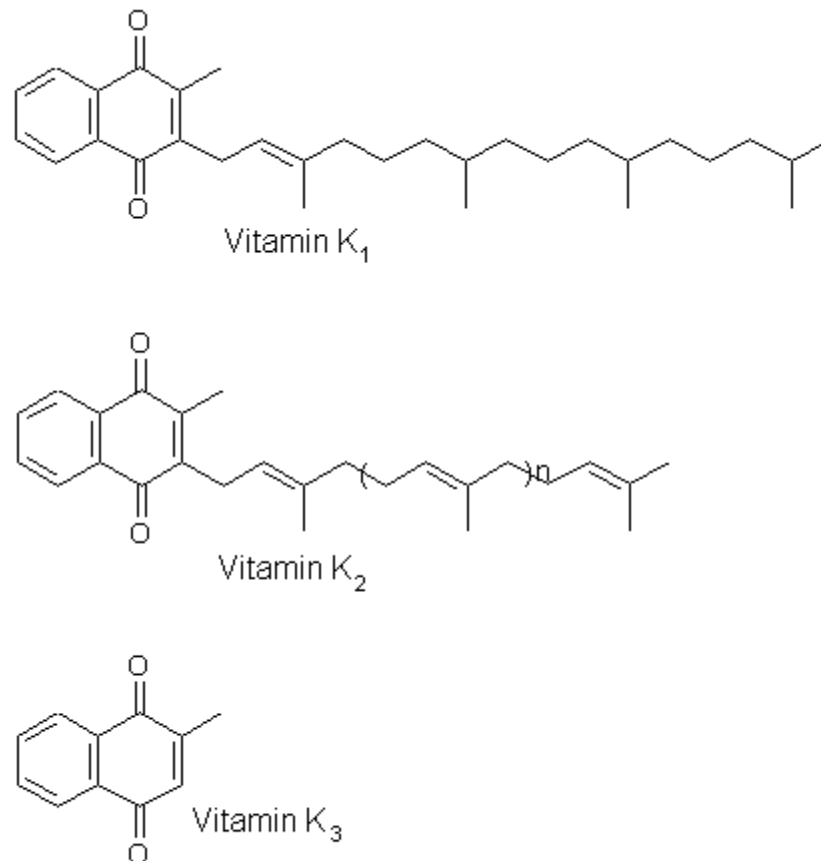


Abbildung 3: Strukturformeln von Vitamin K₁, K₂ und K₃

In vielen epidemiologischen Studien wurde der Zusammenhang zwischen Vitamin K und dem Knochenstoffwechsel untersucht. Erstmals konnten Hart et al. (1984) bei Osteoporosepatienten mit Oberschenkelhalsfraktur erniedrigte Werte an Vitamin K₁ feststellen. In weiteren Studien wurde der Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Vitamin K und dem Auftreten von Oberschenkelfrakturen bestätigt. Hodges et al. (1993) zeigten, dass Frauen mit Hüftfrakturen erniedrigte Serumwerte von Phylloquinon und Menaquinonen haben. Auch Booth et al. (2000) fanden einen Zusammenhang zwischen der niedrigen Aufnahme von Vitamin K und dem Risiko für eine Fraktur, allerdings gab es keinen Zusammenhang zur Knochendichte. In einer neuen Studie kamen Booth et al. (2003) allerdings zu dem Ergebnis, dass die Knochendichte an Hüfte und Wirbelsäule bei höherer Vitamin K-Aufnahme steigt. Weitere Studien untersuchten den Einfluss von Vitamin K auf die Carboxylierung von Osteocalcin und damit dessen Affinität zu Hydroxylapatit. Bei einem erhöhten Spiegel an untercarboxyliertem Osteocalcin (ucOC) besteht für Frauen ein höheres Risiko

eine Hüftfraktur zu erleiden (Szulc et al., 1993, Szulc et al., 1996; Vergnaud et al., 1997). Außerdem ist eine Erhöhung des ucOC mit einer niedrigeren Knochendichte korreliert (Szulc et al., 1994, Jie et al., 1996). Wehr (1998) konnte bei Patienten mit Totalendoprothese des Hüftgelenkes und bei Frauen mit postmenopausaler Osteoporose eine signifikante, positive Korrelation zwischen Vitamin K₁ und Osteocalcin im Serum nachweisen. UcOC hingegen zeigte einen negativen Zusammenhang zum Vitamin K₁-Spiegel.

Auch in verschiedenen Interventionsstudien wurden diese Beobachtungen bestätigt. Orimo et al. (1998) beschrieben einen Anstieg der Knochendichte bei osteoporotischen Frauen nach sechsmonatiger Gabe von 90 mg Vitamin K₂ pro Tag. Durch die Aufnahme von 45 mg Vitamin K₂ pro Tag über zwei Jahre, konnten Shiraki et al. (2000) eine niedrigere Inzidenz von Frakturen, sowie eine höhere Knochendichte bewirken.

Bei der Therapie von Osteoporose durch die Gabe von 45 mg/d Vitamin K₂ wurde auch bei Patienten mit vermutetem Vitamin K-Mangel keine Aktivierung der Blutgerinnung festgestellt, was für eine sichere Anwendung der Substanz spricht (Asakura et al., 2001). Schurgers et al. (2002) konnten allerdings bei Patienten, die oral Antikoagulanzen einnahmen, eine Beeinflussung der Gerinnungsparameter durch die Aufnahme von mehr als 150 µg/d Vitamin K₁ nachweisen. Dies muss daher bei einer Osteoporosetherapie und –prophylaxe mit Vitamin K beachtet werden.

Auch im Tiermodell ovariektomierte Ratte wurde die Wirkung von Vitamin K untersucht.

Die Fütterung von Vitamin K₂ ad libitum konnte bei ovariektomierten Ratten das Absinken des Trockengewichtes des Femurs, sowie das Absinken des Calciumgehaltes verhindern (Yamaguchi et al., 1999). Mawatari et al. (2000) konnten außerdem mit Mikrocomputertomographie zeigen, dass Vitamin K₂ in der Lage ist den trabekulären Knochenverlust bei ovariektomierten Ratten zu verringern.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids)

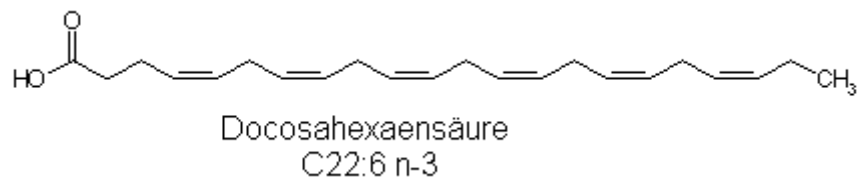
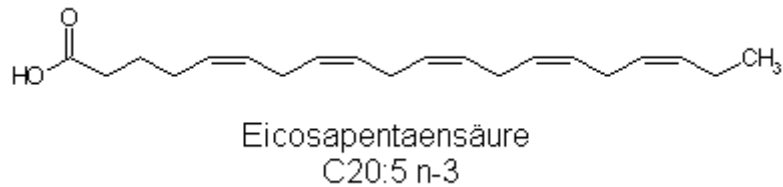
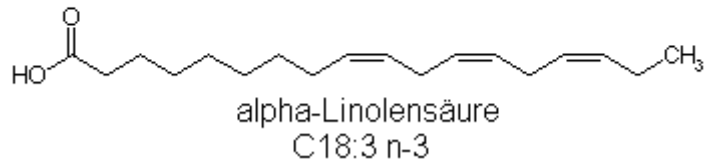
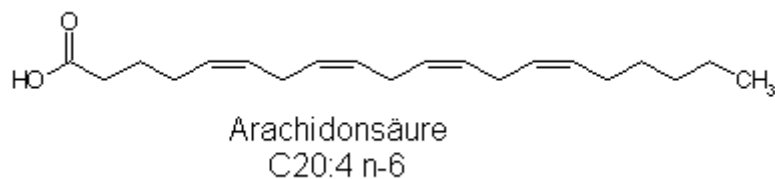
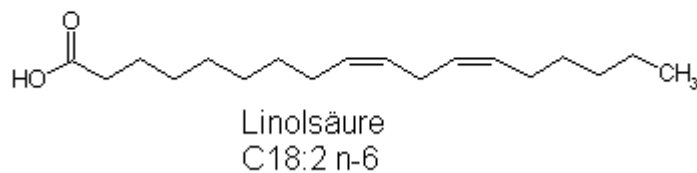
Fettsäuren sind Carbonsäuren mit Kohlenwasserstoffkette. Die Zahl der Kohlenstoff-Atome der natürlichen Fettsäuren ist stets gerade und variiert zwischen 2 und 24 Kohlenstoffatomen. In höheren Pflanzen und Tieren treten vorwiegend längerkettige, unverzweigte Fettsäuren mit 16 oder 18 Kohlenstoffatomen auf. Besitzt eine Fettsäure eine oder mehrere Doppelbindungen, so bezeichnet man sie als ungesättigte Fettsäure, ohne Doppelbindung als gesättigte.

Bei den ungesättigten Fettsäuren wird zwischen den einfach (mono-) und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) unterschieden. Sie werden nach Stellung und Anzahl ihrer Doppelbindungen eingeteilt. Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren werden in Omega-6- (oder n-6) bzw. Omega-3- (oder n-3) Fettsäuren eingeteilt, je nachdem, ob ihre erste Doppelbindung am sechsten, bzw. dritten Kohlenstoffatom liegt, ausgehend vom Omega-Kohlenstoffatom, das sich mit einer Methylgruppe am distalen Ende der Kette befindet.

Die PUFA sind essentiell und müssen mit der Nahrung aufgenommen werden. Im Körper werden dann aus Linolsäure (LA, eine Omega-6-Fettsäure) und alpha-Linolensäure (ALA, eine Omega-3-Fettsäure), längerkettige Fettsäuren mit neuen Doppelbindungen gebildet. Omega-3-Fettsäuren sind vor allem in Algen, aber auch in den sich davon ernährenden Fischen vorhanden. Omega-6-Fettsäuren, vor allem Linolsäure, kommen in den Samen vieler Pflanzen und deren Ölen vor, wie z.B. Sonnenblumen-, Distel-, Maiskeim- und Sojaöl, vor.

Es ist schon lange bekannt, dass die PUFAs und unter ihnen in erster Linie die Omega-3-Fettsäuren, eine wichtige Rolle bei der Prävention und auch Therapie bestimmter Krankheiten spielen. Vor allem die Wirkung der Omega-3-Fettsäuren bei kardiovaskulären Erkrankungen wurde schon vielfach untersucht (von Schacky, 2000).

Ein Zusammenhang zwischen PUFAs und dem Knochenstoffwechsel wurde von Buck et al. (1991) vermutet, der bei Ratten mit induzierter Nephrocalcinose durch die Gabe von Fischöl, das einen hohen Anteil der Omega-3-Fettsäure Eicosapentaensäure (EPA) besitzt, die Calciumausscheidung im Urin verringern konnte.

Omega-3-Fettsäuren**Omega-6-Fettsäuren****Abbildung 4: Strukturformeln einiger Fettsäuren**

Bei ovariektomierten Ratten konnten Sakaguchi et al. (1994) durch die Fütterung von EPA einen Verlust an Knochengewicht und Stärke des Knochens verhindern. In weiteren Studien an Ratten wurde meist das Verhältnis von Omega-3- zu Omega-6-Fettsäuren untersucht. Claassen et al. (1995) konnten durch die Fütterung von gamma-Linolensäure und Eicosapentaensäure in einem Verhältnis von 3 zu 1 einen

höheren Calciumgehalt des Knochens und eine erniedrigte Ausscheidung an Crosslinks im Urin bewirken. Ein höherer Anteil an Omega-3-Fettsäuren bewirkte bei Ratten einen Anstieg sowohl der Alkalischen Phosphatase, als auch der knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase. Ex vivo wurde die Prostaglandin E₂ Produktion gesenkt und die Knochenformationsrate gesteigert (Watkins et al., 2000). Wie die PUFA ihre Wirkung auf den Knochen entfalten ist nicht eindeutig geklärt. Sie wirken sowohl auf den Calciumstoffwechsel, indem sie die Calciumabsorption im Darm steigern, die Calciumexkretion im Urin reduzieren (Kruger und Horrobin, 1997), als auch auf die Synthese von lokalen Faktoren, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen. Einen wichtigen Mediator stellt dabei Prostaglandin E₂ (PGE₂) dar. PGE₂ wird aus Arachidonsäure synthetisiert und stellt einen potenten Stimulator der Knochenresorption dar (Watkins et al., 2001). Omega-3-Fettsäuren sind in der Lage die PGE₂ Produktion ex vivo zu senken, dies konnte sowohl in Hühnern (Watkins et al., 1996) als auch in Ratten (Li und Watkins, 1998; Watkins et al., 2000) gezeigt werden. Gleichzeitig wurde dabei auch eine Erhöhung der Knochenformation festgestellt. Auch eine Beeinflussung weiterer Faktoren, die den Knochenstoffwechsel regulieren, wie z.B. Leukotriene, ist möglich.

Adler (2002) konnte durch die Gabe von Omega-3-Fettsäuren aus Fischöl weder Veränderungen der Blutgerinnung, noch der Resorptions- oder -formationsmarker des Knochens bewirken. Allerdings wurden in dieser Studie gesunde, ausgewachsene Hunde verwendet, deren Knochenstoffwechsel sich im Gleichgewicht befand. Frischknecht (2003) erreichte durch die Fütterung von Omega-3-Fettsäuren aus Algen bei Hunden eine Verringerung von Pyridinolin und Deoxypyridinolin im Urin, sowie eine verminderte Ausscheidung von Calcium im Urin. Dies spricht dafür, dass die Knochenresorption durch PUFAs vermindert werden kann.

Beim Menschen liegen erst wenige Studien über die Wirksamkeit von PUFA zur Osteoporosetherapie bzw. -prävention vor.

Bassey et al. (2000) konnten durch die Gabe von PUFA und Calcium bei gesunden Frauen nach zwölf Monaten keine Beeinflussung der Knochendichte oder des Knochenturnovers erkennen. Kruger et al. (1998) untersuchten den Einfluss von PUFA bei Osteoporosepatientinnen. Die Gabe von gamma-Linolensäure und Eicosapentaensäure resultierte in einer unveränderten Knochendichte der

Lendenwirbelsäule und einem Anstieg der Knochendichte des Femurs nach 18 Monaten, im Gegensatz zu einem Absinken der Knochendichte in der Kontrollgruppe.

2.1.3. Möglichkeiten der Diagnostik von Knochenerkrankungen

2.1.3.1 Biochemische Parameter des Knochenstoffwechsels

Im Gegensatz zur statischen Messung der Knochenmasse z.B. durch Knochendichtebestimmung, sind biochemische Marker des Knochenstoffwechsels in der Lage, die Auf- und Abbauvorgänge des Knochens zu messen. Damit kann das dynamische und rasch wechselnde Stoffwechselgeschehen am Knochen erfasst werden. Die Knochenmarker („bone marker“) in Serum und Urin sind entweder Enzyme der knochenauf- oder -abbauenden Zellen oder Bestandteile des Knochens, die beim Auf- oder Abbau freigesetzt werden.

Neben dem großen Vorteil, der Erfassung der Dynamik des Knochenstoffwechsels, haben die Knochenmarker noch weitere Vorteile: Die Bestimmung der Marker ist nicht invasiv und mit keinerlei Strahlenexposition verbunden.

Nachteile sind allerdings, dass nicht zwischen Corticalis und Spongiosa unterschieden werden kann und auch keine Rückschlüsse auf die Lokalisation der Umbauvorgänge am Knochen gezogen werden können. Auch kann nicht zwischen intakter und zerstörter Knochenstruktur unterschieden werden, ebenso wenig die Anzahl aktiver knochenauf- und -abbauender Zellen von deren metabolischer Aktivität (Withold, 1996).

Die „bone marker“ stellen somit aber eine Ergänzung zu den statischen Messungen der bildgebenden Verfahren und der Histologie dar, können diese jedoch nicht ersetzen, da sie keine sicheren Rückschlüsse auf die Knochenstoffwechselsituation des individuellen Patienten erlauben (Mehl et al., 2002).

Es werden Marker des Knochenaufbaus und des Knochenabbaus unterschieden. Obwohl im gesunden Organismus diese Vorgänge miteinander gekoppelt sind,

sollten zur Beurteilung des Knochenstoffwechsels immer mindestens ein Formations- und ein Resorptionsmarker gemessen werden (Kushida et al., 1995). Um circadiane Schwankungen zu vermeiden, ist darauf zu achten, dass die Probennahme immer zu einem bestimmten Zeitpunkt erfolgt.

Tabelle 6: Marker des Knochenstoffwechsels
(nach Seibel, 1996; Liesegang, 2000)

Knochenformation	Herkunftsgewebe	Medium	Nachweismethode
Alkalische Phosphatase	Knochen, Leber, Niere Intestinum	Serum	Colorimetrie
knochenspezifische Alkalische Phosphatase	Knochen	Serum	ELISA
Osteocalcin	Knochen, Thrombozyten	Serum	ELISA, RIA
Carboxyterminales Propeptid	Knochen, Haut, Bindegewebe	Serum	ELISA

Knochenabbau			
Hydroxyprolin	Knochen, Knorpel, Bindegewebe, Haut, Nahrung	Urin	Colorimetrie, HPLC
Pyridinolin	Knochen, Knorpel, Bänder, Sehnen	Urin	HPLC, ELISA, RIA
Deoxypyridinolin	Knochen	Urin	HPLC, ELISA, RIA
Quervernetzte Teloptide (NTx, CTx und ICTP)	Knochen (Haut)	Urin, Serum	ELISA, RIA
Tartratresistente saure Phosphatase	Knochen	Serum	ELISA, Colorimetrie
Calciumausscheidung	Knochen, Nahrung	Urin	Photometrie

2.1.3.1.1. Biochemische Marker der Knochenformation

Gesamtalkalische und knochenspezifische Alkalische Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase (ALP) ist ein ubiquitär vorkommendes, membranständiges Enzym, das aus Isoenzymen besteht, die in verschiedenen Geweben gebildet und nachgewiesen werden können. Beim Menschen wird die ALP von vier Genen codiert. Man unterscheidet daher vier Isoenzyme, die nicht-gewebsspezifische, die intestinale, die plazentale und die Keimzell-ALP (Van Hoof, 1994), wobei das Gen der nicht-gewebsspezifischen ALP die Isoformen von Leber, Knochen und Niere codiert, die sich nur in ihrer posttranslationalen Glykosilierung unterscheiden (Moss, 1982).

Bei gesunden Erwachsenen besteht die Gesamtaktivität im Serum zu etwa gleichen Teilen aus Leber und Knochen, bei Wachsenden kann das knochenspezifische Isoenzym mit bis zu 90% überwiegen. Die Alkalische Phosphatase kann relativ einfach und preisgünstig bestimmt werden und liefert nach Ausschluss hepatischer Erkrankungen eine verlässliche Aussage über den Knochenstoffwechsel.

Genauere Aussagen über den Knochenstoffwechsel können durch Bestimmung der knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase (bone ALP, bALP) gewonnen werden, da sie besser mit dem Verlust von Knochenmasse korreliert (Dresner-Pollak et al., 1996). Vor allem bei bestehenden hepatischen Erkrankungen kann die Messung der bALP die diagnostische Spezifität erhöhen (Woitge et al., 1996).

Beim Hund sind, anders als beim Menschen, nur zwei echte Isoenzyme vorhanden, die intestinale und die nicht-gewebsspezifische ALP (Goldstein et al., 1980). Die leberspezifische ALP und die nierenspezifische ALP werden dabei vom selben Gen codiert wie die bALP, stellen also keine echten Isoenzyme dar, unterscheiden sich aber in ihrer organspezifischen, posttranslationalen Glykosylierung (Sanecki et al., 1993). Auch eine corticosteroidinduzierte ALP (cALP) kann im Serum von Hunden nachgewiesen werden, die wiederum vom selben Gen wie die intestinale ALP codiert wird (Sanecki et al., 1990).

Zur Messung der bALP im Serum von Hunden kann ein Humanassay verwendet werden. Allen et al. (2000a) fanden eine exzellente Kreuzreaktivität, sowie einen Korrelationskoeffizienten von 0,96 und eine Standardkurve, die zu der aus menschlichem Serum parallel ist. Allerdings muss darauf geachtet werden, dass die Probennahme jeweils zum selben Zeitpunkt geschieht, da die bALP auch beim Hund tageszeitlichen Schwankungen unterliegt (Ladlow et al., 2002).

Osteocalcin

Osteocalcin (OC) oder „bone gla protein“ ist ein nicht-collagenes Protein der Knochenmatrix. Da es nur von Osteoblasten in der Phase der Mineralisation der Matrix synthetisiert wird, stellt es einen sehr spezifischen Marker der Osteoblastenfunktion, bzw. der Mineralisation von Osteoid dar (Schmolke, 2001). In Abhängigkeit von Vitamin K wird das Protein posttranslational modifiziert und drei Glutamatreste carboxyliert. An diese gamma-Carboxyglutamat Reste kann wiederum Calcium binden. Etwa 80% des aktiven Osteocalcins werden in den Knochen eingebaut, der Rest wird in die Zirkulation abgegeben. Die genaue Funktion des Osteocalcins ist immer noch nicht geklärt.

Werden die drei Glutamatreste nicht vollständig carboxyliert, so entsteht untercarboxyliertes Osteocalcin (ucOC). Dies kann beim Menschen indirekt mit ELISA gemessen werden. UcOC korreliert negativ mit der Knochendichte (Szulc et al., 1994) und erhöhte Werte stehen mit einem erhöhten Risiko einer Hüftfraktur im Zusammenhang (Vergnaud et al., 1997).

Wie auch beim Menschen, unterliegt Osteocalcin beim Hund tageszeitlichen Schwankungen, was eine Probennahme zur selben Tageszeit voraussetzt (Liesegang et al., 1999).

Außerdem hat Osteocalcin nur eine sehr geringe Stabilität, da es schnell proteolytisch abgebaut wird. Bei Raumtemperatur (22°C) sind nach drei Stunden, bei 4°C sind nach sechs Stunden schon 25% weniger Osteocalcin im Serum nachweisbar. Es muss daher direkt nach der Probennahme bei weniger als -30°C eingefroren werden oder ein antiproteolytischer Zusatz verwendet werden (Baumgrass et al., 1999).

Da sich das Osteocalcin des Hundes von dem des Menschen in einigen Aminosäuresequenzen unterscheidet, muss für dessen Bestimmung ein speziesspezifischer Assay verwendet werden. Allerdings ist im Moment für den Hund kein kommerzieller Assay verfügbar.

Carboxyterminales Propeptid des Typ 1-Collagens (PICP)

Bei der Bildung von Typ 1 Collagen durch die Osteoblasten entsteht zuerst Procollagen Typ 1, das sowohl ein aminoterminaleres Endstück (PINP), als auch ein carboxyterminales Endstück (PICP) besitzt. Extrazellulär werden diese endständigen Extensionspeptide durch Endopeptidasen abgespalten und in die Zirkulation abgegeben (Seibel, 1996). Da sie im Verhältnis 1:1 zum neugebildeten Collagenmolekül stehen, stellen sie quantitative Marker der Knochenformation dar. PINP wird allerdings wieder zur Knochenneubildung verwendet und kann somit nicht als Marker dienen (Goldberg und Sherr, 1973). PICP kann sowohl mit Radioimmunoassays, als auch mit Enzymimmunoassays aus dem Serum bestimmt werden. Da jedoch keine Kreuzreaktivität mit dem caninen PICP besteht (Allen et al., 1998) können sie beim Hund nicht eingesetzt werden.

2.1.3.1.2. Biochemische Marker der Resorption

Urincalcium

Die Ausscheidung von Calcium im Urin ist bei gesteigertem Knochenabbau erhöht, ist aber auch in großem Maße von der Calciumaufnahme abhängig. Durch eine erhöhte Calciumaufnahme wird auch die Ausscheidung im Urin deutlich gesteigert (Fardellone et al., 1998). Kung et al. (1998) zeigten, dass bei osteoporotischen Frauen die Ausscheidung von Calcium im Urin erhöht ist. Mendez et al. (2002) fanden außerdem eine negative Korrelation zwischen Calciumausscheidung im Harn und der Knochendichte des Unterarms bei postmenopausalen Frauen.

Allerdings wird die Ausscheidung von Calcium im Urin auch von der Nierenfunktion, Calcium-regulierenden Hormonen, sowie Östrogen beeinflusst, was die Spezifität und Sensitivität dieses Markers stark einschränkt.

In der Humanmedizin wird morgendlicher Nüchternurin als diätunabhängige Größe angesehen, die einfach und kostengünstig bestimmt werden kann. Beim Hund müssen die tageszeitlichen Schwankungen durch die Sammlung von 24 Stunden-Urin ausgeglichen werden.

Hydroxyprolin

Hydroxyprolin ist eine modifizierte Aminosäure, die beim Abbau von Kollagen aus Prolinresten gebildet wird. Es wird in die Zirkulation abgegeben, zum Großteil in der Leber abgebaut und der Rest über die Niere ausgeschieden. Da das im Urin ausgeschiedene Hydroxyprolin nicht nur aus dem Knochenabbau, sondern auch aus dem Collagenabbau in anderen Geweben, aus neu synthetisiertem Collagen und aus der Nahrung (z.B. Fleisch, Gelatine) stammen kann, ist es ein wenig spezifischer Marker für die Knochenresorption (Seibel und Raue, 1993).

Pyridinolin und Deoxypyridinolin (Collagen-Crosslinks)

Die Collagen-Crosslinks stellen extrazelluläre Quervernetzungen zwischen den Collagenfibrillen, dem Hauptbestandteil der organischen Knochenmatrix dar. Dabei bilden sie eine Verbindung zwischen Aminosäuren des helikalen Teils des Moleküls und Resten des amino- oder carboxyterminalen (nicht helikalen) Teils eines anderen Moleküls. Während der Kollagenreifung werden aus drei Hydroxylysinresten Pyridinolin (Pyd) oder aus zwei Hydroxylysinresten und einem Lysinrest Deoxypyridinolin (Dpd) gebildet. Da die Crosslinks im Gegensatz zu Hydroxyprolin nur beim Collagenabbau freigesetzt werden, stellen sie sehr spezifische Resorptionsmarker dar.

Die verschiedenen Stützgewebe des Körpers enthalten unterschiedliche Anteile an Crosslinks: Knorpel enthält fast ausschließlich Pyd, Knochen enthält sowohl Pyd, als auch Dpd, beim Erwachsenen in einem Verhältnis von 3,5:1 (Eyre et al., 1988). In Bändern, Aorta und Dentin kommen kleine Mengen an Dpd vor.

Beim Hund wird je nach Alter Pyd und Dpd in einem Verhältnis von 7:1 bis 13:1 ausgeschieden (Allen et al., 2000b), beim Schwein wurden im Urin Werte von etwa 14:1 gemessen (Wirner, 1997), beim Schaf von etwa 7-8:1 (Rieder, 2000), bei der Ratte von 1,5:1 (Krammer, 2001).

Wird Knochengewebe abgebaut und die Collagene proteolytisch gespalten, so kommt es zur Freisetzung der Crosslinks. Diese werden aufgrund ihrer komplexen Struktur nicht weiter abgebaut und unterliegen einer raschen Elimination über die Niere (Calvo et al., 1996). Im Urin liegen sie als freie Crosslinkkomponenten (ca. 40%) oder in peptidgebundener Form (ca. 60%) vor.

Die Analyse der Crosslinks wird mittels HPLC durchgeführt, dies gilt als Referenzmethode des quantitativen Nachweises. Auch der Einsatz von Immunoassays ist möglich. Vor einer Messung mit HPLC müssen durch Aufbereitung der Proben mit Säurehydrolyse die Peptidbindungen gespalten werden (Black et al., 1988; Colwell et al., 1993). Nun liegen die Crosslinks in freier Form vor und nach weiterer Vorreinigung können dann die Konzentrationen an freiem Pyridinolin und Deoxypyridinolin in einem Lauf an der HPLC bestimmt werden (Wehr et al., 1997).

Dpd gilt derzeit als der beste Marker der Knochenresorption, da es eine Unterscheidung zwischen gesunden postmenopausalen Frauen und Osteoporosepatientinnen erlaubt (Seibel et al., 1993) und es den besten diagnostischen Wert für die Beurteilung von Osteoporose besitzt (Yilmaz et al., 1999). Daher werden die Collagen-Crosslinks häufig in der Osteoporoseforschung und –diagnostik eingesetzt (Rambeck et al., 1996).

Auch beim Hund ist diese Methode einsetzbar, da der Nachweis der Crosslinks speziesunabhängig mittels Detektion ihrer Eigenfluoreszenz erfolgt. Messungen der Crosslinks wurden sowohl bei Hunden, als auch bei Schweinen und Pferden durchgeführt (Wehr et al., 1997). Um einen Einfluss der circadianen Rhythmik der Crosslink-Ausscheidung zu verhindern, wird die Messung im 24 Stunden-Urin durchgeführt und auf die Creatininkonzentration im Urin bezogen.

Quervernetzte Telo peptide

Neben den peptidfreien Collagen-Crosslinks können auch die peptidgebundenen Formen zur Messung der Knochenresorption verwendet werden. Mit Immunoassays ist die Messung der amino- (NTx) oder carboxyterminalen (CTx) Telo peptide des Typ 1 Collagens im Urin, sowie des quervernetzten carboxyterminalen Telo peptides (ICTP) im Serum möglich.

Ein Nachteil dieser Messung ist die mangelnde Spezifität. Durch die Antikörper der Assays wird zwar die Struktur der Telo peptide erkannt, allerdings können die daran gebundenen Crosslinks nicht differenziert werden. Daher kann nicht zwischen Telo peptiden aus dem Knochen und z.B. der Haut unterschieden werden. Außerdem ist eine hohe individuelle Variabilität vorhanden (Scariano et al., 2002).

Trotz dieser geringen Spezifität gibt es Studien, die beim Menschen eine Korrelation mit der Knochenresorption und mit anderen Knochenmarkern festgestellt haben (Seifert-Klauss et al. 2002; Rico et al. 2002).

Bei Hunden ist der Zusammenhang zwischen ICTP und der Knochenresorption noch nicht durch histomorphometrische Studien belegt worden, was die Verwendung der Assays einschränkt.

Tartratresistente saure Phosphatase (TRAP)

Dieses lysosomale Enzym wird von aktiven Osteoklasten während der Knochenresorption synthetisiert und sezerniert. Die Aktivität der TRAP ist in der Postmenopause und bei Osteoporose erhöht (De la Piedra et al., 1989). Allerdings konnte in einer Studie von Halleen et al. (2002) gezeigt werden, dass nur das Isoenzym 5b negativ mit der Knochendichte korreliert, nicht aber das Isoenzym 5a.

Im Serum verliert die TRAP jedoch innerhalb kürzester Zeit stark an Aktivität, außerdem können TRAP-Inhibitoren im Serum vorhanden sein. Daher ist die TRAP ein Marker von geringer Sensitivität und ein Nachweis hat nur geringe Bedeutung (Ballanti et al., 1997).

2.1.3.2. Bildgebende Verfahren

2.1.3.2.1. Röntgenaufnahmen

Röntgenaufnahmen sind ein wesentlicher Bestandteil der Diagnostik einer klinisch manifesten Osteoporose. Durch Aufnahmen der Brust- und Lendenwirbelsäule können Frakturen und morphologische Veränderungen erkannt und Differentialdiagnosen, wie Entzündungen und Tumoren ausgeschlossen werden. Zur Frühdiagnose von Osteoporose ist Röntgen allerdings ungeeignet, da erst ein Knochenmasseverlust von über 30% erkannt werden kann.

2.1.3.2.2. Osteodensitometrie

Bei der Osteodensitometrie erfolgt die Messung der Knochendichte (bone mineral density, BMD) oder des Mineralgehalt des Knochens (bone mineral content, BMC).

Die Messung der Knochendichte hat einige Vorteile: Sie ändert sich nur langsam und stellt somit eine statische Messung des Knochenzustandes dar. Die Messungen sind sehr präzise und es besteht eine geringe intraindividuelle Variabilität. Außerdem stellt die Osteodensitometrie die anerkannte Methode zur Diagnose von Osteoporose dar (Looker et al., 2000).

Für die Messung der Knochendichte stehen verschiedene Messmethoden zur Verfügung:

Photonenabsorption

Bei der Photonenaabsorption erfolgt die Messung der Knochendichte durch Messung der Abschwächung eines Röntgen- oder Photonenstrahls durch das Hydroxylapatit des Knochens.

Dabei werden Spongiosa und Corticalis am Messort flächig abgebildet und integral als Masse pro Fläche vermessen. Allerdings wird nicht die physikalische Dichte bestimmt, sondern die Masse calciumhaltiger Kristalle pro Volumen (Kann, 2001).

Das DEXA-Verfahren (dual energy X-ray absorptiometry), bei der als Photonenquelle ein Röntgenröhre dient, gilt als optimale Methode zur Bestimmung der Knochendichte (Consensus Development Conference, 1993). Die Messung wird meist an Wirbelsäule, oder Oberschenkelhals ausgeführt, kann aber auch an jeder anderen Körperregion durchgeführt werden.

Vorteile dieser Methode sind die geringe Strahlenbelastung, die internationale Standardisierung, die gute Verfügbarkeit, sowie die hohe Präzision von 1-2% (Riggs und Melton, 1995). Nachteile sind die fehlende Unterscheidung zwischen trabekulärem und corticalem Knochen und die Möglichkeit der Verfälschung von Messergebnissen um bis zu 20% durch Veränderungen des Knochenmarkes oder der extraossären Gewebezusammensetzung (Bolotin und Sievänen, 2001). Obwohl eine Verminderung der Knochendichte eine Voraussetzung für eine osteoporotische Fraktur ist, stellt die Messung der Knochendichte allein nur ein unzureichendes Kriterium für die Diagnose von Osteoporose dar, da zu viele Risikofaktoren nicht berücksichtigt werden (Gärtner, 2001).

Ultraschall

Bei dieser Messmethode wird Ultraschall verschiedener Wellenlängen eingesetzt und dessen Leitungsgeschwindigkeit oder die Schallabschwächung gemessen. Dadurch kann neben der Knochendichte auch die Elastizität des Knochens beurteilt werden. Hierbei wird keine ionisierende Strahlung eingesetzt und es kann an verschiedenen Körperstellen, wie Calcaneus oder Fingerphalangen, nicht aber direkt an Wirbelsäule oder Femurhals gemessen werden.

Ultraschall ist sowohl in der Lage Osteoporose und Osteopenie zu erkennen (Benitez et al., 2000), als auch das Frakturrisiko vorherzusagen (Hans et al., 1996). Es ist aber nicht möglich Osteoporose anhand der WHO-Kriterien mit Ultraschall zu diagnostizieren. Im direkten Vergleich konnten Massie et al. (1993) und Dubois et al. (2001) zeigen, dass DEXA den besseren prädiktiven Wert für die Knochendichte besitzt.

Computertomographie

Bei der Computertomographie kommt es wie bei der Photonenabsorption zur Schwächung von Röntgenstrahlen beim Durchtritt durch ein Objekt. Es werden Schichten in verschiedenen Projektionen vermessen, die dann zu einem Bild zusammengesetzt werden. Hierbei wird ein definiertes Volumen gemessen und das Messergebnis als Masse pro Volumen ausgedrückt. Man unterscheidet die quantitative Computertomographie (QCT) an der Wirbelsäule und die periphere Computertomographie (pQCT) an Radius oder Tibia. Auch die lokale Computertomographie wird als Alternative weiter entwickelt (Laib und Rüeggsegger, 1999).

Es entsteht ein überlagerungsfreies Schichtbild, bei dem corticaler und spongiöser Knochen unterschieden werden können. Dies, sowie eine hohe Präzision der Messung, sind Vorteile dieser Methode. Auch eine Unterscheidung zwischen Osteoporosepatienten mit schnellem oder langsamen Knochenverlust ist möglich (Dambacher et al., 1998). Bei ovariektomierten Mäusen hatte pQCT bei der Messung von Knochenmasseverlust eine höhere Sensitivität als DEXA (Andersson et al., 2001). Nachteile sind allerdings die höhere Strahlenbelastung, sowie mögliche Fehler in der Messung durch Knochenmarksfett und die komplizierte Wiederfindung der Messstellen (Kuiper et al., 1996, Genant et al., 2000).

Mikro-CT

Bei der Messung der Knochendichte kann kein Rückschluss auf die Mikrostruktur des Knochens gezogen werden. Da die Bruchfestigkeit des Knochens aber nicht nur von seiner Masse, sondern vor allem von Anzahl und Aufbau der Trabekel abhängt, stellen quantitative Messungen der Makro- und Mikrostruktur eine Verbesserung der Aussagen über die Stabilität des Knochens dar (Genant et al., 2000). Goulet et al. (1994) konnten zeigen, dass die Eigenschaften der einzelnen Trabekel, ebenso wie ihre Anzahl und ihr Zusammenspiel, die mechanischen Eigenschaften von spongiösem Knochen beeinflussen. Mikrocomputertomographie stellt eine Methode zur Darstellung und Beurteilung von trabekulärem Knochen in drei Dimensionen dar. Da diese Methode aber nur bei kleinen Proben in vitro angewendet werden kann, ist

ihre Anwendung auf Tiermodelle und post mortem Präparate beschränkt. Von Vorteil ist, dass die Biopsien nicht zerstört werden und somit noch für histologische oder weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen. Feldkamp et al. (1989) waren die ersten, die Mikrocomputertomographie zur Darstellung und Beurteilung von trabekulärem Knochen verwendeten. Das von Rüeggsegger et al. (1996) entwickelte erste kommerziell erhältliche Mikro-CT System kann mit einer Mikrofokus-Röntgenröhre Proben mit einem Durchmesser von bis zu 14 mm bei einer räumlichen Auflösung von 28 µm messen. In einem direkten Vergleich zwischen Histomorphometrie und Mikro-CT fanden Müller et al. (1999) hohe Korrelationen sowie gute Genauigkeit, was wiederum für die Mikro-CT zur Analyse der Knochenmorphologie und -architektur spricht. Bei Mäusen wurde außerdem eine hohe Korrelation zum mit DEXA gemessenen Knochenmineralgehalt festgestellt (Eckstein et al., 2002). Neben den primären Parametern Gesamtvolumen der Probe, Knochenvolumen, und Knochenoberfläche, können anhand von Modellen andere Parameter, wie Anzahl und Dicke der Trabekel, sowie deren Abstand, berechnet werden (Parfitt et al., 1987). Dabei muss aber immer beachtet werden, dass bei Abweichungen der Probe vom idealen Modell diese Parameter beeinflusst werden. Durch direkte Messungen im dreidimensionalen Bild können diese Parameter unabhängig von einem Modell gemessen werden (Hildebrand und Rüeggsegger, 1997a; Hildebrand et al., 1999). Des Weiteren kann der „structure model index“ (SMI) bestimmt werden, der eine Aussage über die Form der Trabekel liefert (Hildebrand und Rüeggsegger, 1997b).

2.2. Hunde als Tiermodell für die Osteoporoseforschung

Basierend auf der Definition von Wessler (1976) kann ein Tiermodell für die postmenopausale Osteoporose wie folgt definiert werden: ein lebendes Tier, in dem spontaner oder induzierter Knochenverlust aufgrund ovariellen Hormondefizits untersucht werden kann und die Charakteristika des Knochenverlustes und seiner Folgen denen der postmenopausalen Frauen in einem oder mehreren Aspekten gleichen (Kalu, 1991). Obwohl die Stoffwechselfvorgänge von Tier und Mensch nie identisch sind, ist es dennoch sinnvoll die verschiedenen Aspekte des Knochenverlustes am Tiermodell zu untersuchen.

Ein Tiermodell sollte drei Bedingungen erfüllen: Einfachheit (Haltung, Fütterung, tierärztliche Versorgung), Vergleichbarkeit mit den physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen des Menschen und Vergleichbarkeit anderer Phänomene, die mit der Krankheit zusammen hängen.

Laut „Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the treatment or prevention of postmenopausal osteoporosis“ der „Food and Drug Administration“ von 1994 sollen Wirkstoffe jeweils an zwei Tiermodellen untersucht werden, der ovariectomierten Ratte, sowie einem zweiten Modell (Thompson et al., 1995).

Für Studien am menschlichen Skelettsystem stellt der Hund, neben der Ratte ein gutes Modell dar, da Ähnlichkeiten in Remodeling Prozess des Knochens bestehen (Bellino, 2000). Ein großer Vorteil ist das Haverssche Remodeling des corticalen Knochens, das beim Hund, wie auch beim Menschen vorhanden ist, der Ratte allerdings fehlt (Hartke, 1998).

Allerdings müssen beim Hervorrufen einer künstlichen Menopause durch Ovariectomie oder Ovariohysterektomie beim Hund einige Aspekte beachtet werden. Hunde haben aufgrund ihres saisonal monoöstrischen Zyklus mit einem mehrere Monate andauernden Anöstrus niedrigere Östrogenspiegel als Frauen. Daher ist es möglich, dass das Skelett des Hundes auf das Absinken der Sexualhormone nicht so deutlich reagiert wie das des Menschen (Miller et al., 1995). Ein weiterer Nachteil ist, dass durch die Ovariectomie oder Ovariohysterektomie ein abruptes Absinken des Hormonspiegels verursacht wird. Bei Frauen in der Menopause kommt es dagegen zu einem langsamen Absinken der Östrogene und Gestagene. Allerdings ist die jährliche Rate des Knochenturnovers beim Hund aufgrund seiner kürzeren Lebenserwartung deutlich höher als beim Menschen. Draper (1994) geht von einem Umbau der Corticalis von 10%, bzw. einem Umbau der Spongiosa von 50% pro Jahr aus. Martin et al. (1981) fanden außerdem bei Beagles einen altersabhängigen Knochenverlust, der einer senilen Osteoporose entspricht.

Nach Ovariectomie bzw. Ovariohysterektomie zeigen Hunde in unterschiedlicher Weise einen vorübergehenden Anstieg der Remodeling Aktivität des corticalen und spongiosen Knochens. Ovariectomierte Beagles wurden schon in vielen Studien als Tiermodell für die postmenopausale Osteoporose verwendet, allerdings mit sehr kontroversen Ergebnissen.

Martin et al. (1987) verfolgten die Veränderungen nach OVX bei Beagles über insgesamt elf Monate. Nach zwölf Wochen war ein deutlicher Anstieg des Osteocalcins erkennbar, der bis zum Ende des Versuchs deutlich über den Werten der Kontrollgruppe lag. Die Alkalische Phosphatase zeigte keinen Anstieg. Ein Verlust an corticalem Knochenmineralgehalt, war nur vorübergehend während der ersten zwölf Wochen post OVX sichtbar. Allerdings konnte nach elf Monaten ein Verlust an trabekulärem Knochen von 15% am Lendenwirbelkörper nachgewiesen werden.

Faugere et al. (1990) zeigten, dass bei Beagles schon nach einem Monat post OVX Veränderungen an Knochenbiopsien aus dem Ilium histomorphometrisch erkennbar sind. Das Volumen der Trabekel sinkt, der Abstand zwischen den Trabekeln steigt. Nach drei Monaten zeigt sich ein Anstieg des Volumens, sowie der Oberfläche des Osteoids. Außerdem steigt die Anzahl der Osteoblasten an. Histologisch war allerdings keine Veränderung in der Knochenresorption nachweisbar. Trotzdem kann aufgrund der Veränderungen an Knochenvolumen, Trabekelvolumen und Trabekelabstand von einer gesteigerten Resorption kurz nach OVX ausgegangen werden.

In einer weiteren Studie, bei der auch die Wirkung eines Bisphosphonates untersucht wurde, fanden Monier-Faugere et al. (1993) einen Monat post OVX einen signifikanten Verlust an trabekulärem Knochenvolumen, sowie einen vergrößerten Abstand zwischen den Trabekeln in den Knochenbiopsien. Die Erosionstiefe war bei gleichbleibender Anzahl der Osteoklasten erhöht. Auch Parameter der Knochenformation waren nach einem Monat erhöht. Dies zeigt, dass schon früh nach OVX die Resorption durch die Osteoklasten ansteigt und einen Verlust an Knochenvolumen bewirkt.

Monier-Faugere et al. (1996) fanden in einer weiteren Studie schon zwei Wochen post OHX einen Anstieg der Tiefe der Erosionslakunen bei gleichbleibender Osteoklastenzahl. Daher wird ein früher Anstieg der Aktivität der Osteoklasten angenommen. Zu diesem Zeitpunkt war außerdem schon eine Tendenz zum Absinken des Knochenvolumens erkennbar, allerdings ohne Änderung der Dicke der Trabekel. Das Knochenvolumen war einen Monat post OHX signifikant erniedrigt und blieb dann stabil. Osteoidvolumen und –oberfläche stiegen einen Monat nach OHX an, ebenso die Anzahl an Osteoblasten, die nach vier Monaten immer noch erhöht

war. Die Erosionstiefe war einen Monat nach OHX ebenfalls erhöht, zeigte jedoch nach vier Monaten keinen Unterschied mehr zu den Ausgangswerten. Daher ist nur von einem vorübergehenden Anstieg der Aktivität der Osteoklasten auszugehen.

Auch in einer neueren Studie von Monier-Faugere et al. (1999) zur Therapie mit Bisphosphonaten konnte in Knochenbiopsien von Beagles bei OHX und nach vier Monaten ein Absinken des trabekulären Knochenvolumens gezeigt werden. Auch der Abstand zwischen den Trabekeln war erhöht, die Dicke der Trabekel jedoch unverändert. Der Knochenturnover war signifikant erhöht.

Ebenso untersuchten Malluche et al. (1986b) Knochenbiopsien aus dem Ilium vor und vier Monate nach Ovariectomie. Histomorphometrisch zeigte sich ein Absinken der trabekulären Knochenmasse, sowie eine geringere Dicke der Trabekel und ein größerer Abstand zwischen den Trabekeln. Die Anzahl der Osteoblasten stieg, die Knochenformation pro Osteoblast sank jedoch. Eine Veränderung der Knochenresorption war nicht erkennbar. Daher wird eine Insuffizienz der Osteoblasten angenommen, die trotz erhöhter Anzahl an Zellen den Funktionsverlust der Osteoblasten nicht kompensieren kann.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Dannucci et al. (1987). Sie entnahmen Beagles Biopsien aus dem Ilium bei OVX und nach sechs Monaten. In der Histomorphometrie zeigte sich ein Anstieg an Osteoidoberfläche, Resorptionsoberfläche und Knochenformationsrate. Das trabekuläre Volumen sank, allerdings nicht signifikant. Auch die Resorptionsrate stieg nicht signifikant. Osteocalcin war nach acht Wochen und bis zum Ende des Versuchs erhöht. Daher wird ein gesteigertes Knochen-Remodeling, ähnlich der „high-turnover“ Osteoporose angenommen.

Drezner und Nesbitt (1990) konnten sowohl vier, als auch acht Monate nach OHX einen Verlust an Knochendichte in Lendenwirbeln bestimmen. Dieser blieb auch zwölf Monate nach OHX noch erhalten.

Um die längerfristigen Veränderungen am Knochen zu untersuchen, entnahmen Yamaura et al. (1993) Beagles 31 Monate post OHX Femur und Lendenwirbel für mechanische Tests und Messung der Knochendichte. Während sich am Femur keine Veränderungen zeigten, sank der Mineralgehalt der Wirbel ab, allerdings nicht signifikant. Auch die mechanischen Parameter waren nach OHX deutlich reduziert. In der Histomorphometrie zeigte sich ein Verlust an Trabekelzahl, sowie ein Anstieg des Abstandes der Trabekel, die Dicke der Trabekel blieb unverändert. Am corticalen Knochen waren keine Veränderungen erkennbar.

Allerdings scheinen all diese Veränderungen nicht ausreichend lang zu dauern, um einen längerfristigen Einfluss auf die Mikrostruktur des Knochens oder dessen Stärke zu haben.

Boyce et al. (1990) entnahmen Beagles nach Ovariohysterektomie Biopsien aus dem Ilium nach einem, drei, sechs und zehn Monaten. Nach einem Monat war ein vorübergehender Anstieg der Knochenformation mit erhöhter Formationsrate erkennbar. Nach sechs Monaten sanken Formationsrate und mineralisierte Oberfläche unter die Werte vor OHX. Auch die Funktion der Osteoblasten war beeinträchtigt. Nach zehn Monaten war kein Unterschied zu Werten vor OHX mehr erkennbar. Allerdings war zu keinem Zeitpunkt das Knochenvolumen reduziert. Daher stellen die Veränderungen nach OHX eine Folge von vorübergehenden Phänomenen dar, die insgesamt jedoch nur einen geringen Einfluss auf den Knochen haben.

Shen et al. (1992) dagegen konnten fünf Monate nach OHX keine Unterschiede in der Histomorphometrie nachweisen. Weder die Knochendichte, noch die histomorphometrischen Parameter trabekuläres Knochenvolumen, Osteoidoberfläche und Knochenformationsrate waren verändert.

Der Einfluss auf den corticalen Knochen scheint dabei geringer zu sein als auf den trabekulären. Wilson et al. (1998) nahmen Beagles bei OVX, sowie nach einem, vier und 8,5 Monaten Biopsien aus den Rippen und untersuchten den corticalen Knochen. Sie fanden nach vier Monaten eine deutlich gesteigerte Knochenformation, die nach 8,5 Monaten wieder auf die Werte bei OVX abfiel. Die Porosität des corticalen Knochens stieg an und blieb auch nach 8,5 Monaten noch erhöht. Hier zeigt sich, dass der corticale Knochen anscheinend später und nur zu einem geringeren Ausmaß als spongiöser Knochen auf die OVX reagiert.

Der Knochenverlust nach Ovariectomie, bzw. Ovariohysterektomie beim Hund scheint daher auf einer Folge vorübergehender Veränderungen zu beruhen.

Schon etwa einen Monat nach OVX oder OHX beginnt ein Knochenverlust, wodurch das Volumen der Trabekel sinkt und der Abstand zwischen den Trabekeln steigt. In dieser Initialisierungsphase ist der Knochenturnover, wie auch bei der postmenopausalen Osteoporose, erhöht. Die Aktivität der Osteoklasten steigt, wobei deren Anzahl unverändert bleibt.

Ab etwa zwei Monate post OHX folgt eine Erhaltungsphase, in der die Zahl der Osteoblasten ansteigt, der Knochenverlust allerdings nicht kompensiert werden kann und damit eine Insuffizienz der Osteoblasten vorliegt (Malluche und Faugere, 1990). Das Ausmaß des Verlustes an Knochenvolumen wird jedoch unterschiedlich bewertet. Während in einigen Studien ein Verlust an trabekulärem Knochenvolumen festgestellt wurde (Malluche et al., 1986b; Martin et al., 1987; Faugere et al., 1990), konnten andere Studien dieses Ergebnis nicht bestätigen (Dannucci et al., 1987; Boyce et al., 1990; Shen et al., 1992).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Hund sowohl im Aufbau als auch im Stoffwechsel des Knochens dem Menschen sehr ähnlich ist. Dennoch sind nach OHX nur vorübergehende und z.T. auch nur geringfügige Veränderungen des Skelettsystems messbar. Dies muss bei Verwendung von Hunden nach OHX als Tiermodell der postmenopausalen Osteoporose beachtet werden. Bei der Entnahme von Knochenbiopsien ist außerdem der Zeitpunkt von entscheidender Bedeutung.

3. Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung einer Kombination von Genistein, Vitamin D und K, sowie mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf den Knochenstoffwechsel des ovariohysterektomierten Hundes als Modelltier der postmenopausalen Osteoporose untersucht. Dazu wurden Parameter aus Blut und Urin bestimmt, sowie Knochenbiopsien entnommen und analysiert. Der Versuch wurde mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt.

3.1. Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Als Versuchstiere standen insgesamt zwölf weibliche Beagles des Institutes für Tierernährung zur Verfügung. Elf Tiere wurden im Februar 2000 aus der Zucht von Harlan-Winkelmann in Paderborn zugekauft, ein Hund war aus eigener Zucht.

Tabelle 7: Alter zu Beginn des Versuchs (in Monaten), Gruppenteilung und durchschnittliche Gewichte der Hunde (MW \pm Stabw) während des Versuchs (in kg)

Hundennummer	Alter in Monaten	Gruppe	Körpergewicht während des Versuchs in kg
1	28	Wirkstoff	10,8 \pm 0,23
2	28	Wirkstoff	10,5 \pm 0,22
3	28	Kontrolle	11,0 \pm 0,27
4	28	Wirkstoff	10,8 \pm 0,16
5	38	Kontrolle	10,0 \pm 0,13
6	28	Kontrolle	10,2 \pm 0,20
7	28	Kontrolle	11,6 \pm 0,20
8	28	Wirkstoff	11,1 \pm 0,23
9	28	Wirkstoff	10,9 \pm 0,30
10	28	Wirkstoff	10,6 \pm 0,23
11	28	Kontrolle	10,6 \pm 0,19
12	28	Kontrolle	12,2 \pm 0,22

Die Tiere wurden tagsüber jeweils zu viert in etwa 25m² großen Außenzwingern gehalten. In jedem Zwinger war ein Unterstand als Sonnen- und Regenschutz aufgestellt. Nachts waren die Hunde in etwa 5m² großen Einzelboxen auf Gummimatten mit Decken untergebracht.

Alle Hunde wurden regelmäßig geimpft und entwurmt.

3.2. Versuchsfutter

Als Versuchsfutter stand ein für diesen Versuch hergestelltes, handelsübliches Alleinfutter für Hunde zur Verfügung. Das Futter wurde frei von Vitamin D und Vitamin K hergestellt.

Tabelle 8: Nährstoffgehalte des Versuchsfutters nach institutseigener Weender Analyse

Nährstoffe	Futter Kontrollgruppe		Futter Wirkstoffgruppe	
	% uS	% TS	% uS	% TS
Rp	24,81	26,20	25,37	26,80
Rfe	7,95	8,40	7,05	7,45
Ra	6,30	6,65	6,72	7,10
Rfa	2,23	2,35	2,56	2,70
NfE	53,41	56,40	52,96	55,95
Feuchte	5,30		5,35	
TS	94,70		94,65	

Tabelle 9: Mineralstoff- und Spurenelementgehalte und Vitamine des Futters nach institutseigener Analyse (pro kg Futter)

Elemente	Futter Kontrollgruppe	Futter Wirkstoffgruppe
Ca	15,84 g	15,34 g
P	12,34 g	11,99 g
Na	2,05 g	2,03 g
K	2,99 g	2,90 g
Mg	1063 mg	1059,2 mg
Fe	288,6 mg	282,0 mg
Zn	192,5 mg	192,8 mg
Cu	19,35 mg	18,58 mg
Mn	50,40 mg	51,17 mg
Vitamin A	12000 IE	12000 IE
Vitamin E	200 mg	200 mg

3.3. Energiegehalt und -zuteilung

Der Energiegehalt des Futters wurde aus den einzelnen Nährstoffen berechnet. Dabei wurde die von Kienzle et al. (1998) veröffentlichte, verbesserte Methode zur Vorhersage des Energiegehaltes in Hunde- und Katzenfuttermitteln verwendet. Beim Hund wird die Energiebewertung auf Stufe der umsetzbaren Energie (metabolizable energy, ME) vorgenommen.

Zur Berechnung wurden die in der Weender Analyse ermittelten Gehalte an Rohnährstoffen verwendet, der Gehalt an stickstofffreien Extraktstoffen (NfE) wurde rechnerisch bestimmt:

$$\text{NfE (\%)} = \text{TS} - (\text{Rp} + \text{Rfe} + \text{Ra} + \text{Rfa})$$

Die Bruttoenergie (GE) wird durch Multiplikation der Nährstoffgehalte (in 100g uS) mit ihren Brennwerten berechnet:

$$\text{GE (MJ/100g)} = 0,024 \times \text{Rp} + 0,038 \times \text{Rfe} + 0,017 \times \text{Rfa} + 0,017 \times \text{NfE}$$

Die verdauliche Energie (DE) wird durch Multiplikation mit der Verdaulichkeit der GE berechnet. Die scheinbare Verdaulichkeit (sV) ist vom Rohfasergehalt in der TS abhängig:

$$\text{sV GE (\%)} = 91,2 - 1,43 \times \text{Rfa (\% TS)}$$

$$\text{DE (MJ /100g)} = \text{GE} \times \text{sV GE} / 100$$

Die umsetzbare Energie (ME) wird nun durch Abzug der Stickstoffkorrektur bestimmt. Die N-Korrektur ist wiederum abhängig vom Rohproteingehalt im Futtermittel, also in uS:

$$\text{ME (MJ/kg)} = \text{DE} - 0,00434 \times \text{Rp (g/kg)}$$

Tabelle 10: Berechneter Energiegehalt des Futters (in MJ/100g)

	Futter Kontrollgruppe	Futter Wirkstoffgruppe
Bruttoenergie (GE)	1,82 MJ/100g	1,84 MJ/100g
Scheinbare Verdaulichkeit	87,84%	87,33%
Verdauliche Energie (DE)	1,60 MJ/100g	1,60 MJ/100g
Umsetzbare Energie (ME)	1,49 MJ/100g	1,49 MJ/100g

Ziel der bedarfsgerechten Energiezuteilung war eine Gewichtskonstanz der Tiere während des Versuchszeitraums.

Die Gewichtskontrollen während des Versuchs erfolgten in regelmäßigen Abständen ein Mal wöchentlich.

Nach Meyer und Zentek (1998) liegt der Bedarf an umsetzbarer Energie bei Hunden im Mittel bei 0,42-0,56 MJ ME/kg $\text{KM}^{0,75}/\text{d}$.

Den Hunden wurde in diesem Versuch durchschnittlich $0,61 \pm 0,04$ MJ ME/kg $KM^{0,75}/d$ zugeteilt, da die Tiere durch die Gruppenhaltung in Zwingern, ihr temperamentvolles Verhalten und auch die z.T. kalten Außentemperaturen einen höheren Energiebedarf aufwiesen.

Tabelle 11: Energie- und Futterzuteilung der einzelnen Hunde (MW \pm Stabw)

Hunde- nummer	Energiezuteilung pro Tier in MJ ME/kg $KM^{0,75}/d$	Mittleres Körper- gewicht in kg	Mittlere Futter- zuteilung in g/d
1	0,64	$10,8 \pm 0,23$	258 ± 27
2	0,58	$10,5 \pm 0,22$	229 ± 26
3	0,63	$11,0 \pm 0,27$	257 ± 24
4	0,57	$10,8 \pm 0,16$	227 ± 18
5	0,64	$10,0 \pm 0,13$	240 ± 13
6	0,66	$10,2 \pm 0,20$	253 ± 28
7	0,64	$11,6 \pm 0,20$	271 ± 30
8	0,54	$11,1 \pm 0,23$	222 ± 21
9	0,58	$10,9 \pm 0,30$	234 ± 32
10	0,66	$10,6 \pm 0,23$	260 ± 28
11	0,57	$10,6 \pm 0,19$	224 ± 21
12	0,59	$12,2 \pm 0,22$	259 ± 31

Die Fütterung in den Einzelboxen erfolgte ein Mal täglich morgens.

Leitungswasser stand den Tieren zu jeder Zeit ad libitum zur Verfügung.

3.4. Versuchsgruppen

Die Tiere wurden in zwei Versuchsgruppen eingeteilt:

Kontrollgruppe:

ohne Zusatz von Genistein und PUFA

Vitamin D und K bedarfsgerecht

Da das Futter ohne Vitamin D und Vitamin K hergestellt wurde, mussten auch die Hunde der Kontrollgruppe mit diesen Vitaminen versorgt werden. Sie wurden täglich mit Hilfe von Kapseln in folgenden Dosierungen zugefüttert.

Vitamin D	10 IU/kg Körpergewicht
Vitamin K	1 µg/kg Körpergewicht

Die Supplementierung mit Vitamin D entsprach dabei den von Meyer und Zentek (1998) angegebenen Bedarfszahlen für adulte Hunde im Erhaltungsstoffwechsel. Da Hunde die z.T. erheblichen Mengen an Vitamin K, die die Darmflora synthetisiert, nutzen können, wurde versucht durch die niedrige exogene Gabe von Vitamin K den täglichen Bedarf von 10 µg/kg Körpergewicht nicht zu überschreiten.

Wirkstoffgruppe:

mit Zusatz von Genistein und PUFA

Vitamin D und K hochdosiert

Den Hunden der Wirkstoffgruppe wurden Genistein, Vitamin D, Vitamin K und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) pro Tag in den folgenden Dosierungen zugefüttert:

Genistein	15 mg /kg Körpergewicht
Vitamin D	1500 IU/kg Körpergewicht
Vitamin K	2000 µg/kg Körpergewicht
PUFA	12 g/kg Körpergewicht

Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (ROPUFA, 30' n-3 food oil, Roche, Basel, Schweiz) waren in einer Dosierung von 5% direkt in das Futter der Wirkstoffgruppe eingemischt, die Wirkstoffe Genistein, Vitamin D und K wurden den Hunden mit Kapseln zugefüttert.

3.5. Kapseln

Sowohl das Genistein, als auch die Vitamine D und K wurden den Hunden in Kapseln zugefüttert. Jeder Hund erhielt pro Tag, morgens mit der Fütterung, eine Kapsel.

Die Inhaltsstoffe der Kapseln wurden mit dem Füllstoff Lactose (Edelweiss Milchwerke, Kempten) in die Kapseln gefüllt. Als mittleres Körpergewicht der Hunde wurde 11 kg angenommen. Um die oben genannten Dosierungen zu erreichen musste jede Kapsel in der Kontrollgruppe 11 µg Vitamin K und 110 IU Vitamin D, in der Wirkstoffgruppe 165 mg Genistein, 22 mg Vitamin K und 16 500 IU Vitamin D enthalten.

Die Inhaltsstoffe Genistein (Roche Vitamins, Basel, Schweiz), Vitamin K (Dry Vitamin K1 5% SD, Roche Vitamins, Basel, Schweiz), Vitamin D (Rovimix D3-500, Roche Vitamins, Basel, Schweiz) wurden in Lactose eingemischt und in Hartgelatine-kapseln in der Größe 000 (Wepa, Hallbergmoos) gefüllt. Zur Herstellung der Kapseln wurde ein Kapselfüll- und Schließgerät Aponorm (Wepa, Hallbergmoos) verwendet.

Das mittlere Füllgewicht der Kapseln betrug 1,039 g. Die maximal zulässige Gewichtsschwankung der Kapseln wurde mit 5% festgelegt. Damit wurden nur Kapseln verwendet, deren Inhalt zwischen 0,987 g und 1,091 g lag. Damit lag auch die Schwankungsbreite der Wirkstoffe bei maximal 5%. Die Hunde der Kontrollgruppe erhielten daher täglich $11 \pm 0,55$ µg Vitamin K und $110 \pm 5,5$ IU Vitamin D. In der Wirkstoffgruppe bekamen die Hunde täglich $165 \pm 8,25$ mg Genistein, $22 \pm 1,1$ mg Vitamin K und $16\,500 \pm 825$ IU Vitamin D zugefüttert.

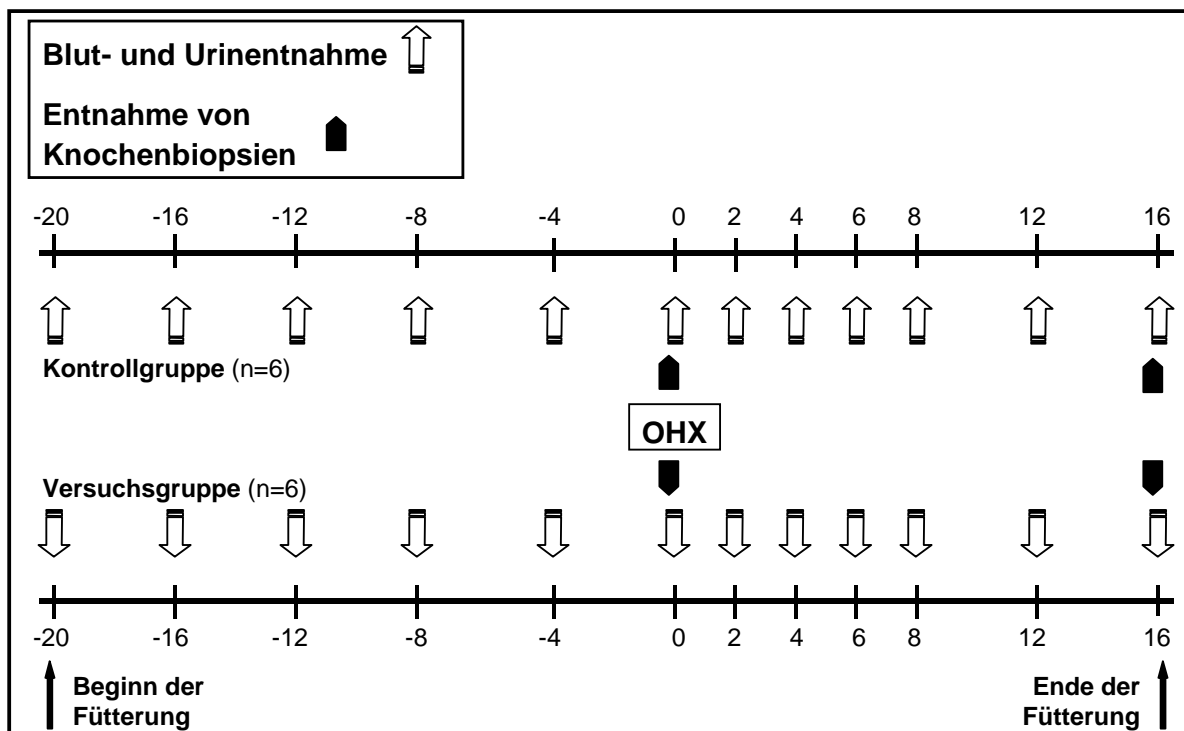
Sowohl in der Wirkstoff-, als auch in der Kontrollgruppe wurde den Hunden mit den Kapseln weniger als 1 g Lactose pro Tag verabreicht. Ausgewachsene Hunde vertragen bis zu 2 g/kg Körpermasse Lactose pro Tag problemlos (Meyer und Zentek, 1998), dies wurde mit Fütterung der Kapseln nicht erreicht.

3.6. Versuchsaufbau

Der Fütterungsversuch erstreckte sich über einen Zeitraum von neun Monaten.

Die Tiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt und über den gesamten Versuchszeitraum mit Kontrollfutter bzw. Wirkstofffutter und den Kapseln gefüttert. Während des Versuchs wurde in monatlichem, bzw. zweiwöchigem Abstand Blut abgenommen und Urin gewonnen.

Nach fünf Monaten wurden alle Tiere ovariohysterektomiert und eine Knochenbiopsie entnommen. Anschließend wurden die Hunde weitere vier Monate mit Kontroll- bzw. Wirkstofffutter gefüttert und am Versuchsende nochmals eine Knochenbiopsie entnommen.



3.7. Narkose und Operationsmethode

3.7.1. Narkose

Die Ovariohysterektomie, sowie die Entnahme der Knochenbiopsien wurden im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München unter Leitung von Prof. W. Erhardt und Durchführung von Dr. J. Henke unter Allgemeinnarkose vorgenommen.

Zuerst wurde den Hunden eine Braunüle (Venflon® Pro, Becton Dickinson Infusion Therapy, Helsingborg Schweden) in die Vena cephalica antebrachii gelegt. Als Sedativum erhielten die Hunde 0,5 mg/kg Midazolam i.v. (Midazolam-ratiopharm®, Ratiopharm, Ulm), als Narkoseeinleitung 8 mg/kg Propofol 1%ig i.v.. (Propofol 1%®, Fresenius, Bad Homburg). Anschließend wurden die Tiere intubiert (Tubus Rusch, Größe 6) und die Narkose mit Isofluran (Forene®, Abbott, Wiesbaden) und Propofol (5 ml/h) aufrechterhalten. Als Analgetikum wurde während der Operation alle 30 Minuten 0,5 ml Fentanyl (Fentanyl 0,5 mg Curamed, Curamed Pharma, Karlsruhe) i.v. verabreicht.

Während der Narkose wurden die Hunde beatmet und Blutdruck, Puls, Sauerstoffsättigung und Kohlendioxidexpiration überwacht.

Außerdem erhielt jedes Tier 30 Minuten vor Operationsbeginn 375 mg Cefuroxim (Cefuroxim®, Brahms, Wiesbaden) in 50 ml physiologischer Kochsalzlösung (Isotonische Natriumchlorid Lösung, Delta Select, Pfullingen) gelöst i.v. als Antibiose, sowie zur postoperativen Analgesie am Ende der Operation 4 mg/kg Carprofen s.c. (Rimadyl®, Pfizer, Karlsruhe) und 0,01 mg/kg Buprenorphin s.c. (Temgesic®, Essex, München).

3.7.2. Ovariohysterektomie

Die Ovariohysterektomie (OHX) geschieht durch Laparotomie in der Linea alba. Der Hautschnitt beginnt etwa einen Zentimeter kaudal des Nabels und reicht bis etwa zwei Zentimeter kranial des vorderen Schambeinrandes. Anschließend werden die Bauchmuskeln in der Linea alba durchtrennt und das Peritoneum eröffnet. Das Netz wird nach kranial verlagert und die Gebärmutter am Corpus uteri beginnend aus der Bauchhöhle vorgelagert. An beiden Eierstöcken werden Ligaturen am Mesovar gesetzt und dieses durchtrennt. Das Ligamentum latum uteri sowie das Ligamentum teres uteri werden stumpf bis dicht an die Zervix durchtrennt. Dann wird eine weitere Ligatur im Bereich der Vagina gesetzt und der Uterus kaudal der Zervix abgesetzt. Die Schleimhaut des Vaginalstumpfes wird exzidiert und die Wundflächen adaptiert. Anschließend wird die Bauchhöhle schichtweise verschlossen. Für die Ligaturen und die Nähte von Bauchdecke und Unterhaut wird resorbierbarer Faden verwendet (Vicryl® 4-0, Ethicon, Norderstedt), für die Hautnaht nicht resorbierbarer Faden (Prolene® 3-0, Ethicon, Norderstedt).

3.7.3. Entnahme der Knochenbiopsien

Nach Umlagerung in Seitenlage erfolgte die Entnahme der ersten Knochenbiopsien in der gleichen Operation.

Der Hautschnitt wird in einer Länge von ca. 5 cm über der Spina iliaca dorsalis cranialis des Os ilium durchgeführt. Nun werden der Hautmuskel, das Fettgewebe und die Fascia glutea durchtrennt und die Wundränder gespreizt. Außerdem werden der Musculus gluteus superficialis und medius mit einem Raspatorium von Knochen abgelöst. Die Entnahmestelle der Biopsie befindet sich etwas caudoventral der Crista iliaca im Bereich der Ala ossis ilii. Die Entnahme der Knochenbiopsie wird mit einem elektrischen Bohrer (Aesculap GA 207) und einem in Eigenarbeit im Klinikum rechts der Isar angefertigten Hohlmeißel durchgeführt. Dabei kann eine Probe von 8 mm Durchmesser gewonnen werden. Besonderen Wert wird darauf gelegt, dass die Probe sowohl die innere, als auch die äußere Corticalis enthält, sowie möglichst viel spongiöses Knochengewebe.

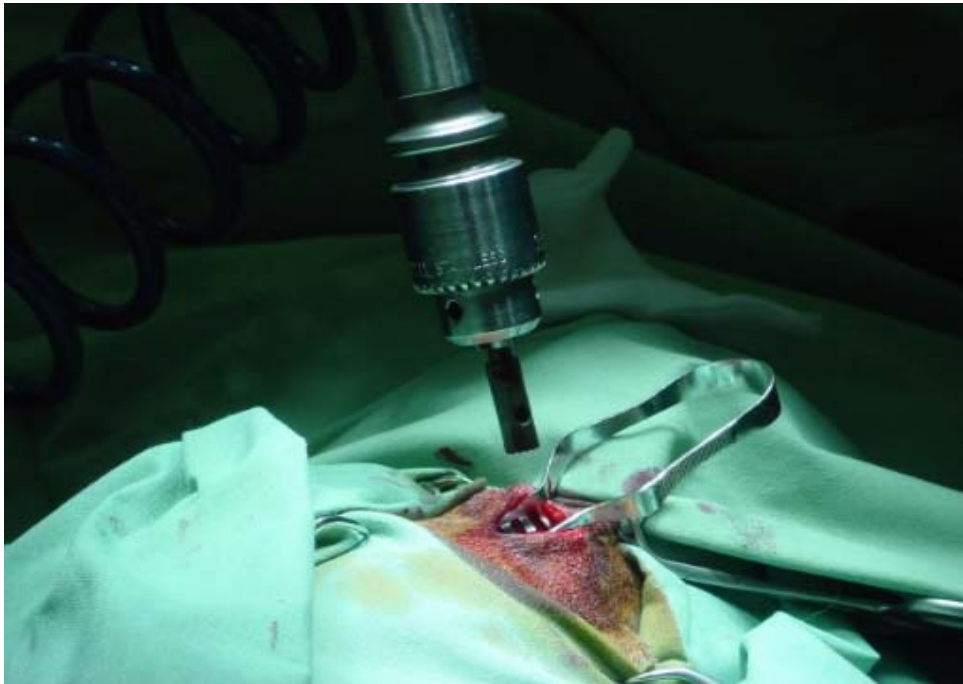


Abbildung 5: Entnahme der Knochenbiopsie aus dem Ilium

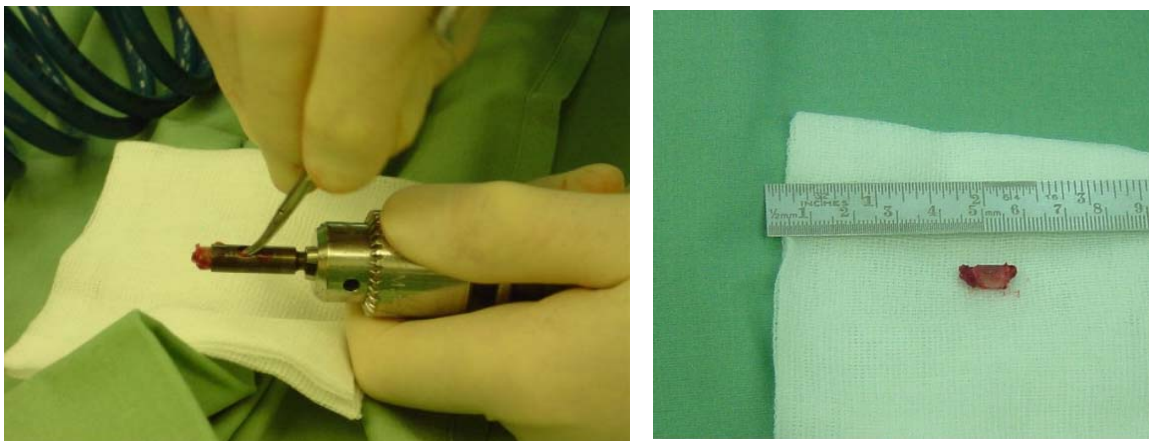


Abbildung 6: Knochenbiopiate nach Extraktion

Der entstandene Knochendefekt wird mit Knochenwachs (Ethicon, Norderstedt) aufgefüllt, um eventuelle Blutungen zu verhindern. Der Wundverschluss erfolgt schichtweise, Muskulatur mit Fascia glutaea, sowie Hautmuskel und Unterhaut mit resorbierbarem Faden (Vicryl® 4-0, Ethicon, Norderstedt), die Hautnaht mit nicht resorbierbarem Faden (Prolene® 3-0, Ethicon, Norderstedt). Anschließend wird die Naht mit Aluminiumspray (Heiland Silberspray, HLZ Logistik, Gallin) bedeckt und ein Pflasterverband angelegt.

Die erste Knochenbiopsie wurde aus dem rechten Os ilium entnommen, die zweite vier Monate nach der ersten auf der linken Seite. Dabei wurden die gleiche Narkose und Operationsmethode verwendet wie bei den ersten Biopsien.

3.7.4. Postoperative Versorgung

Postoperativ erhielten die Hunde nach etwa 8 Stunden erneut 0,01 mg/kg Buprenorphin s.c. (Temgesic®, Essex, München) zur Analgesie. Außerdem wurden sie über 3 Tage mit 2,5 mg/kg Enrofloxacin s.c. (Baytril®, Bayer, Leverkusen) und 4 mg/kg Carprofen p.o. (Rimadyl®, Pfizer, Karlsruhe) behandelt. Die Fäden der Hautnaht an Bauchwand und Becken wurden nach 10 Tagen gezogen.

3.8. Serum- und Uringewinnung

Die Gewinnung des Serums erfolgte am nüchternen Tier in zwei- bzw. vierwöchigem Abstand durch Punktion der Vena cephalica antebrachii.

Es wurden ca. 10 ml Vollblut in Serumröhrchen mit Zentrifugierhilfekügelchen überführt (Firma Sarstedt, Nümbrecht). Das Blut wurde zur Gerinnung etwa 10 Minuten stehen gelassen und anschließend 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert (Hettich EBA 3S, Tuttlingen). Das überstehende klare Serum wurde in Eppendorf Cups (jeweils ca. 1ml) abpipettiert und bei –20°C eingefroren.

Die Uringewinnung erfolgte im Stoffwechselkäfig. Die Hunde wurden direkt nach der Blutentnahme für 24 Stunden in Stoffwechselkäfige gesetzt. Der gewonnene Harn wurde gereinigt, anschließend in Portionen von ca. 10 ml in Röhrchen (Firma Sarstedt, Nümbrecht) gefüllt und ebenfalls bei –20°C eingefroren.

3.9. Bestimmung der Parameter des Knochenstoffwechsels

3.9.1. Bestimmung der Urinparameter

3.9.1.1. Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Deoxypyridinolin

Prinzip

Die Konzentrationen von Pyridinolin und Deoxypyridinolin wurden nach einem in unserem Institut eingeführten Verfahren bestimmt (Wehr, 1998), dessen Entwicklung auf einer Methode nach Colwell et al (1993) und Black et al. (1988) basiert:

Nach saurer Hydrolyse und Vorreinigung über Cellulose-Chromatographie-Säulen erfolgt die Detektion von Pyridinolin und Deoxypyridinolin mittels Eigenfluoreszenz in einer Ionenpaar-Reversed-Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Anlage (HPLC).

Dabei wurde von mir bei der Vorreinigung erstmals eine neue Methode mit feinerer Cellulose und anderen Lösungsmitteln durchgeführt.

Reagenzien und Material

- Salzsäure rauchend, Rotipuran 37%, Carl Roth, Karlsruhe, Artikel Nr. 4625.2
- Acetonitril, "gradient grade" für die Chromatographie, Merck, Darmstadt, Artikel Nr.100030
- Essigsäure 100%, pro analysi, Merck, Darmstadt, Artikel Nr. 100063
- Reinstwasser für die Chromatographie, hauseigene Herstellung (Anlage Seralpur delta, Seral Reinstwasser-Systeme)
- Microgranular Cellulose Powder CC 31, Whatman International Ltd., Maidstone, England, Katalog Nr. 4014050
- Poly-Prep[®] Chromatography Columns (0,8 x 4 cm), Bio-Rad Laboratories, Katalog Nr. 731-1550

- Heptafluorobutyricacid (HFBA), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Katalog Nr. H 7133
- Pyridinolin- und Deoxypyridinolin kalibrator, PYD/DPD-HPLC-Calibrator, Quidel, Heidelberg, Katalog Nr. 8004

Apparate

HPLC-Anlage

Chromatography Laboratory Automated Software System "Class-vp 2.1" mit Computer Pentium I 90, 128 MB RAM, Shimadzu, Oberhaching/München

Fluoreszenzdetektor, Shimadzu RF-551 S Spectrofluorometric Detector, Shimadzu, Oberhaching/München

Pumpe und Steuergerät, Waters 510 Solvent Delivery System und Waters Automated Gradient Controller, Waters Millipore S. A.

Probengeber Shimadzu SIL 10 AD, mit integrierter Probenkühlung, Shimadzu, Oberhaching/München

Chromatographiesäule, Spherisorb ODS-2-C18-2 (5 μ) 150 x 4 mit Vorsäule, Sph ODS-2,5 μ 3000-10, Latek Labortechnik-Geräte GmbH, Eppelheim

Tischkühlzentrifuge 301 K, Sigma, Osterode am Harz

Trockenschrank T12 function line, Heraeus, Hanau

Bestimmung

Vorbereitung der Cellulose-Chromatographie-Säulen

Zuerst werden 25 g Cellulose mehrmals in insgesamt 1 l Reinstwasser suspendiert, für zehn Minuten stehen gelassen und der Überstand vorsichtig abgekippt, um feine Partikel zu entfernen. Nun wird ein Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril, Eisessig und Reinstwasser im Verhältnis 4:1:1 hergestellt. Die letzte Suspension der Cellulose wird in 200 ml Lösungsmittelgemisch hergestellt und nicht mehr abgekippt. Daraufhin

wird jede der Cellulosesäulen mit 8 ml der Cellulosesuspension beschickt und zwei Mal mit je 5 ml des Lösungsmittelgemisches gespült. Zuletzt werden die Cellulosesäulen am unteren Ende verschlossen, noch einmal mit 5 ml Lösungsmittelgemisch bestückt und für 60 bis 90 Minuten stehen gelassen, damit sich die Cellulose möglichst gleichmäßig absetzen kann.

Aufschluss und Vorfractionierung der Probe

Von jeder Urinprobe wird 1 ml Urin mit 1 ml 37%iger, rauchender Salzsäure versetzt und 16 Stunden bei 110°C im Trockenschrank sauer hydrolysiert. Danach werden die Proben aus dem Trockenschrank genommen und für zehn Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert. 1 ml des klaren Überstandes des zentrifugierten Urins werden nun mit 1 ml Waschlösung versetzt und quantitativ auf die vorbereiteten Cellulosesäulen überführt. Diese werden vier Mal mit je 5 ml des Lösungsmittelgemisches gewaschen. Hierdurch wird die Mehrzahl der für den HPLC störenden Aminosäuren, Salze und Chromogene entfernt. Die Elution von Pyridinolin und Deoxypyridinolin erfolgt anschließend mit zwei Mal 2 ml Reinstwasser.

Zum Abschluss wird die wässrige Phase unter Stickstoff bei ca. 50°C bis zur Trocknung eingedampft. Vollständig trocken sind die Proben nach etwa vier bis fünf Stunden.

Detektion von Pyridinolin und Deoxypyridinolin mittels HPLC

Die mobile Phase besteht aus 85% Reinstwasser, 15% Acetonitril und 0,01 mol HFBA. Der pH-Wert von 1,9 wird mit 0,1 n NaOH bzw. 1% HFBA-Lösung eingestellt. Die externen Standards eluieren reproduzierbar nach einer Retentionszeit von etwa acht Minuten (Pyridinolin) und neun Minuten (Deoxypyridinolin). Die Flussrate beträgt 0,8 ml/min. Die Messung erfolgt bei einer Extension von 295 nm und einer Emission von 400 nm. Die eingedampften Proben werden in 200µl 1%iger HFBA-Lösung aufgenommen und davon 90 µl auf die Trennsäule aufgetragen. Bei gleichbleibenden Betriebsbedingungen zeigen die Proben die gleiche Retentionszeit wie die externen Standards. Während des gesamten Messvorgangs werden die Proben konstant auf einer Temperatur von 8°C gehalten.

3.9.1.2. Calcium

Der Gehalt an Calcium im Urin wurde bei 622 nm an einem Flammenphotometer (Elex 6361, Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Falls der Messwert zu hoch war, wurden die Urinproben bei der Messung mit einer 1%igen Lithiumchloridlösung mit Hilfe eines Dual Diluters (Diluter 5213, Eppendorf, Hamburg) verdünnt. Die entsprechenden Aliquote werden mit Acetylen verbrannt. Die Calciumkonzentration in der Probe ist dabei der Intensität der entstehenden Flamme direkt proportional.

3.9.1.3. Creatinin

Die Bestimmung von Creatinin (Crea) im Urin basiert auf einer modifizierten Methode nach Jaffe (1886). Der Nachweis erfolgt durch Bildung eines gelben Farbkomplexes bei der Reaktion von alkalischer Pikrinsäure mit Creatinin. Dabei ist die bei 490 nm photometrisch gemessene Farbintensität direkt linear proportional zur Creatininkonzentration in der Probe.

Zur Probenanalyse wurde ein Creatinin-Assay der Firma Quidel, Heidelberg (Katalog Nr. 8009) verwendet.

Eine Mikrotiterplatte wird mit den Urinproben belegt und nach Verdünnung auf 1:40 in zwei Schritten wird 0,7%ige Pikrinsäure aufgetragen. Nach 30-minütiger Inkubationszeit, wird die Mikrotiterplatte bei 490 nm in einem Assay Reader (Sunrise Remote, Tecan, Crailsheim) gemessen.

3.9.2. Bestimmung der knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase aus dem Serum

Die Bestimmung der bALP erfolgte mit einem Enzymimmunoassay der Firma Quidel, Heidelberg (Katalog Nr. 8012).

Dabei wird eine Mikrotiterplatte, die mit Anti-bALP-Antikörpern (monoklonale Antikörper der Maus) beschichtet ist, mit den Serumproben belegt. Während der Erstinkubation von drei Stunden bindet die bALP an die Antikörper in den Kavitäten der Platte. Nachfolgend wird die Platte mehrmals mit Waschlösung gewaschen, um ungebundenes bALP zu entfernen. Nun wird p-Nitrophenylphosphat zugegeben, das

mit der an die Antikörper gebundenen bALP einen Farbkomplex bildet. Nach Abbruch der Reaktion mit Hilfe von Natronlauge als Stopplösung erfolgt die Messung der Farbintensität bei 405 nm im Assay Reader (Sunrise Remote, Tecan, Crailsheim). Die gemessene optische Dichte ist dabei direkt linear proportional zur bALP-Aktivität in der Probe.

3.10. Biochemische Analysen der Knochenbiopsien

Zur Bestimmung der Trockensubstanz wurden die Biopsieproben im Trockenschrank (T12 function line, Heraeus, Hanau) bei 103°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Anschließend wurden die Proben im Muffelofen (M 110 thermicon P®, Heraeus, Hanau) bei 550°C für 48 Stunden verascht, um den Aschegehalt der Biopsien zu ermitteln. Nun wurde jede Probe mit 3 ml rauchender Salzsäure (Rotipuran 37%, Carl Roth, Karlsruhe) versetzt und mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt. Nach Herstellung einer 1:1000 Verdünnung konnte der Calciumgehalt gemessen werden.

Der Gehalt an Calcium wurde bei 622 nm an einem Flammenphotometer (Elex 6361, Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Die entsprechenden Aliquote werden mit Acetylen verbrannt. Die Calciumkonzentration in der Probe ist dabei der Intensität der entstehenden Flamme direkt proportional.

Über das Atomgewicht von Calcium kann nun der Gehalt an Calcium berechnet werden:

$$\text{Calcium (g/kg)} = \frac{40,08 \text{ (g/mol)} \times \text{Messwert (mmol/l)} \times \text{Verdünnung}}{1000 \times \text{Einwaage (g)}}$$

3.11. Analyse der Knochenbiopsien durch Mikrocomputertomographie

Die Analysen der Knochenbiopsien wurden unter Leitung von PD Dr. Dr. Felix Eckstein an der anatomischen Anstalt der medizinischen Fakultät der LMU München durchgeführt. Dabei wurde ein Mikro-CT Gerät der Firma Scanco (µCT 20, Scanco

Medical AG, Bassersdorf, Schweiz) mit der zum System gehörenden Software verwendet.

Als Strahlenquelle dient hierbei eine Mikrofokus Röntgenröhre mit einer Fokusgröße von 10 μm , als Detektor ein CCD-Zeilendetektor mit 512 Pixeln, der die quantitative Veränderung des Röntgenstrahles durch die Apatitkristalle des Knochens analysiert. Abhängig von der Auflösung können Proben mit einem Durchmesser bis maximal 17 mm und einer Länge bis zu 50 mm gemessen werden.

Die Biopsieproben mit einem Durchmesser von 8 mm wurden in 6%igem, mit Phosphatpuffer gepuffertem Formalin gelagert und ohne weitere Aufbereitung analysiert.

Dafür wurden sie in zylindrische Probengefäße mit Formalin gegeben und vollautomatisch vermessen. Bei jeder Messung wird zuerst ein Übersichtsscan (scout view) von der gesamten Probe durchgeführt. Nun kann manuell das zu untersuchende Volumen bestimmt werden. Für die Analysen wurde ein „volume of interest“ (VOI) bestimmt, das im Zentrum der Probe liegt, um Artefakte durch die Probengewinnung auszuschließen und sicher zu gehen, dass ausschließlich Spongiosa vermessen wird. Knochengewebe wird von Knochenmark und Formalinlösung mit Hilfe eines Dichteschwellenwertes unterschieden. Alle Strukturen oberhalb des Schwellenwertes werden als Knochen definiert.

Die räumliche Auflösung betrug 26 μm (Voxel). Je nach Größe der Probe konnten 112 bis 338 Schichten in einem Abstand von 26 μm vermessen werden.

Dann wird das dreidimensionale Bild im Computer rekonstruiert und anschließend ausgewertet. Mit Hilfe eines Filters wird eine Glättung der Struktur im dreidimensionalen Bild erreicht.

Gemessen wurden jeweils das Gesamtvolumen der Probe (total volume, TV), das Knochenvolumen (bone volume, BV) und die endostale Oberfläche (bone surface, BS). Nun konnte der Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen (BV/TV), sowie die endostale Oberfläche in Relation zum Gesamtvolumen (BS/TV) berechnet werden.

Außerdem wurden mit Hilfe der Software Parameter der Knochenstruktur wie Durchmesser der Trabekel (trabecular thickness, TbTh), Anzahl der Trabekel (trabecular number, TbN) und Abstand der Trabekel voneinander (trabecular separation, TbSp) bestimmt. Diese Parameter wurden auch unabhängig von einem

Modell bestimmt um eine Beeinflussung der Parameter durch Abweichungen der Strukturen vom Modell zu vermeiden. Anhand des „structure model index“ (SMI) kann der Anteil an platten-, bzw. stäbchenförmigen Trabekeln beurteilt werden.

3.12. Statistische Auswertung

Die Auswertung der in diesem Versuch gewonnenen Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SAS für Windows.

Es wurde jeweils der arithmetische Mittelwert (MW) zur Zusammenfassung von Einzelwerten gebildet, sowie die Standardabweichung (Stabw) als Maß für die Streuung der Einzelwerte berechnet.

Zu jedem Zeitpunkt wurden die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Wirkstoffgruppe bestimmt. Aufgrund der kleinen Anzahl an Stichproben wurde der Rangsummentest nach Wilcoxon verwendet, der auch bei nicht normalverteilten Werten mit unterschiedlicher Varianz angewendet werden kann.

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt wurden mit * gekennzeichnet.

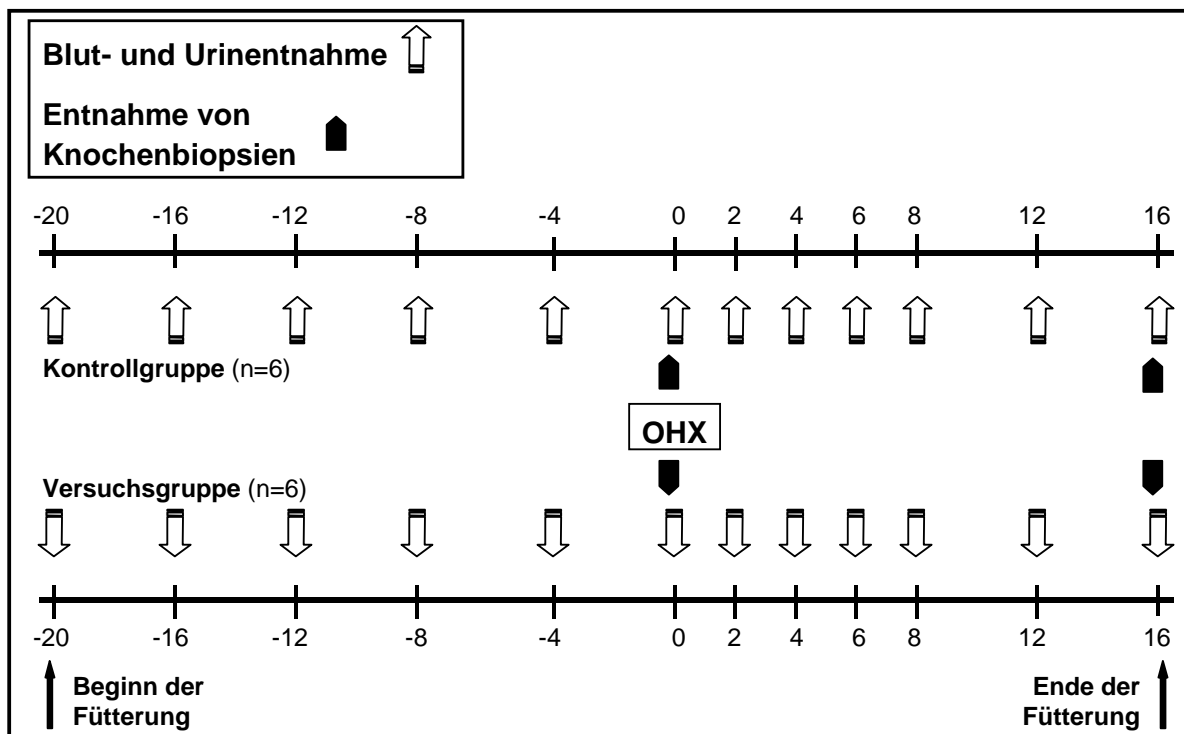
Außerdem wurden innerhalb der Gruppen die Unterschiede zwischen dem Zeitpunkt der OHX (Zeitpunkt 0) und den Zeitpunkten nach OHX bestimmt. Dazu wurde ebenfalls der Rangsummentest nach Wilcoxon durchgeführt.

Signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe wurden mit # gekennzeichnet.

Die bivariate Korrelation zwischen den gemessenen Knochenmarkern wurde mit dem Pearsonschen Korrelationskoeffizienten R angegeben. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ war eine signifikante Korrelation, bei $p < 0,001$ eine hochsignifikante Korrelation vorhanden.

4. Ergebnisse

4.1. Versuchsaufbau im zeitlichen Ablauf



4.2. Allgemeinbefinden und Gewichtsentwicklung

Das Allgemeinbefinden der Versuchshunde war während des Fütterungszeitraumes ungestört. Es konnte keine Beeinflussung durch die Wirkstoffaufnahme festgestellt werden.

Die Operationen verliefen ohne schwerwiegende Zwischenfälle. Bei zwei Hunden kam es nach der Ovariohysterektomie zu Blutungen in die Bauchhöhle. Hier wurde sofort eine Nachoperation durchgeführt und die Stümpfe am Mesovar nochmals ligiert. Dadurch kam die Blutung zum Stillstand. Auch die nachoperierten Tiere hatten innerhalb weniger Tage wieder ein ungestörtes Allgemeinbefinden.

Bei zwei weiteren Hunden kam es nach der ersten Knochenbiopsieentnahme zur Nahtdehiszenz, da die Hunde durch Beißen und Lecken die Fäden entfernen

konnten. Es wurde eine Wundresektion und ein erneuter primärer Wundverschluss durchgeführt. Anschließend erfolgte die Heilung problemlos, die Hunde wurden jedoch vorsorglich insgesamt eine Woche mit 2,5 mg/kg Enrofloxacin s.c. (Baytril®, Bayer, Leverkusen) behandelt.

Die Bestimmung der Körpergewichte erfolgte wöchentlich über den gesamten Versuchszeitraum.

Tabelle 12: Mittlere Körpergewichte (MW ± Stabw) in kg der Hunde aus Kontrollgruppe (n=6) und Wirkstoffgruppe (n=6) während des gesamten Versuchszeitraumes über 36 Wochen

Mittlere Körpergewichte in kg		
Zeitpunkt	Kontrollgruppe	Wirkstoffgruppe
Woche -20	10,9 ± 0,80	10,8 ± 0,37
Woche -16	10,9 ± 0,86	10,9 ± 0,26
Woche -12	11,0 ± 0,81	10,9 ± 0,34
Woche -8	10,6 ± 0,74	10,4 ± 0,36
Woche -4	10,9 ± 0,82	10,7 ± 0,20
Woche 0 (OHX)	10,9 ± 0,71	10,7 ± 0,34
Woche 4	11,0 ± 0,86	11,0 ± 0,19
Woche 8	10,8 ± 0,86	10,6 ± 0,22
Woche 12	11,2 ± 0,88	11,1 ± 0,31
Woche 16	11,0 ± 0,86	10,9 ± 0,22

* : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt

: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe im Vergleich zu Zeitpunkt 0 (OHX)

Die Körpergewichte der Tiere waren zu Beginn und zu Ende des Versuchs nahezu identisch (Tabelle 12). Während des Versuchs unterlagen die Gewichte der einzelnen Tiere leichten Schwankungen. Die durchschnittlichen Körpergewichte

betragen vor OHX $10,9 \pm 0,12$ kg bei den Tieren in der Kontrollgruppe, $10,8 \pm 0,14$ kg bei den Tieren in der Wirkstoffgruppe, nach OHX $11,0 \pm 0,14$ kg in der Kontrollgruppe, $10,8 \pm 0,16$ kg in der Wirkstoffgruppe.

Zu keinem Zeitpunkt konnten signifikante Unterschiede in der Gewichtsentwicklung festgestellt werden.

4.3. Collagen-Crosslinks im Urin

Im Urin wurden als Resorptionsmarker die Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Deoxypyridinolin gemessen. Auch diese Marker wurden im vier- bzw. zweiwöchigen Abstand bestimmt. Aus Tabelle 13 und 14 sind die Ergebnisse der Messungen während des Versuchs ersichtlich.

Vor OHX war kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennbar. Die Exkretion von Pyridinolin im Urin betrug in der Kontrollgruppe im Mittel $154,20 \pm 5,97$ nmol Pyd/mmol Crea, in der Wirkstoffgruppe im Mittel $150,99 \pm 7,34$ nmol Pyd/mmol Crea.

Nach OHX stiegen die Werte in beiden Gruppen deutlich an.

In der Kontrollgruppe war zwei Wochen nach OHX ein Anstieg um 97%, nach vier Wochen um 135% zu verzeichnen. Dann konnte ein Absinken der Werte bis zum Ende des Versuchs beobachtet werden. Vier Monate nach OHX waren die Werte im Mittel um 44% höher als vor OHX. Bis zur Woche 12 nach OHX war hier ein statistisch signifikanter Unterschied zum Zeitpunkt 0 erkennbar.

Auch in der Wirkstoffgruppe konnte ein Anstieg von Pyridinolin im Urin gemessen werden. Nach zwei Wochen waren die Werte um 46%, nach vier Wochen um 71% erhöht. Anschließend sanken die Werte ab und erreichten vier Monate nach OHX wieder Werte vor der Operation. Auch in dieser Gruppe war bis zur Woche 12 nach OHX ein statistisch signifikanter Unterschied zum Zeitpunkt 0 vorhanden.

Im Vergleich der beiden Gruppen zeigt sich in der Kontrollgruppe, dass die Konzentrationen an Pyridinolin zwei, vier, sechs, acht und 16 Wochen nach OHX statistisch signifikant höher waren als die der Wirkstoffgruppe.

Tabelle 13: Mittlere Konzentrationen von Pyridinolin (MW \pm Stabw) in nmol/mmol Creatinin im Urin der Hunde der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) während des gesamten Versuchszeitraumes

Zeitpunkt	Kontrollgruppe	Wirkstoffgruppe
Woche -20	148,00 \pm 37,37	154,34 \pm 30,64
Woche -16	151,46 \pm 27,16	148,05 \pm 24,23
Woche -12	156,07 \pm 30,81	163,75 \pm 20,97
Woche -8	158,87 \pm 30,77	148,43 \pm 20,96
Woche -4	148,17 \pm 32,00	142,24 \pm 11,30
Woche 0 (OHX)	162,61 \pm 32,13	149,16 \pm 10,10
Woche 2	304,34 \pm 73,83 # *	219,93 \pm 20,20 #
Woche 4	362,15 \pm 69,90 # *	257,80 \pm 44,18 #
Woche 6	306,98 \pm 47,55 # *	192,69 \pm 30,28 #
Woche 8	292,28 \pm 45,16 # *	193,38 \pm 36,38 #
Woche 12	226,42 \pm 47,64 #	172,21 \pm 21,77 #
Woche 16	221,29 \pm 46,58 *	145,34 \pm 15,64

* : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt

: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe im Vergleich zu Zeitpunkt 0 (OHX)

Deoxypyridinolin zeigte einen ähnlichen Verlauf wie Pyridinolin.

Vor OHX waren die Werte von Kontroll- und Wirkstoffgruppe fast identisch. In der Kontrollgruppe betragen die Werte im Mittel $17,45 \pm 1,44$ nmol Dpd/mmol Crea, in der Wirkstoffgruppe $17,23 \pm 1,26$ nmol Dpd/mmol Crea.

Nach OHX stiegen die Werte in der Kontrollgruppe deutlich an und erreichten nach vier Wochen im Mittel $37,72 \pm 8,58$ nmol Dpd/mmol Crea. Dies entspricht einem Anstieg von 116%. Anschließend fielen die Werte wieder, waren vier Monate nach OHX allerdings noch um 42% erhöht. In der Kontrollgruppe waren die Konzentrationen an Deoxypyridinolin bis 16 Wochen nach OHX statistisch signifikant höher als zum Zeitpunkt der OHX.

In der Wirkstoffgruppe stiegen die Werte nach vier Wochen auf $26,02 \pm 4,67$ nmol Dpd/mmol Crea, ein Anstieg um 51%. Auch hier fielen die Werte in den folgenden Wochen wieder und erreichten bis zum Versuchsende wieder Werte vor OHX. Zwei, vier und sechs Wochen nach OHX waren die Konzentrationen an Deoxyypyridinolin in der Wirkstoffgruppe statistisch höher als zum Zeitpunkt der OHX.

Zwei, sechs und 16 Wochen nach OHX waren außerdem die Konzentrationen an Deoxyypyridinolin in der Kontrollgruppe statistisch signifikant höher als in der Wirkstoffgruppe.

Tabelle 14: Mittlere Konzentrationen von Deoxyypyridinolin (MW \pm Stabw) in nmol/mmol Creatinin im Urin der Hunde der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) während des gesamten Versuchszeitraumes

Zeitpunkt	Kontrollgruppe	Wirkstoffgruppe
Woche -20	18,68 \pm 2,83	18,71 \pm 3,19
Woche -16	18,04 \pm 3,68	17,23 \pm 3,06
Woche -12	18,67 \pm 4,89	17,72 \pm 1,76
Woche -8	17,58 \pm 4,00	18,11 \pm 3,35
Woche -4	14,88 \pm 4,30	15,26 \pm 2,51
Woche 0 (OHX)	16,85 \pm 3,72	16,33 \pm 2,79
Woche 2	32,92 \pm 8,33 # *	22,48 \pm 3,42 #
Woche 4	37,72 \pm 8,58 #	26,02 \pm 4,67 #
Woche 6	32,58 \pm 8,88 # *	22,38 \pm 3,09 #
Woche 8	26,95 \pm 5,50 #	21,26 \pm 5,39
Woche 12	25,61 \pm 4,41 #	20,19 \pm 5,13
Woche 16	24,69 \pm 4,16 # *	18,24 \pm 2,96

* : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt

: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe im Vergleich zu Zeitpunkt 0 (OHX)

4.4. Calciumausscheidung im Urin

Tabelle 15 zeigt die mittleren Calciumkonzentrationen im Urin der Hunde während des gesamten Versuchszeitraumes.

Tabelle 15: Mittlere Calciumkonzentrationen (MW \pm Stabw) in mmol/l bezogen auf Creatininkonzentration in mmol/l im Urin der Hunde der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) während des gesamten Versuchszeitraumes

Zeitpunkt	Kontrollgruppe	Wirkstoffgruppe
Woche -20	0,29 \pm 0,12	0,13 \pm 0,12
Woche -16	0,09 \pm 0,05	0,29 \pm 0,20
Woche -12	0,16 \pm 0,17	0,24 \pm 0,23
Woche -8	0,13 \pm 0,10	0,35 \pm 0,26
Woche -4	0,13 \pm 0,09	0,17 \pm 0,15
Woche 0 (OHX)	0,16 \pm 0,08	0,14 \pm 0,11
Woche 2	0,15 \pm 0,08	0,29 \pm 0,22
Woche 4	0,16 \pm 0,04	0,20 \pm 0,11
Woche 6	0,17 \pm 0,08	0,24 \pm 0,14
Woche 8	0,19 \pm 0,10	0,23 \pm 0,16
Woche 12	0,18 \pm 0,11	0,18 \pm 0,15
Woche 16	0,18 \pm 0,13	0,27 \pm 0,26

* : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt
 # : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe im Vergleich zu Zeitpunkt 0 (OHX)

Die Calciumausscheidung wurde auf die Creatininkonzentration im Urin normiert. Die Calciumausscheidung schwankte während des Versuchs im Mittel zwischen 0,09 und 0,35. Neben der großen Schwankung war in beiden Gruppen eine große Streuung vorhanden. Auch intraindividuell waren große Schwankungen in den Werten feststellbar. So konnten bei einzelnen Hunden während des Versuchs Schwankungen bis zum zehnfachen auftreten.

Weder innerhalb einer Gruppe, noch im Vergleich der Versuchsgruppen waren die Veränderungen signifikant.

4.5. Knochenspezifische Alkalische Phosphatase im Serum

Die Werte der knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase wurden im vier- bzw. zweiwöchigen Abstand bestimmt.

In Tabelle 16 sind die mittleren Konzentrationen der knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase im Serum der Hunde während des Versuchszeitraumes dargestellt.

Tabelle 16: Mittlere Konzentrationen der knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase (MW \pm Stabw) in U/I im Serum der Hunde der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) während des gesamten Versuchszeitraumes

Zeitpunkt	Kontrollgruppe	Wirkstoffgruppe
Woche -20	14,25 \pm 5,41	13,41 \pm 4,35
Woche -16	16,06 \pm 8,44	14,24 \pm 3,96
Woche -12	13,73 \pm 8,88	11,60 \pm 3,02
Woche -8	12,94 \pm 6,31	11,13 \pm 1,57
Woche -4	12,18 \pm 6,75	12,10 \pm 1,17
Woche 0 (OHX)	13,82 \pm 8,15	13,35 \pm 2,12
Woche 2	13,68 \pm 6,10	10,91 \pm 2,63
Woche 4	17,67 \pm 7,93	12,44 \pm 2,09
Woche 6	15,58 \pm 7,44	12,68 \pm 2,69
Woche 8	15,22 \pm 6,46	12,93 \pm 2,97
Woche 12	16,25 \pm 6,39	13,34 \pm 1,82
Woche 16	14,65 \pm 5,02	11,88 \pm 1,93

* : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt

: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe im Vergleich zu Zeitpunkt 0 (OHX)

Vor OHX waren nur geringfügige Unterschiede, sowohl zwischen den Gruppen, als auch zwischen den Zeitpunkten vorhanden. Die Standardabweichungen in der Wirkstoffgruppe nahmen im Gegensatz zu denen in der Kontrollgruppe im Zeitraum vor OHX ab. Auch nach OHX sind die Standardabweichungen in der Wirkstoffgruppe deutlich geringer als in der Kontrollgruppe.

Nach OHX stiegen die Werte in der Kontrollgruppe an, vier Wochen nach OHX waren sie um 29% gestiegen. Bis zum Ende des Versuchs fielen sie wieder bis fast auf die Ausgangswerte zu Beginn des Versuchs ab.

In der Wirkstoffgruppe war nach OHX weder Anstieg, noch Abfall zu verzeichnen, die Werte lagen während des gesamten Versuchs im Mittel bei $12,5 \pm 1,01$ U/l.

Zwischen den Gruppen war zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied erkennbar. Auch innerhalb der Gruppen konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

4.6. Biochemische Analyse der Knochenbiopsien

Tabelle 17 legt den mittleren Aschegehalt der Knochenbiopsien vor und nach OHX dar.

Der mittlere Aschegehalt der Biopsien war vor OHX in der Wirkstoffgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Auch nach OHX war in der Wirkstoffgruppe ein höherer mittlerer Aschegehalt vorhanden, allerdings nicht signifikant.

In der Wirkstoffgruppe war nach OHX keine Veränderung des Aschegehaltes erkennbar. In der Kontrollgruppe stieg der mittlere Aschegehalt um 4,7%, diese Veränderung war jedoch nicht signifikant.

Tabelle 17: Mittlerer Aschegehalt in den Knochenbiopsien der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) in % der Trockensubstanz vor und nach OHX

	Kontrollgruppe	Wirkstoffgruppe
Vor OHX	48,96 ± 3,05*	54,42 ± 2,42
Nach OHX	51,25 ± 1,85	54,69 ± 3,91

* : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt

: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe vor und nach OHX

Der mittlere Calciumgehalt der im Trockenschrank getrockneten Biopsien ist in Tabelle 18 abgebildet.

Sowohl vor, als auch nach OHX war dabei der Calciumgehalt im Knochen in der Wirkstoffgruppe höher als in der Kontrollgruppe. Der Unterschied war jedoch weder vor, noch nach OHX statistisch signifikant.

Bei den Tieren der Kontrollgruppe stieg der mittlere Calciumgehalt im Knochen nach OHX um 2,3% an, in der Wirkstoffgruppe sank er um 7,3% ab. Diese Änderungen waren nicht signifikant.

Tabelle 18: Mittlerer Calciumgehalt (MW ± Stabw) in g/kg Knochen TS in den getrockneten Knochenbiopsien der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) vor und nach OHX

	Kontrollgruppe	Wirkstoffgruppe
Vor OHX	134,21 ± 13,09	150,75 ± 18,34
Nach OHX	137,34 ± 18,10	139,68 ± 13,33

* : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt

: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe vor und nach OHX

In der folgenden Tabelle 19 sind die mittleren Calciumgehalte in den Knochenbiopsien nach Veraschung im Muffelofen dargestellt.

Sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der Wirkstoffgruppe sank der mittlere Calciumgehalt in der Knochenasche nach OHX ab. In der Kontrollgruppe betrug der Verlust 2,3%, in der Wirkstoffgruppe 7,8%. Hier waren keine signifikanten Änderungen messbar.

Tabelle 19: Mittlerer Calciumgehalt (MW ± Stabw) in g/kg Knochenasche in den veraschten Knochenbiopsien der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) vor und nach OHX

	Kontrollgruppe	Wirkstoffgruppe
Vor OHX	273,68 ± 12,25	276,64 ± 28,09
Nach OHX	267,35 ± 29,16	255,04 ± 6,83

* : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt

: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe vor und nach OHX

4.7. Mikrocomputertomographische Analyse der Knochenbiopsien

Das Gesamtvolumen (TV) der Knochenbiopsien lag zwischen 7,36 und 65,46 mm³, das Knochenvolumen (BV) der Proben zwischen 3,62 und 26,27 mm³.

Tabelle 20 zeigt den Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen der Biopsieproben. Das Verhältnis von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen (BV/TV) betrug in der Kontrollgruppe, wie auch in der Wirkstoffgruppe vor OHX im Mittel 0,42 nach OHX 0,43. In beiden Gruppen blieb der Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen der Biopsieprobe fast gleich.

Tabelle 20: Mittlerer Anteil des Knochenvolumens (BV) am Gesamtvolumen (TV) der Knochenbiopsien (MW ± Stabw) der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) vor und nach OHX

	Kontrollgruppe	Wirkstoffgruppe
Vor OHX	0,42 ± 0,02	0,43 ± 0,03
Nach OHX	0,43 ± 0,03	0,43 ± 0,05

* : Signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt

: Signifikante Unterschiede (p<0,05) innerhalb einer Gruppe vor und nach OHX

Tabelle 21: Mittlerer Anteil der Knochenoberfläche (BS) am Knochenvolumen (BV) der Knochenbiopsien (MW ± Stabw) in mm²/mm³ der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) vor und nach OHX

	Kontrollgruppe	Wirkstoffgruppe
Vor OHX	14,10 ± 0,78	13,45 ± 0,86
Nach OHX	13,69 ± 0,80	13,63 ± 1,42

* : Signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt

: Signifikante Unterschiede (p<0,05) innerhalb einer Gruppe vor und nach OHX

Auch das Verhältnis von Knochenoberfläche (BS) zum Knochenvolumen (BV) zeigte weder signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, noch innerhalb einer Gruppe vor und nach OHX (Tabelle 21). In der Kontrollgruppe betrug der mittlere

Anteil der Knochenoberfläche am Knochenvolumen vor OHX $14,10 \pm 0,78 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$, nach OHX $13,69 \pm 0,80 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$, in der Wirkstoffgruppe vor OHX $13,45 \pm 0,86 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ und nach OHX $13,63 \pm 1,42 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$.

In Tabelle 22 sind die aus den Knochenbiopsien berechneten Parameter der Knochenstruktur dargestellt. Es wurden die mittlere Anzahl der Trabekel, die mittlere Dicke der Trabekel, sowie der mittlere Abstand der Trabekel voneinander berechnet.

Tabelle 22: Mittlere Anzahl der Trabekel (TbN) in 1/mm, mittlere Dicke der Trabekel (TbTh) in mm und mittlerer Abstand der Trabekel (TbSp) in mm in den Knochenbiopsien der Kontrollgruppe (n=6) und der Wirkstoffgruppe (n=6) vor und nach OHX

	Kontrollgruppe	Wirkstoffgruppe
	TbN in 1/mm	
Vor OHX	3,31 ± 0,25	3,29 ± 0,48
Nach OHX	2,90 ± 0,23 #	2,94 ± 0,37
	TbTh in mm	
Vor OHX	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Nach OHX	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01
	TbSp in mm	
Vor OHX	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,04
Nach OHX	0,30 ± 0,03	0,30 ± 0,03

* : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt

: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe vor und nach OHX

Die mittlere Anzahl der Trabekel sank in beiden Gruppen nach OHX ab. In der Kontrollgruppe war ein statistisch signifikanter Verlust von 12,4% erkennbar. In der Wirkstoffgruppe sank die mittlere Anzahl der Trabekel um 10,6%, diese Änderung war nicht signifikant.

Die mittlere Dicke der Trabekel betrug in der Wirkstoffgruppe, wie auch in der Kontrollgruppe während des Versuchs im Mittel $0,14 \pm 0,01 \text{ mm}$. Nach OHX war in keiner der beiden Gruppen eine Veränderung erkennbar.

Beim Abstand der Trabekel war in beiden Gruppen ein Anstieg erkennbar. Der mittlere Abstand der Trabekel stieg in der Kontrollgruppe, wie auch in der Wirkstoffgruppe von 0,28 mm auf 0,30 mm. Dies entsprach einem Anstieg um 7,1%, die Veränderungen waren allerdings nicht signifikant.

Bei keinem Parameter wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt.

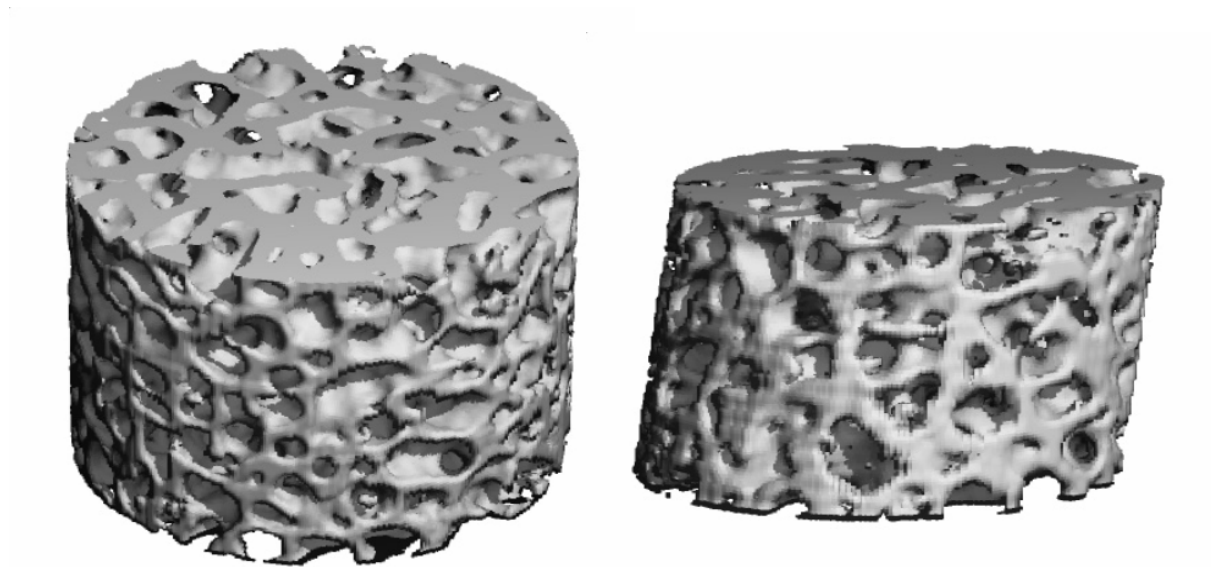


Abbildung 7: Mikro-CT-Aufnahmen der Knochenbiopsien

4.8. Korrelationen

In den folgenden Tabellen sind die Korrelationen zwischen knochenspezifischer Alkalischer Phosphatase, Calcium im Urin, Pyridinolin und Deoxypyridinolin dargestellt.

In Tabelle 23 werden die Korrelationen zwischen knochenspezifischer Alkalischer Phosphatase, Calcium im Urin, Pyridinolin und Deoxypyridinolin in der Kontrollgruppe während des gesamten Versuchszeitraumes aufgezeigt.

Zwischen den Crosslinks Pyridinolin und Deoxypyridinolin bestand in der Kontrollgruppe während des Versuchs eine hochsignifikant positive Korrelation mit $R=0,977$ und $p=0,0001$. Außerdem zeigte sich zwischen knochenspezifischer

Alkalischer Phosphatase und Pyridinolin, sowie Deoxypyridinolin eine signifikant positive Korrelation mit $R=0,604$ und $p=0,00376$ (bALP und Pyd) und $R=0,647$ und $p=0,0228$ (bALP und Dpd).

Tabelle 23: Korrelationen zwischen knochenspezifischer Alkalischer Phosphatase (bALP), Calcium im Urin (Ca), Pyridinolin (Pyd) und Deoxypyridinolin (Dpd) in der Kontrollgruppe während des gesamten Versuchszeitraumes (R; p)

n=72	Ca	Pyd	Dpd
bALP	0,081 p=0,803	0,604 p=0,0376	0,647 p=0,0228
Ca		0,044 p=0,893	0,086 p=0,790
Pyd			0,977 p=0,0001

Tabelle 24 zeigt die Korrelationen zwischen knochenspezifischer Alkalischer Phosphatase, Calcium im Urin, Pyridinolin und Deoxypyridinolin in der Wirkstoffgruppe während des gesamten Versuchszeitraumes.

Pyridinolin und Deoxypyridinolin waren in der Wirkstoffgruppe während des Versuchs hochsignifikant positiv miteinander korreliert $R=0,948$ und $p=0,0001$.

Tabelle 24: Korrelationen zwischen knochenspezifischer Alkalischer Phosphatase (bALP), Calcium im Urin (Ca), Pyridinolin (Pyd) und Deoxypyridinolin (Dpd) in der Wirkstoffgruppe während des gesamten Versuchszeitraumes (R; p)

n=72	Calcium im Urin	Pyd	Dpd
bALP	-0,502 p=0,096	-0,194 p=0,546	-0,136 p=0,6731
Calcium im Urin		0,0287 p=0,930	0,100 p=0,756
Pyd			0,948 p=0,0001

5. Diskussion

5.1. Aufbau und Durchführung des Versuchs

Der Versuch wurde an zwölf institutseigenen, weiblichen Beagles durchgeführt. Die Tiere wurden zu Beginn des Versuchs nach Gewicht in zwei Gruppen mit je sechs Tieren aufgeteilt. Durch die randomisierte Einteilung der Tiere wurden in beiden Gruppen annähernd gleiche Durchschnittsgewichte erreicht, was eine gewichtsbedingte Beeinflussung der Ergebnisse ausschließt.

Während des gesamten Versuchszeitraumes wurde der Gesundheitszustand der Tiere klinisch überwacht. Dabei konnte keine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens festgestellt werden. Alle Tiere nahmen die tägliche Futtermenge problemlos auf. Die Aufnahme der Kapseln wurde durch orale Eingabe und Kontrolle des Schluckvorganges sichergestellt.

Der Gehalt an Vitamin E im Futter überstieg den Bedarf der Hunde (Meyer und Zentek, 1998). Da jedoch in der Wirkstoffgruppe ein erhöhter Anteil an ungesättigten Fettsäuren im Futter vorhanden war, sollten diese durch den erhöhten Vitamin E-Gehalt vor Oxidation geschützt werden. Dadurch konnte außerdem eine Beeinflussung des Immunsystems der Hunde durch oxidativen Stress vermieden werden.

Die Gewinnung der Blutproben erfolgte ohne Probleme. Es wurde immer an den nüchternen Tieren zur gleichen Uhrzeit Blut genommen, um circadiane Schwankungen zu vermeiden.

Anschließend wurden die Tiere für 24 Stunden in die Stoffwechselkäfige gesetzt, um auch bei den Urinproben tageszeitliche Schwankungen auszugleichen. Der Urin wurde gefiltert und in kleinen Portionen sofort eingefroren. Auch das Blut wurde unmittelbar nach der Entnahme zentrifugiert, das Serum abpipettiert und eingefroren. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -20°C gelagert. Dadurch konnte die Stabilität der Knochenmarker gewährleistet werden.

5.2. Wahl des Tiermodells ovariohysterektomierter Beagle

Laut „Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the treatment or prevention of postmenopausal osteoporosis“ der „Food and Drug Administration“ von 1994 sollen Wirkstoffe jeweils an zwei Tiermodellen untersucht werden, der ovariektomierten Ratte, sowie einem zweiten Modell. Die Wirkstoffe des vorliegenden Versuchs wurde an unserem Institut schon am Osteoporosemodell Ratte untersucht und die Kombination und Dosierung mit den günstigsten Wirkungen auf den Knochenstoffwechsel bestimmt. Nachfolgend sollte nun diese Wirkstoffkombination am Hund bewertet werden.

Das Tiermodell Hund wurde aufgrund der starken Ähnlichkeiten im Knochenaufbau und –stoffwechsel von Hund und Mensch gewählt. Im Vergleich des trabekulären Knochens von Hund und Mensch konnten Kuhn et al. (1989) erhebliche Ähnlichkeiten sowohl quantitativ, als auch qualitativ feststellen. Aerssens et al. (1998) fanden außerdem, dass der Knochen des Hundes in seiner Zusammensetzung dem des Menschen weitgehend übereinstimmt. Allerdings sind bei der Messung von BMD und BMC deutliche Unterschiede erkennbar.

Bei der Wahl des Tiermodells sollten sowohl die Remodeling Aktivität, als auch die altersbedingten Veränderungen des Knochens denen der postmenopausalen Frau ähnlich sein (Martin et al., 1981). Schon in einigen Studien wurden bei Beagles Veränderungen des Knochenstoffwechsels nach OHX ermittelt, die der postmenopausalen Osteoporose ähneln (Dannucci et al., 1987; Martin et al., 1987, Boyce et al., 1990; Faugere et al., 1990). Daher wurden sie auch schon in Versuchen zur Osteoporosetherapie eingesetzt (Monier-Faugere et al., 1993, Monier-Faugere et al., 1996; Monier-Faugere et al., 1999).

Allerdings muss beachtet werden, dass die Veränderungen des Knochenstoffwechsels nach OHX nur geringfügig sind und nur über einen gewissen Zeitraum verfolgt werden können. Pathologische Frakturen, ein Merkmal der klinischen Osteoporose, können beim Hund, wie auch bei anderen Tieren, durch OHX nicht ausgelöst werden.

In anderen Studien konnte der Einfluss der OVX oder OHX auf den Knochen turnover durch eine restriktive Calciumgabe verstärkt werden (Nagai und Shindo, 1997; Yoshida et al., 1998). In beiden Studien wurde davon ausgegangen, dass die reduzierte Calciumgabe einen größeren Einfluss auf den Knochenstoffwechsel hat als die OVX, bzw. OHX.

In unserem Versuch wurden die Hunde mit einem Alleinfutter mit bedarfsdeckendem Calciumgehalt versorgt. Laut Meyer und Zentek (1998) liegt der tägliche Calciumbedarf beim adulten Hund bei 100 mg/kg KM. Sowohl die Tiere der Kontrollgruppe, als auch die der Wirkstoffgruppe bekamen deutlich mehr Calcium gefüttert, das Calcium/Phosphor-Verhältnis lag in beiden Gruppen bei 1,3:1. Daher ist keine zusätzliche Beeinflussung des Knochenstoffwechsels zu erwarten.

5.3. Gewichtsentwicklung der Tiere

Zu Beginn des Versuchs befanden sich die Versuchshunde im Idealgewicht. Das Idealgewicht wurde dabei mit dem Body Conditioning Scoring-System von La Flamme (1997) bestimmt. Die Beurteilung erfolgte durch Adspektion von der Seite und von oben und durch Palpation verschiedener Körperregionen. Im Idealgewicht befindet sich ein Hund, wenn die Rippen ohne übermäßige Fettabdeckung fühlbar sind, die Taille von oben gesehen hinter den Rippen erkennbar und das Abdomen von der Seite gesehen eingezogen ist.

Während des Versuchs wurde mit der wöchentlichen Gewichtskontrolle die Energiezuteilung so angepasst, dass alle Hunde ihr Idealgewicht während des gesamten Versuchs möglichst konstant hielten (Abb. 8).

Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass in beiden Gruppen zu denselben Zeitpunkten Schwankungen im Gewicht um bis zu 0,5 kg aufgetreten sind (siehe 4.2., Tabelle 12). Diese Gewichtsverluste können zeitlich Kälteeinbrüchen mit zum Teil extrem niedrigen Temperaturen und starkem Schneefall zugeordnet werden, denen die Tiere im Zwinger trotz Unterstand ausgesetzt waren. Der Gewichtsverlust wurde durch Erhöhung der zugeteilten Energiemenge ausgeglichen.

Die leichten Schwankungen der Körpergewichte waren zu keinem Zeitpunkt signifikant. Auch konnte nach OHX keine Gewichtszunahme festgestellt werden.

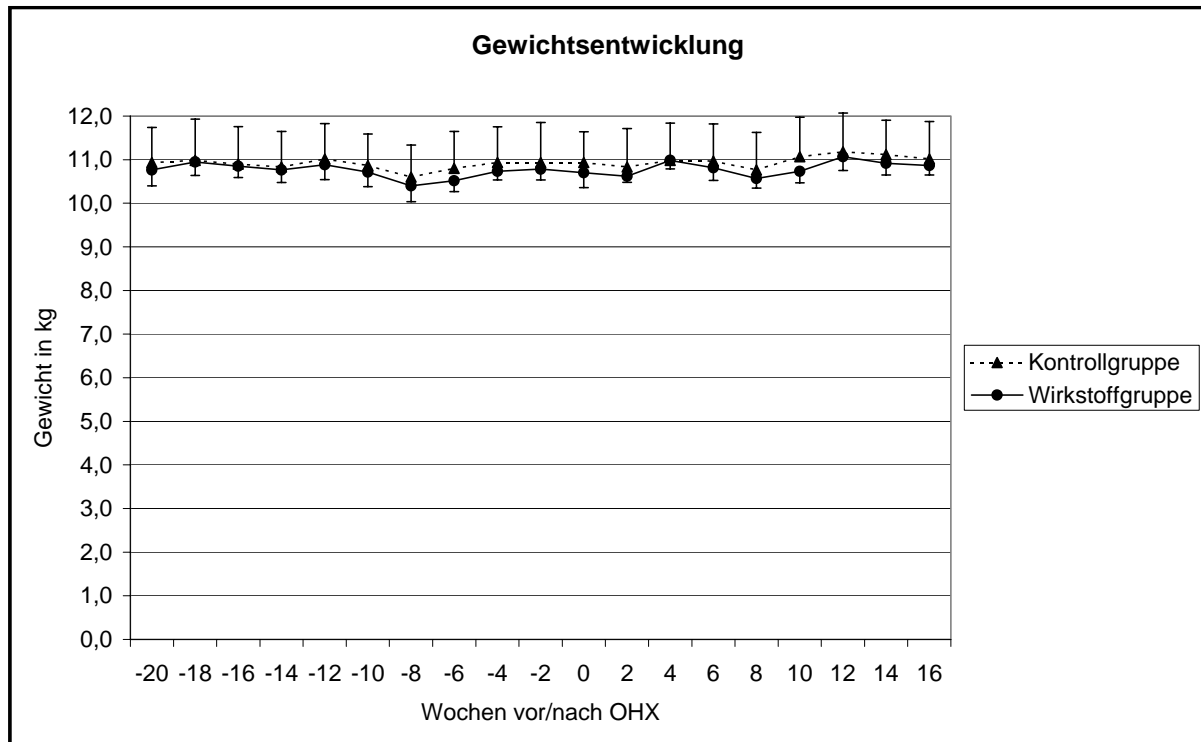


Abbildung 8: Gewichtsentwicklung der Hunde während des Versuchs

5.4. Ovariohysterektomie und Entnahme der Knochenbiopsien

Die Operationen erfolgten in einer interdisziplinären Zusammenarbeit mit dem Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München unter Leitung von Prof. W. Erhardt und Durchführung von Dr. J. Henke.

Sowohl die OHX, als auch die Entnahme der Knochenbiopsien erfolgte unter sterilen Bedingungen.

Durch Entnahme von Ovarien und Uterus konnte eine Aufhebung des Sexualzyklus mit kompletter Einstellung der Hormonproduktion sichergestellt, sowie Komplikationen durch eventuelle Metropathien verhindert werden.

Die Operationen verliefen ohne schwerwiegende Zwischenfälle. Nach den Eingriffen erlangten die Tiere innerhalb weniger Tage wieder ein ungestörtes Allgemeinbefinden. Auch die Futteraufnahme war nur bei einzelnen Hunden geringfügig beeinträchtigt. Bei zwei Hunden kam es nach der Ovariohysterektomie zu Blutungen in die Bauchhöhle. Durch sofortige Nachoperation wurden die Stümpfe am

Mesovar nochmals ligiert und die Blutung zum Stillstand gebracht. Auch die nachoperierten Tiere hatten innerhalb weniger Tage wieder eine ungestörtes Allgemeinbefinden.

Auch die Entnahme der Knochenbiopsien erfolgte problemlos. Bei zwei Hunden kam es nach der ersten Knochenbiopsieentnahme zur Nahtdehiszenz, die durch eine Wundresektion und erneuten, primären Wundverschluss behandelt wurde. Anschließend konnte keine Beeinträchtigung der Heilung beobachtet werden.

Allerdings waren die Größen der entnommenen Biopsieproben sehr unterschiedlich. Die Gesamtvolumina der Biopsien schwankten zwischen 7,36 mm³ und 65,46 mm³ (siehe auch 5.5.2.). Dies ist auf den kleinen Beckenknochen der Beagles und die damit verbundene, schwierige Auffindung der optimalen Entnahmestelle zurückzuführen. Dennoch konnten bei allen Biopsien äußere und innere Corticalis, sowie ausreichend Spongiosa zur Vermessung mit Mikrocomputertomographie gewonnen werden.

5.5. Bestimmung der Knochenmarker

Mit Hilfe der Knochenmarker können die dynamischen Vorgänge des Knochenstoffwechsels beurteilt werden. In der Humanmedizin sind dies Standardverfahren, die vor allem beim Monitoring von Knochenerkrankungen, wie z.B. der Osteoporose eingesetzt werden (Cantatore und Pipitone, 1999, Nishizawa et al., 2001). Dabei sollte immer mindestens ein Formations- und ein Resorptionsmarker gemessen werden. Die meisten auf dem Markt vorhandenen Assays für Knochenmarker sind daher auch humanspezifisch. Für die Beurteilung des Knochenstoffwechsels am Tiermodell sind nur wenige speziesspezifische Assays vorhanden, wie z.B. ein Osteocalcin-Assay für Ratten. Humanspezifische Assays müssen jeweils für die Anwendung beim Tier validiert werden, die Collagen-Crosslinks können jedoch mit HPLC speziesspezifisch bestimmt werden.

Sowohl beim Menschen, als auch bei Modelltieren der Osteoporose können nach OHX oder OVX Veränderungen am Knochenstoffwechsel mit Hilfe von Knochenmarkern gemessen werden.

Bei Frauen kann nach OVX durch den gesteigerten Knochenturnover ein deutlicher Anstieg sowohl der Formations-, als auch der Resorptionsmarker festgestellt werden. Zwölf Monate nach OVX fanden Pedrazzoni et al. (1996) einen Anstieg der bALP um 113%, OC stieg um 78% und Hydroxyprolin um 85%. Die Knochenmarker Pyd und ICTP steigen innerhalb der ersten drei Jahre nach OVX sogar deutlicher an als postmenopausal (Ohta et al., 2002). Bei Osteoporose werden durch den gesteigerten Knochenturnover ebenfalls erhöhte Werte an Formations- und Resorptionsmarkern festgestellt (Majkic-Singh et al., 2002).

Dieser Zusammenhang konnte für die Entwicklung von Tiermodellen für die postmenopausale Osteoporose genutzt werden.

Wronski et al. (1988) fanden bei Ratten in den ersten Monaten nach OVX histomorphometrisch einen Verlust an Knochenvolumen, sowie einen Anstieg der Knochenformationsrate. Auch Krammer (2001) konnte bei Ratten nach OVX neben einer Verminderung der Knochendichte einen Anstieg der Collagen-Crosslinks, sowie des Formationsmarkers Osteocalcin feststellen.

Dannuci et al. (1987) fanden auch bei Beagles nach OHX einen Anstieg des Formationsmarkers Osteocalcin, gemessen mit einem rattenspezifischem Assay, acht Wochen bis sechs Monate nach OHX. Martin et al. (1987) fanden zwölf Wochen nach OHX einen signifikanten Anstieg des Osteocalcins. Die Werte sanken zwar wieder, lagen bis zum Ende des Versuchs 12 Monate post OHX aber deutlich über den Werten der Kontrollgruppe. Die Alkalische Phosphatase zeigte keinen Anstieg. Auch Monier-Faugere et al. (1999) fanden vier Monate nach OHX einen signifikanten Anstieg des Osteocalcins.

Allerdings muss bei unserem Versuch berücksichtigt werden, dass zum Zeitpunkt der OHX auch eine Knochenbiopsie entnommen wurde. Dies kann, da der Knochendefekt behoben werden muss, ebenso Einfluss auf verschiedene Knochenmarker haben. Mc Laren et al. (1992) fanden bei Patienten mit Frakturen eine signifikant höhere Ausscheidung an Collagen Crosslinks im Urin. Ohishi et al. (1998) konnten allerdings innerhalb von 24 Wochen nach einer Fraktur keine signifikanten Veränderungen der Knochenmarker feststellen. Auch Edelmann-Stergiou (2000) konnte bei prämenopausalen Frauen mit Frakturen keinen Anstieg der bALP oder des Osteocalcins messen, dagegen war dies bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose der Fall. Hild (2001) konnte weder bei Patientinnen mit

Osteoporose, noch bei gesunden Frauen einen Anstieg der bALP in den ersten 14 Tagen nach einer Fraktur messen. Dennoch kann ein Einfluss auf die gemessenen Marker nicht ausgeschlossen werden.

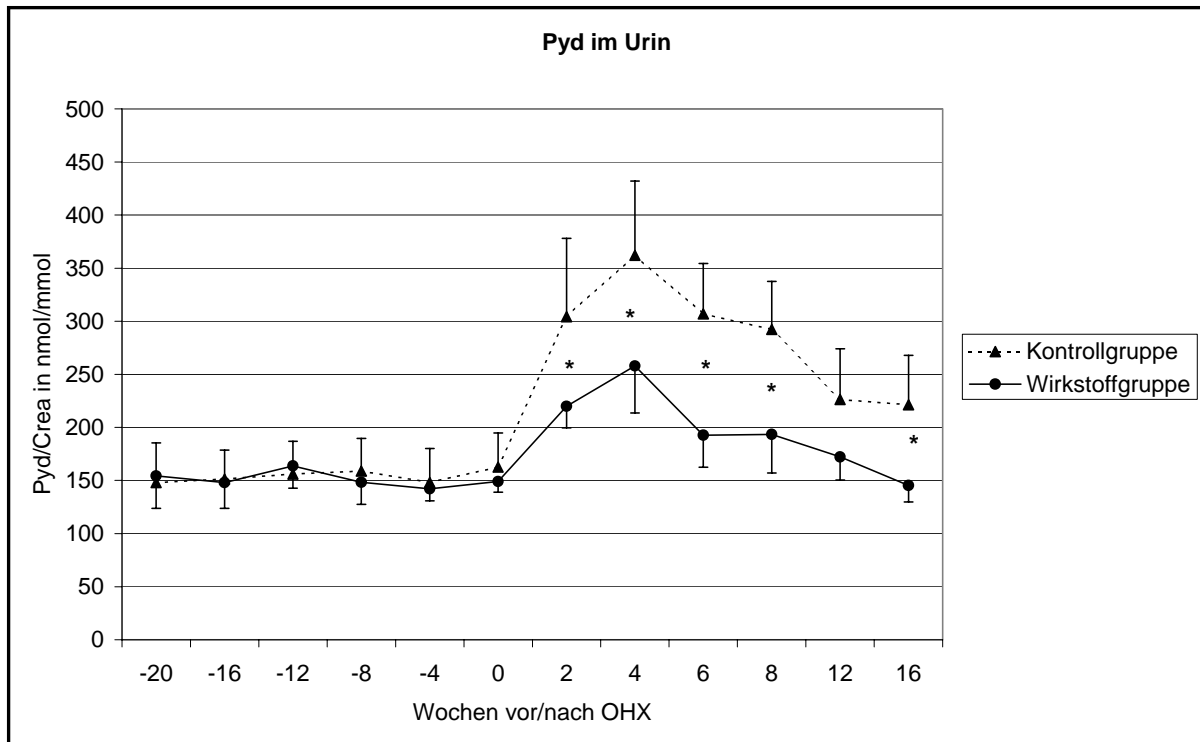
Collagen-Crosslinks im Urin

Die Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Deoxypyridinolin wurden mit einer speziesunabhängigen Methode mit HPLC bestimmt. Dabei wurde eine an unserem Institut entwickelte, verbesserte Methode zur Bestimmung von Pyridinolin und Deoxypyridinolin verwendet, die auf der als Standard geltenden Methode nach Black et al. (1988) und Colwell et al. (1993) basiert (Wehr, 1998). In diesem wurde Versuch erstmals eine neue Methode zur Vorreinigung der Urinproben verwendet, bei der eine feinere Cellulose angewendet wird. Durch die erhöhte Reinheit nach der Vorfraktionierung konnten bei der nachfolgenden Messung mit HPLC störende Peaks vermieden und dadurch die Peaks der Crosslinks eindeutig identifiziert werden.

Es wurde 24 Stunden-Urin gesammelt, um die laut Liesegang et al. (1999) beim Hund auftretenden, tageszeitlichen Unregelmäßigkeiten auszugleichen. Außerdem wurden die gemessenen Werte von Pyridinolin und Deoxypyridinolin auf die Creatininkonzentrationen bezogen, um Schwankungen z.B. durch Verdunstung des Urins im Stoffwechsellkäfig auszugleichen.

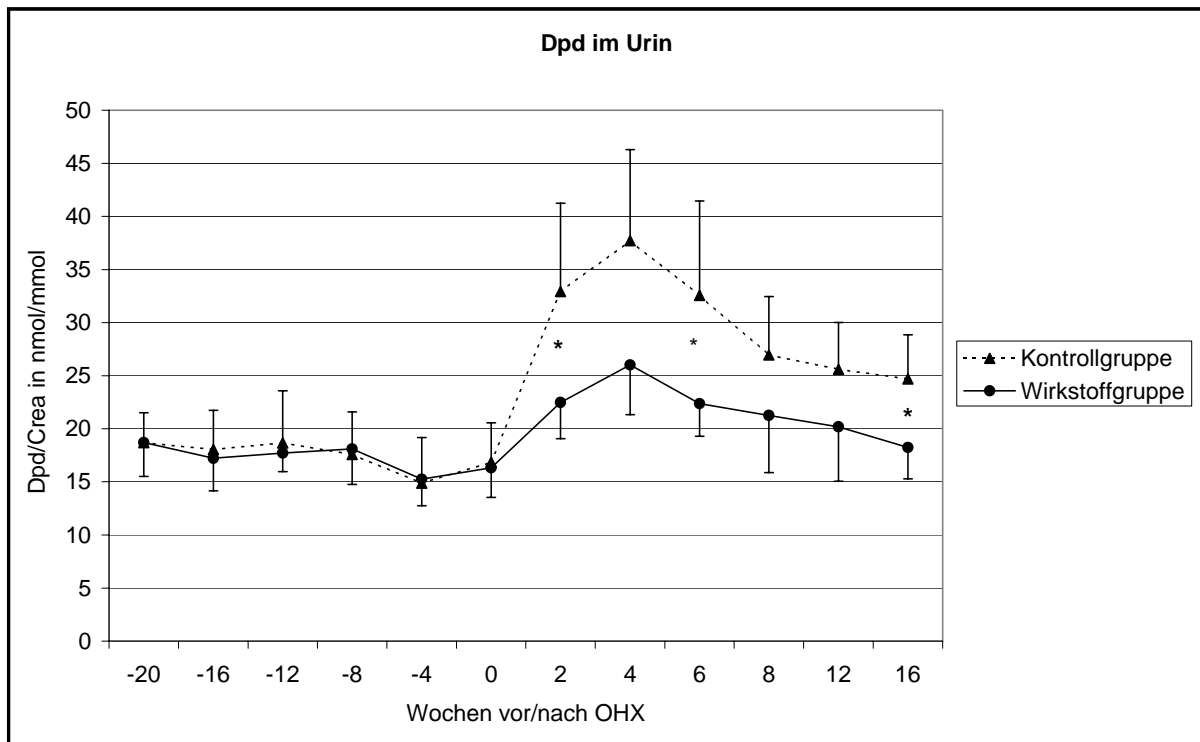
Da bisher keine Referenzwerte für den Hund vorhanden sind, musste auf Veränderungen der Exkretion der Crosslinks innerhalb der Gruppen bzw. zwischen den Gruppen geachtet werden.

In Abb. 9 ist der Anstieg von Pyridinolin im Urin in beiden Gruppen nach OHX erkennbar. Die Exkretion war in beiden Gruppen bis zu 12 Wochen nach OHX signifikant erhöht. Allerdings war in der Kontrollgruppe nach OHX ein Anstieg um 135% zu verzeichnen, im Gegensatz zu 71% in der Wirkstoffgruppe. Bis zur Woche acht nach OHX waren die Werte in der Kontrollgruppe signifikant höher als in der Wirkstoffgruppe ($p < 0,05$). Außerdem war am Ende des Versuchs die Ausscheidung von Pyridinolin in der Kontrollgruppe noch signifikant höher als zum Zeitpunkt der OHX ($p < 0,05$). Im Gegensatz dazu waren in der Wirkstoffgruppe die Werte wieder auf das Niveau vor OHX abgesunken.



* : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt

Abbildung 9: Ausscheidung von Pyridinolin im Urin während des gesamten Versuchs in nmol/mmol Creatinin



* : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt

Abbildung 10: Ausscheidung von Deoxypyridinolin im Urin während des gesamten Versuchs in nmol/mmol Creatinin

Auch Dpd zeigte einen ähnlichen Verlauf (Abb. 10). In der Kontrollgruppe betrug die maximale Steigerung der Exkretion von Dpd im Urin 116%, in der Wirkstoffgruppe dagegen nur 51%. Zwei, sechs und sechzehn Wochen nach OHX waren die Werte in der Kontrollgruppe signifikant höher als in der Wirkstoffgruppe ($p < 0,05$). Im Gegensatz dazu war in der Wirkstoffgruppe die Ausscheidung nur bis sechs Wochen post OHX signifikant erhöht ($p < 0,05$) und nahm bis zum Ende des Versuchs wieder Werte vor OHX an.

In beiden Gruppen war eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Pyridinolin- und der Deoxypyridinolinausscheidung vorhanden. Da diese beiden Marker im Körper in einem definierten Verhältnis vorliegen, das beim erwachsenen Menschen 3,5:1 beträgt, erfolgt auch ihre Ausscheidung im Urin in einem definierten Verhältnis. Allerdings muss das Alter der Tiere beachtet werden, da junge Tiere aufgrund des Knochenwachstums mehr Pyridinolin ausscheiden, da dies in höheren Anteilen auch im Knorpel vorhanden ist. Die Hunde waren jedoch schon zu Beginn des Versuchs ausgewachsen, ein altersbedingter Einfluss kann daher ausgeschlossen werden.

Knochenspezifische Alkalische Phosphatase im Serum

Die Bestimmung der bALP wurde mit Hilfe eines Enzymimmunoassay durchgeführt, der für die Bestimmung von humaner bALP im Serum vorgesehen ist. Allen et al. (2000a) fanden mit dieser Methode im Serum von Hunden eine exzellente Kreuzreaktivität, sowie einen Korrelationskoeffizienten von 0,96 und eine Standardkurve, die zu der aus menschlichem Serum parallel ist. Daher kann angenommen werden, dass die Anwendung dieses Assays auch für den Hund geeignet ist.

Auch bei diesem Marker wurden aufgrund fehlender Referenzwerte für den Hund vor allem die Unterschiede zwischen den Gruppen, sowie die Veränderungen innerhalb der Gruppen nach OHX beachtet. In Abb. 11 ist der Verlauf der Konzentrationen der bALP im Serum der Hunde dargestellt.

In unserem Versuch sanken die Standardabweichungen in der Wirkstoffgruppe vor OHX ab und waren zum Zeitpunkt der OHX schon deutlich geringer als in der Kontrollgruppe. Dies kann als positive Auswirkung der Supplementierung mit

Genistein, PUFA, Vitamin D und K auf den Knochenstoffwechsel bewertet werden. Die geringere Schwankungsbreite der bALP zeigt, dass der Knochenstoffwechsel durch die Gabe der Wirkstoffe stabilisiert wird und damit weniger anfällig für Schwankungen und Imbalancen ist. Schwankungen im Knochenstoffwechsel können zu Knochenmasseverlusten führen, wie dies bei Frauen mit postmenopausaler Osteoporose der Fall ist. Bei gesteigertem Knochen turnover werden dabei zwar auch erhöhte Formationsmarker gemessen, dennoch kommt es zu einem Verlust an Knochenmasse (Majkic-Singh et al., 2002). Dresner-Pollak (1996) fand bei Frauen eine negative Korrelation sowohl der Resorptionsmarker, als auch des Formationsmarkers bALP mit der Knochendichte.

Auch nach OHX blieben im vorliegenden Versuch die Standardabweichungen in der Wirkstoffgruppe niedriger als in der Kontrollgruppe. Es ist daher neben der präventiven Wirkung auf das Gleichgewicht des Knochenstoffwechsels auch eine gewisse therapeutische Wirkung nach OHX zu erkennen, die das Gleichgewicht der Knochenformation erhält.

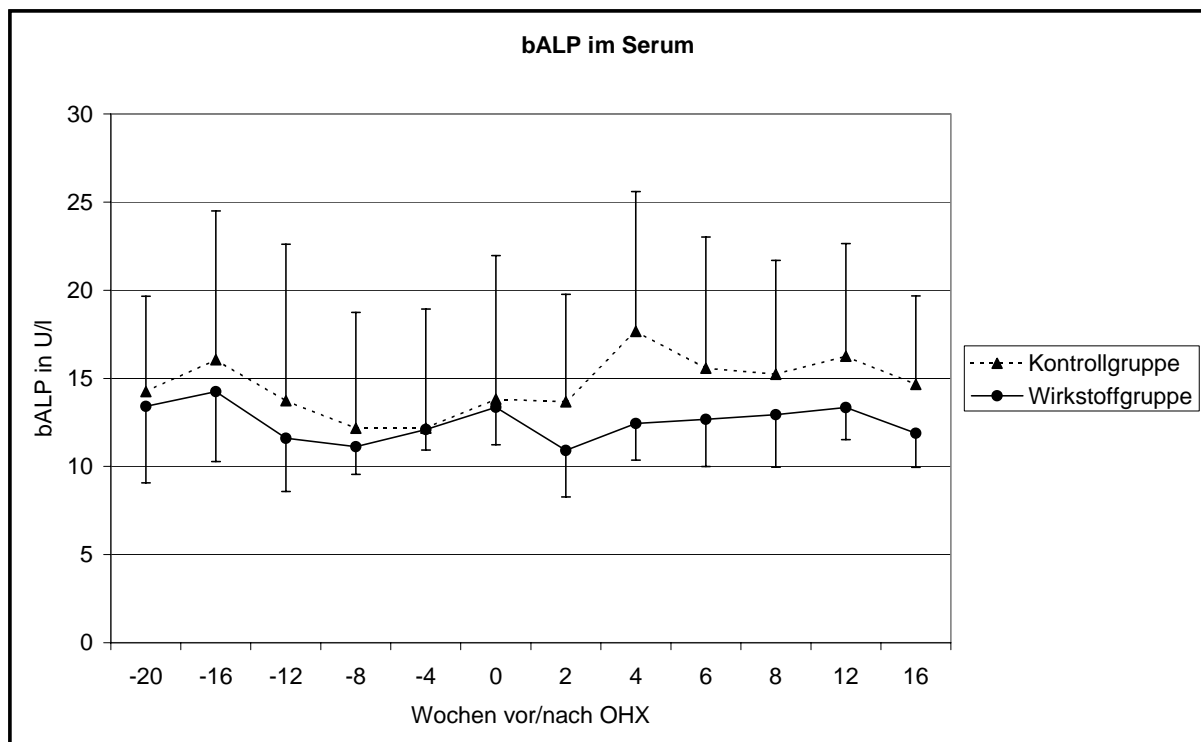


Abbildung 11: Knochenspezifische Alkalische Phosphatase im Serum der Hunde in U/l während des Versuchs

Vor OHX waren bei der Messung der bALP im Serum nur geringfügige Unterschiede zwischen und innerhalb der Gruppen vorhanden. Nach OHX war in der Kontrollgruppe ein geringer Anstieg der Werte erkennbar, der allerdings nicht signifikant war. Bis zum Ende des Versuchs fielen sie wieder bis fast auf die Ausgangswerte ab. In der Wirkstoffgruppe waren auch nach OHX nur geringfügige Schwankungen festzustellen.

Obwohl keine dieser Veränderungen statistisch signifikant war, kann man dennoch von einem leichten Anstieg der Knochenformation nach OHX ausgehen. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Studien beim Hund, die nach OHX einen Anstieg der Knochenformation, allerdings durch Messung des Markers Osteocalcin, nachweisen konnten (Dannucci et al., 1987; Martin et al., 1987, Monier-Faugere et al., 1999).

In der Kontrollgruppe lagen zwischen der bALP und den Collagen-Crosslinks positive Korrelationen vor. Dies zeigt, dass in der Kontrollgruppe nach OHX sowohl ein Anstieg der Knochenresorption, als auch der –formation vorlag. Auch bei Frauen nach der Menopause, bzw. mit postmenopausaler Osteoporose kommt es zum Anstieg der Resorptions-, gleichzeitig aber auch der Formationsmarker des Knochens (Ebeling et al., 1996; Majkic-Singh et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit kam es in beiden Gruppen nach OHX zu einem Anstieg der Exkretion der Crosslinks im Urin. Allerdings zeigte sich in der Kontrollgruppe bei beiden Knochenmarkern ein deutlich höherer Anstieg. Vier Wochen nach OHX konnte die maximale Steigerung der Knochenresorption gemessen werden. Dies entspricht Ergebnissen bei Schweinen (Wirner, 1997) und Ratten (Krammer, 2001), bei denen ebenfalls nach vier Wochen eine deutlich gesteigerte Resorption nachgewiesen werden konnte. Es kann daher angenommen werden, dass diese Veränderungen beim Hund ebenfalls durch die OHX ausgelöst wurden. Beim Menschen kann die Steigerung des Knochenturnovers nachfolgend einen Verlust an Knochenmasse verursachen, wobei die Formations- und die Resorptionsmarker negativ mit der Knochendichte korrelieren (Dresner-Pollak et al., 1996). Von den Markern können daher auch Rückschlüsse auf die Knochendichte und das Frakturrisiko gezogen werden (Looker et al., 2000).

Da in der Wirkstoffgruppe die Ausscheidung der Collagen-Crosslinks nach OHX niedriger war als in der Kontrollgruppe, kann angenommen werden, dass durch die Gabe der Wirkstoffkombination eine Hemmung der gesteigerten Resorption möglich war. Außerdem sanken die Werte der Collagen-Crosslinks in der Wirkstoffgruppe bis zum Ende des Versuchs wieder auf die Ausgangswerte vor OHX ab, in der Kontrollgruppe waren sie am Ende des Versuchs signifikant höher als in der Wirkstoffgruppe.

Zusätzlich konnte in der Kontrollgruppe eine gewisse Steigerung der Knochenformation gemessen werden, die durch die Gabe der Wirkstoffkombination verhindert wurde.

Da ein Wirkstoffgemisch verwendet wurde, kann in der vorliegenden Arbeit nicht genauer beurteilt werden, worauf die Gesamtwirkung zurückzuführen ist.

Eine antiresorptive Wirkung des Genisteins wurde schon am Tiermodell (Coxam, 2003) und an Knochenzelllinien gezeigt (Gao und Yamaguchi, 1999). Auch in humanmedizinischen Interventionsstudien wurde eine Verminderung der Resorption durch Isoflavone beobachtet (Arjmandi et al., 2003). Des Weiteren konnte durch Isoflavone eine Abschwächung der gesteigerten Knochenformation bewirkt werden (Mei et al., 2001).

Ebenso kann die Gabe von Vitamin D eine Verminderung der erhöhten Knochenresorption zu bewirken (Shiraki, 1993). Auch eine hemmende Wirkung auf den gesteigerten Knochen turnover und damit auch der Formation ist bekannt. Dies zeigen sowohl humanmedizinische Studien (Sairanen et al., 2000), als auch Studien am Tiermodell Ratte (Erben et al., 1992) und Beagle (Nakamura et al., 1992).

Durch die zusätzliche Gabe von Vitamin K kann dabei ein synergistischer Effekt beobachtet werden. Vitamin D kann die Aktivität von Vitamin K und damit die gamma-Carboxylierung von Osteocalcin steigern (Miyake et al., 2001). Sowohl im Tiermodell Ratte (Matsunaga et al., 1999), als auch beim osteoporotischen Menschen (Iwamoto et al., 2000) zeigte eine Kombination von Vitamin D und K eine stärkere Wirkung als die Gabe der Einzelsubstanzen.

Auch die PUFAs, und hier vor allem die Omega-3-Fettsäuren, können an der Senkung der Knochenresorption beteiligt sein (Claassen et al., 1995; Frischknecht, 2003). Ebenso kann durch die PUFAs eine Steigerung der Calciumabsorption, sowie eine erhöhte Aktivität der Osteoblasten bewirkt werden (Vanpapendorp et al., 1995).

Krammer (2001) konnte bei Ratten nach OVX durch die alleinige, hochdosierte Gabe von Vitamin D und K keine Veränderungen der Knochenformation oder –resorption bewirken. Sowohl die Gabe von PUFA, als auch die alleinige Verabreichung von Genistein konnte eine Steigerung der Formation, wie auch eine Hemmung der Resorption erreichen. Bei einer Kombination der Wirkstoffe konnte ein verstärkter Effekt beobachtet werden, der sowohl auf einer additiven, als auch auf einer synergistischen Wirkung der Einzelsubstanzen beruhen kann.

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass durch die Kombination der Wirkstoffe eine antiresorptive, wie auch eine gewisse antiformative Wirkung erzielt wurde. Außerdem konnte die gesteigerte Knochenresorption in der Wirkstoffgruppe schneller wieder reduziert werden und die Schwankungen der Knochenformation verringert werden, was zu einer Stabilisierung des Knochenstoffwechsels beiträgt.

Bei Beagles nach OHX wurden Veränderungen im Knochenstoffwechsel noch nach sechs (Dannucci et al., 1987), bzw. acht Monaten (Drezner und Nesbitt, 1990), teilweise sogar bis zu 31 Monate nach OHX nachgewiesen (Yamaura et al., 1993). In unserem Versuch befand sich in der Wirkstoffgruppe der Knochenstoffwechsel nach vier Monaten wieder im Gleichgewicht.

5.6. Calciumausscheidung im Urin

Der Gehalt an Calcium im Urin wurde flammenphotometrisch bestimmt. Um tageszeitliche Schwankungen zu vermeiden wurde von den Hunden 24 Stunden-Urin gesammelt. Außerdem wurden die gemessenen Calciumwerte auf die jeweiligen Creatininkonzentrationen normiert. Dadurch konnten Unregelmäßigkeiten, die z.B. durch Verdunstung des Urins in den Stoffwechselkäfigen oder unterschiedliche Urinvolumina der einzelnen Tiere entstehen, ausgeglichen werden.

In Abb. 12 ist zu erkennen, dass die Calciumausscheidung im Urin in der Wirkstoffgruppe zu fast allen Zeitpunkten höher war als in der Kontrollgruppe. Allerdings war der Unterschied zu keinem Zeitpunkt signifikant. Auch konnte nach OHX in keiner der beiden Versuchsgruppen eine signifikante Änderung der Calciumausscheidung festgestellt werden.

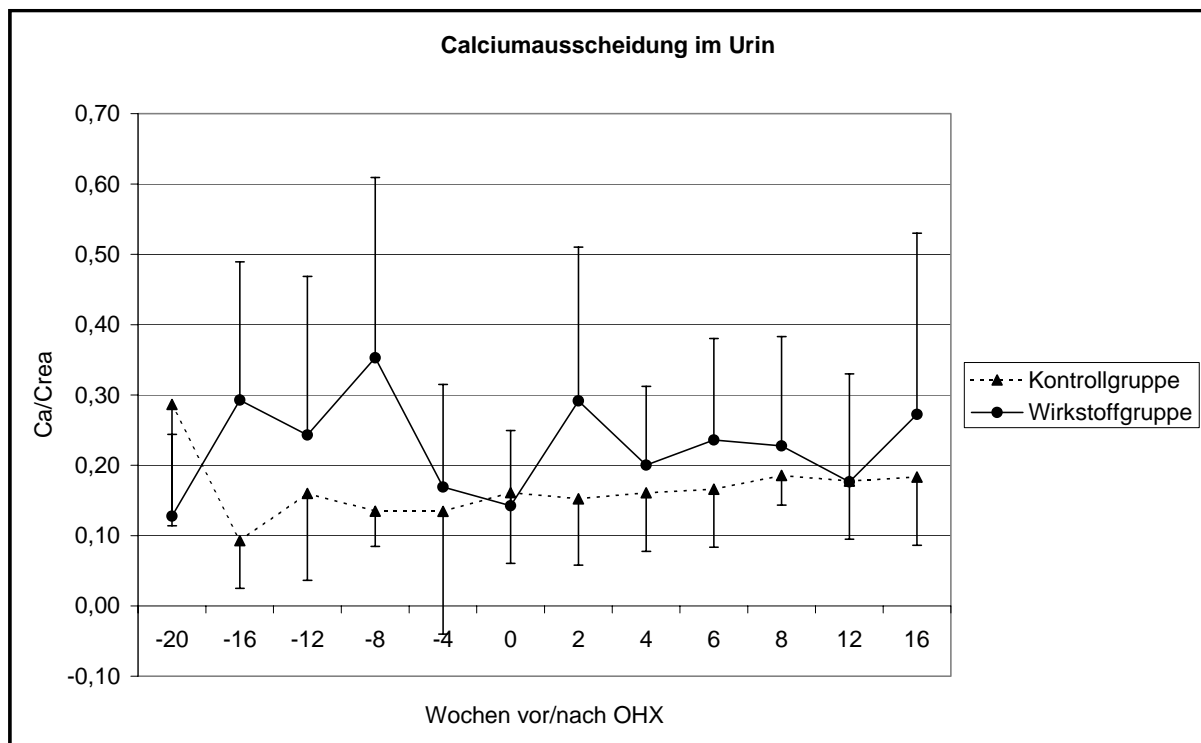


Abbildung 12: Calciumausscheidung im Urin während des Versuchs

Worauf die erhöhte Calciumexkretion in der Wirkstoffgruppe zurückzuführen sein könnte, kann in diesem Versuch nicht sicher beurteilt werden, da auch hier ein Zusammenwirken der Einzelsubstanzen anzunehmen ist.

Die hochdosierte Gabe von Vitamin D könnte eine Veränderung der Calciumausscheidung verursachen. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bewirkt zwar neben einer gesteigerten intestinalen Calciumabsorption auch eine erhöhte tubuläre Rückresorption. Ist allerdings der Calciumspiegel im Blut erhöht, so kommt es zu einem negativen „Feedback“ Mechanismus, der wiederum eine Hemmung der 1 alpha Hydroxylase bewirkt. Dies hat eine verminderte Synthese von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ zur Folge und damit auch eine verminderte tubuläre Rückresorption. Der von Kruger und Horrobin (1997) beschriebene Effekt, dass PUFAs die Calciumexkretion im Urin reduzieren können, konnte so in diesem Versuch nicht bestätigt werden.

In unserem Versuch waren sowohl inter-, als auch intraindividuell große Schwankungen in der Calciumausscheidung vorhanden waren, dadurch konnte in beiden Gruppen eine große Streuung gemessen werden.

In der Humanmedizin wird die Calciumexkretion im Urin als wenig spezifischer und sensitiver Marker angesehen. Dies liegt unter anderem daran, dass die Ausscheidung von Calcium im Urin von der Aufnahme mit der Nahrung abhängig ist. Im vorliegenden Versuch bekamen alle Hunde ein Futter mit definiertem Calciumgehalt (siehe 3.2., Tabelle 9), durch die unterschiedliche Energie- und damit auch Futterzuteilung war allerdings auch die Calciumaufnahme der Hunde gewissen Schwankungen unterworfen. Zusätzlich ist die Calciumexkretion auch von der Nierenfunktion, sowie von Calcium-regulierenden Hormonen, wie PTH und auch Östrogen abhängig. Dies könnte vor allem vor der OHX einen Einfluss auf die Calciumausscheidung gehabt haben.

5.7. Analyse der Knochenbiopsien

5.7.1. Biochemische Analyse

Nach Trocknung der Knochenbiopsien im Trockenschrank, wurde der Gehalt an Asche durch Veraschung im Muffelofen, der Calciumgehalt flammenphotometrisch bestimmt. Da die Biopsieproben in Formalin gelagert wurden, das mit Phosphatpuffer gepuffert war, war eine Analyse des Phosphorgehalts der Knochenproben nicht sinnvoll.

In unserem Versuch war der mittlere Aschegehalt der Biopsien und damit der Mineralgehalt des Knochens in der Wirkstoffgruppe vor OHX signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Grund hierfür kann eine präventive Wirkung der Wirkstoffkombination auf den Mineralgehalt des Knochens sein.

Eine positive Wirkung von Isoflavonen auf den Mineralgehalt des Knochens konnte schon in verschiedenen Studien gezeigt werden. Dabei konnte ein Verlust an BMC verhindert werden (Alekel et al., 2000) oder der BMC sogar gesteigert werden (Potter et al., 1998). Vitamin D ist beim Menschen, wie auch beim Hund für die Mineralisation von Osteoid im Skelett und damit auch für den Einbau von Calcium in den Knochen verantwortlich (Hazewinkel und Tryfonidou, 2002). Lukert et al. (1992) konnten eine positive Korrelation zwischen der Vitamin D-Aufnahme und der Knochendichte aufzeigen. Auch die Vitamin K-Aufnahme zeigt einen Zusammenhang zur Knochendichte (Booth et al., 2003). Eine positive Wirkung der PUFAs auf den

Mineralgehalt des Knochens kann nur vermutet werden, da sie die Calciumabsorption steigern. Ein Zusammenhang mit der Knochendichte oder dem Mineralgehalt des Knochens wurde noch nicht untersucht.

Auch nach OHX war der Aschegehalt in unserem Versuch in der Wirkstoffgruppe höher als in der Kontrollgruppe, allerdings nicht signifikant. Innerhalb der Gruppen konnte nach OHX keine Änderung festgestellt werden.

Der Calciumgehalt des Knochens in der Wirkstoffgruppe war sowohl vor, als auch nach OHX höher als in der Kontrollgruppe, allerdings nicht signifikant. Nach OHX sank der mittlere Calciumgehalt im Knochen in der Wirkstoffgruppe um 7,3% ab. Bei den Tieren der Kontrollgruppe dagegen stieg er um 2,3% an.

Der mittlere Calciumgehalt in der Knochenasche sank nach OHX sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der Wirkstoffgruppe ab. In der Kontrollgruppe betrug der Verlust 2,3%, in der Wirkstoffgruppe 7,8%.

Nach OVX konnte im Tiermodell Ratte ein Absinken des Calciumgehaltes, sowie des Aschegehaltes in Tibia und Femur festgestellt werden (Harrison et al., 1998). Auch Yamaguchi et al. (1999) konnten bei Ratten nach OVX einen signifikanten Verlust an Calcium im Femurknochen messen. Beim Hund muss allerdings beachtet werden, dass nach OHX nur vorübergehend ein mäßiger Verlust an Knochenmasse stattfindet. Im Gegensatz zum Menschen ist beim Hund kein Krankheitsbild der Osteoporose mit Frakturen bekannt (Newman et al., 1995; Coxam, 2003). Daher ist diese Spezies wohl in der Lage den gesteigerten Knochen turnover nach OHX zu regulieren und ein Gleichgewicht des Knochenstoffwechsels wiederherzustellen.

Es kann zwar von einer präventiven Wirkung auf den Calcium-, wie auch den Mineralgehalt des Knochens ausgegangen werden, therapeutisch ist jedoch ein Verlust des Calciumgehaltes nach OHX nur wenig zu beeinflussen.

5.7.2. Analyse mit Mikrocomputertomographie

Die mikrocomputertomographischen Analysen der Biopsien wurden in einer interdisziplinären Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Privatdozent Dr. F. Eckstein an der Anatomischen Anstalt der Medizinischen Fakultät der LMU München durchgeführt. Mit Hilfe der Mikrocomputertomographie konnte die dreidimensionale Mikrostruktur der Knochenbiopsien mit einer hohen, räumlichen Auflösung von 26 µm

analysiert werden. Die Messung liefert eine sehr präzise und detailgetreue Darstellung der Trabekel, ohne die Biopsieprobe zu zerstören und sie damit für die biochemischen Analysen zu erhalten.

Aufgrund der unterschiedlich großen Proben (siehe 5.3.), wurde bei der Vermessung im Mikrocomputertomographen jede Probe individuell analysiert. Dabei wurden die einzelnen Schichten kontrolliert und mit Hilfe der Software jeweils ein, der Probengröße und -form angepasster, Zylinder hineinprojiziert. Dadurch wurde vermieden, dass Artefakte, die durch die Probengewinnung entstanden sein können, vermessen werden. Außerdem konnte in jeder Probe das maximal mögliche Volumen vermessen werden. Dadurch konnte gleichzeitig ein Vergleich der Proben untereinander gewährleistet werden.

Bei den durch Mikrocomputertomographie gewonnenen Daten zeigen sich allerdings sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der Wirkstoffgruppe nach OHX nur geringfügige Veränderungen.

In beiden Gruppen blieb der Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen (BV/TV) der Biopsieproben fast gleich. Auch das Verhältnis von Knochenoberfläche zum Knochenvolumen (BS/BV) zeigte weder signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, noch im Vergleich vor und nach OHX.

Dies entspricht den Ergebnissen von Boyce et al. (1990), die in Knochenbiopsien von Beagles nach einem, drei, sechs und zehn Monaten post OHX histomorphometrisch keine signifikante Reduktion des Knochenvolumen feststellen konnten. Auch Shen et al. (1992) konnten fünf Monate nach OHX histomorphometrisch keine Unterschiede nachweisen. Weder das trabekuläre Knochenvolumen, noch die Osteoidoberfläche waren verändert.

Die mittlere Anzahl der Trabekel sank in den eigenen Untersuchungen in beiden Gruppen nach OHX ab. In der Kontrollgruppe war dabei ein statistisch signifikanter Verlust erkennbar ($p < 0,05$). Die mittlere Dicke der Trabekel zeigte weder Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, noch im Vergleich vor und nach OHX. Beim mittleren Abstand der Trabekel war in beiden Gruppen nach OHX ein leichter Anstieg erkennbar, die Veränderungen waren allerdings nicht signifikant. Ob die Wirkstoffkombination einen Einfluss auf die Mikrostruktur des Knochens hatte, kann hier nicht geklärt werden. Shiraishi et al. (2002) konnten bei Ratten nach OVX einen Effekt von Vitamin D und K nachweisen, wobei Vitamin D sowohl die Resorption hemmen, als auch die Formation stimulieren konnte. Vitamin K hatte wenig Einfluss

auf den Knochen turnover, konnte aber dennoch einen Knochenverlust verhindern und die Qualität des Knochens beeinflussen. Inwiefern diese Wirkungen auch bei den Beagles nach OHX zu beobachten sind kann hier nicht geklärt werden, da die aufgetretenen Veränderungen doch sehr gering sind.

Am Tiermodell ovariektomierte Ratte konnten Barbier et al. (1999) den signifikanten Einfluss der OVX auf die durch Mikro-CT gemessenen Parameter BV/TV, TbN und TbTh nachweisen. Außerdem konnten sie gute Korrelationen zu den durch Histomorphometrie gewonnenen Parametern feststellen, was wiederum den Vergleich zwischen den Studien erleichtert. Dennoch muss beachtet werden, dass ein direkter Vergleich des Knochenstoffwechsels von Hund und Ratte nach OVX, bzw. OHX nicht möglich ist.

Mikrocomputertomographische Untersuchungen sind zwar an Knochen von Hunden schon durchgeführt worden (Van Rietbergen et al., 1999; Hu et al., 2002), in diesen Studien wurden allerdings Femur, Humerus und Lendenwirbel analysiert und es wurde nicht der Einfluss der OHX bewertet.

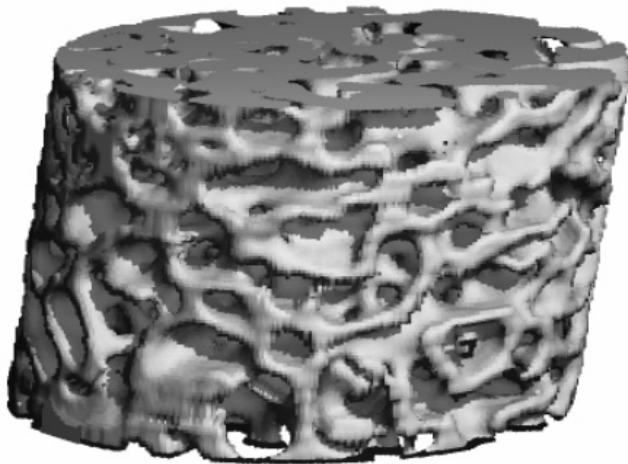


Abbildung 13: Dreidimensionales Bild einer Mikro-CT Auswertung

Die OHX hat beim Hund, wie auch histomorphometrische Studien an Knochenbiopsien zeigen, nur einen geringen Einfluss auf die Mikroarchitektur des Knochens. Nur die Anzahl der Trabekel zeigte in unserem Versuch nach OHX eine signifikante Veränderung.

Bei der Analyse von Knochenbiopsien mit Histomorphometrie konnten Faugere et al. (1990) schon nach einem Monat post OHX eine signifikante Vergrößerung des Abstandes der Trabekel um 42% feststellen. Vier Monate nach OHX, was dem Zeitabstand in unserem Versuch entspricht, wurde in verschiedenen Studien ebenfalls eine Vergrößerung des Abstandes zwischen den Trabekeln nachgewiesen, die allerdings signifikant war (Malluche et al., 1986b; Monier-Faugere et al., 1999). Die Dicke der Trabekel zeigte in keiner der beiden Studien eine Veränderung, was den Resultaten in unserer Studie entspricht.

Allerdings können Veränderungen des Knochenstoffwechsels auch noch zu einem späteren Zeitpunkt festgestellt werden. Yamaura et al. (1993) fanden 31 Monate nach OVX histomorphometrisch eine verminderte Anzahl der Trabekel, sowie einen erhöhten Trabekelabstand. Nakamura et al. (1992) konnten ebenfalls 31 Monate nach OVX eine verminderte Anzahl und Dicke der Trabekel, sowie einen größeren Abstand zwischen den Trabekeln nachweisen. Auch das Knochenvolumen war nach dieser Zeit reduziert.

Es ist daher anzunehmen, dass vier Monate nach OHX zwar schon Veränderungen in der Mikroarchitektur des Knochens vorhanden sind, diese aber ihr Maximum noch nicht erreicht haben und daher zu späteren Zeitpunkten deutlichere Veränderungen messbar sind. Da die Marker der Knochenresorption in der Kontrollgruppe vier Monate nach OHX auch noch signifikant erhöht waren, ist davon sogar auszugehen.

5.8. Einfluss der Wirkstoffe auf den Knochenstoffwechsel

Zu keinem Zeitpunkt des Versuches wurde bei den Hunden in der Wirkstoffgruppe eine Hypercalcämie oder eine Hypercalciurie beobachtet. Auch bei 150-facher Überdosierung kann daher davon ausgegangen werden, dass beim Hund keine toxischen Effekte des Vitamin D zu erwarten sind. Eine Beeinflussung der Blutgerinnung durch die hochdosierte Vitamin K-Gabe in der Wirkstoffgruppe wurde ebenfalls weder bei den Blutentnahmen, noch bei den Operationen beobachtet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Studie durch die Ovariohysterektomie eine deutliche Steigerung der Knochenresorption ausgelöst wurde. Dies ließ sich an der signifikant erhöhten Ausscheidung der Resorptionsmarker Pyridinolin und Deoxypyridinolin erkennen.

In der Mikrocomputertomographie war außerdem vier Monate nach OHX eine signifikant erniedrigte Trabekelanzahl, sowie eine geringfügige Vergrößerung des Abstandes der Trabekel in der Kontrollgruppe erkennbar, die wiederum ein Ergebnis der erhöhten Resorptionsrate darstellen. Diese Veränderungen könnten zu einem späteren Entnahmezeitpunkt der Biopsien eventuell noch deutlicher in Erscheinung treten, da am Ende des Versuchs immer noch eine erhöhte Resorption messbar war. Obwohl eine signifikante Beeinflussung der Knochenformation nach OHX in unserem Versuch nicht beobachtet werden konnte, war eine leichte Erhöhung des Formationsmarkers bALP in der Kontrollgruppe vorhanden.

Da mit der Supplementierung der Wirkstoffe schon fünf Monate vor OHX begonnen wurde, konnte eine präventive Wirkung auf den Mineral- und Calciumgehalt des Knochens beobachtet werden. Ein Verlust an Calcium im Knochen konnte nach OHX nicht vollständig verhindert werden.

Therapeutisch konnte jedoch ein gewisser Effekt auf die Mikroarchitektur des Knochens beobachtet werden. Ein signifikanter Verlust der Anzahl der Trabekel, der in der Kontrollgruppe vorhanden war, konnte durch die Gabe der Wirkstoffe verringert werden. In der Wirkstoffgruppe war das Absinken der Trabekelzahl nicht signifikant. In der Kontrollgruppe war außerdem nach OHX eine leichte Erhöhung des Formationsmarkers bALP vorhanden, die in der Wirkstoffgruppe vermieden werden konnte. Ferner war hier ein gewisser präventiver Effekt zu beobachten, der auf eine Stabilisierung des Knochenstoffwechsels schließen lässt.

Da die Tiere in der Wirkstoffgruppe eine Kombination der Stoffe Genistein, Vitamin D und K, sowie Omega-3-Fettsäuren bekamen, lässt sich nicht genau sagen auf welcher Wirkung die gemessenen Veränderungen beruhen. Sowohl die Einzelwirkung der Stoffe, als auch ihr Zusammenspiel, kann zu einer Beeinflussung des Knochenstoffwechsels vor, wie auch nach OHX geführt haben.

Die Veränderungen der Mikrostruktur des Knochens, wie auch der biochemischen Zusammensetzung der Knochenbiopsien waren bis zum Ende des Versuchs nur gering. Mit Hilfe der Knochenmarker war es jedoch möglich auch diese frühen Abweichungen zu erfassen und so eine Aussage über die dynamischen Veränderungen des Knochenstoffwechsels zu machen.

6. Zusammenfassung

Der Einfluss von Phytoöstrogenen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Vitamin D und K und auf den Knochenstoffwechsel und die Mikroarchitektur des Knochens:

Untersuchungen am intakten und ovariohysterektomierten Beagle.

Der Krankheitskomplex Osteoporose stellt in der Europäischen Union, alleine durch die stationäre Behandlung von osteoporotischen Wirbel- und Hüftfrakturen, eine Kostenbelastung in Höhe von jährlich über vier Milliarden Euro dar.

Nicht nur aus diesem Grund ist eine wirksame Therapie bzw. rechtzeitige Prävention der Osteoporose angezeigt. Im Rahmen der postmenopausalen Osteoporose stellte die Hormonersatztherapie bislang das Mittel der Wahl dar. Allerdings sind bei dieser Therapie neben einer sehr niedrigen Compliance der Patientinnen, immer mehr Risiken, wie die gesteigerte Gefahr an Brust- oder Eierstockkrebs zu erkranken, nachgewiesen worden. Daher ist die Suche nach alternativen Präventions- und Therapiemöglichkeiten von aktuellstem Interesse. Für die Substanzgruppen Phytoöstrogene und mehrfach ungesättigte Fettsäuren, sowie die Vitamine D und K konnte in vitro und teilweise auch in vivo knochenwirksame Effekte nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Wirkung einer Kombination von Genistein, Omega-3-Fettsäuren, sowie Vitamin D und Vitamin K auf den Knochenstoffwechsel, sowie die Mikroarchitektur des Knochens beim intakten wie auch beim ovariohysterektomierten Hund untersucht. Der ovariohysterektomierte Beagle stellt dabei ein von der amerikanischen „Food and Drug Administration“-Behörde anerkanntes „large animal model“ für die postmenopausale Osteoporose dar.

Die Untersuchung wurde als Fütterungsversuch über einen Zeitraum von neun Monaten an 12 weiblichen Beagles durchgeführt, die randomisiert einer Kontroll- und einer Wirkstoffgruppe zugeteilt wurden. Alle Tiere wurden fünf Monate post interventionem ovariohysterektomiert. Somit war es möglich einen eventuellen

knochenprotektiven Effekt der Wirkstoffkombination sowohl am intakten Knochen, als auch an einem durch eine hormonddefizitäre Situation –wie sie bei der postmenopausalen Osteoporose vorliegt– beeinflussten Knochen zu untersuchen.

Zur Bewertung des Knochenstoffwechsels wurden dabei im zwei- bzw. vierwöchigen Abstand die knochenspezifische Alkalische Phosphatase im Serum als Parameter der Knochenformation, und die Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Deoxypyridinolin im Urin als Parameter der Knochenresorption bestimmt. Zur Beurteilung der Knochenstruktur wurden sowohl zum Zeitpunkt der Ovariohysterektomie, als auch vier Monate nach der Operation jeweils eine Knochenbiopsie aus dem Ilium entnommen. Die Proben wurden mit Mikrocomputertomographie vermessen, wie auch biochemisch analysiert.

Durch die Wirkstoffkombination konnte präventiv eine Erhöhung des Knochenmineralgehalts bewirkt werden.

Der nach der Ovariohysterektomie signifikant gesteigerte Knochenstoffwechsel („high turnover“) konnte durch den kombinierten Einsatz der Substanzen wieder normalisiert werden.

Die Mikrostruktur des Knochens wurde durch die Ovariohysterektomie nur wenig beeinflusst, eine signifikante Abnahme der Anzahl der Trabekel, konnte jedoch vermindert werden.

Zusammenfassend konnte erstmals ein knochenprotektiver Effekt der Wirkstoffkombination Genistein, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, sowie Vitamin D und K sowohl am intakten, als auch am ovariohysterektomierten Beagle als Osteoporosemodell gezeigt werden. Diese Wirkstoffkombination könnte somit eine eventuelle Alternative zur Hormonersatztherapie in der Therapie der postmenopausalen Osteoporose darstellen.

7. Summary

Susanne Kern

Influence of phytoestrogens, polyunsaturated fatty acids, vitamin D and K on bone metabolism and microarchitecture of bone:

Investigations on intact and ovariectomized beagles.

Osteoporosis has a major impact on health care costs in the European Union. Hospital costs for the therapy of osteoporotic fractures produce an annual financial burden of more than four billion euros.

But this is not the only reason for the necessity of research on effective therapy and early prophylaxis for osteoporosis. Hormone replacement therapy was the treatment of choice until recently. But there is not only a low compliance of the affected women. More and more risks of this treatment have been proven, e.g. a higher incidence of breast and ovarian cancer.

Thus, research on alternatives in prophylaxis and therapy is of current interest. Phytoestrogens, polyunsaturated fatty acids, as well as vitamins D and K were found to have a positive impact on bone in vitro and partially in vivo.

In the present study effects of a combination of genistein, polyunsaturated fatty acids, and vitamin D and K on bone metabolism and microarchitecture of bone in intact and ovariectomized dogs were investigated. Ovariectomized beagle dogs are a large animal model for postmenopausal osteoporosis, administered by the Food and Drug Administration.

In a feeding study 12 female beagle dogs were randomized into a study group and a control group and treated for nine months. After five months all dogs were ovariectomized. Because of that, a possible protective effect of the substances on intact bone as well as on hormone deficient bone, as it is the case in postmenopausal osteoporosis, could be investigated.

Blood and urine samples were taken every two or four weeks to analyse bone specific alkaline phosphatase in serum for bone formation and collagen-crosslinks pyridinoline and deoxypyridinoline in urine for bone resorption. Bone biopsies were obtained from the ilium at ovariohysterectomy and four months later to study bone structure. Microcomputertomographic and biochemical analyses were done on the biopsies.

The combination of substances was able to cause a prophylactic increase of bone mineral content.

After ovariohysterectomy bone turnover was increased significantly (high turnover). The rise was normalized by the combined use of the active substances.

Microstructure of bone was altered only little by ovariohysterectomy. But a significant decrease in trabecular number could be prevented.

The results of this study show, that a combination of genistein, polyunsaturated fatty acids, and vitamin D and K can have a protective effect on bone in the intact as well as in the ovariohysterectomized beagle. This combination could be a possible alternative to hormone replacement therapy in postmenopausal osteoporosis.

8. Literaturverzeichnis

Adler KA (2002)

Der Einfluss von n-3-Fettsäuren aus Fischöl auf den Knochenstoffwechsel des Hundes.

Vet Med Diss, München

Adlercreutz CH, Goldin BR, Gorbach SL, Hockerstedt KA, Watanabe S, Hamalainen EK, Markkanen MH, Makela TH, Wahala KT and Adlercreutz T (1995)

Soybean phytoestrogen intake and cancer risk

[published erratum appears in J Nutr 1995 Jul;125(7):1960].

J Nutr **125**: 757S-770S

Adlercreutz H and Mazur W (1997)

Phyto-oestrogens and Western diseases.

Ann Med **29**: 95-120

Aerssens J, Boonen S, Lowet G and Dequeker J (1998)

Interspecies differences in bone composition, density, and quality: Potential implications for in vivo bone research.

Endocrinology **139**: 663-670

Albertazzi P, Pansini F, Bonaccorsi G, Zanotti L, Forini E and De AD (1998)

The effect of dietary soy supplementation on hot flushes.

Obstet Gynecol **91**: 6-11

Albertazzi P (2002)

Purified phytoestrogens in postmenopausal bone health: Is there a role for genistein?

Climacteric **5**: 190-196

Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW and Toda T (2000)

Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women.

Am J Clin Nutr **72**: 844-852

Alexandersen P, Haarbo J, Breinholt V and Christiansen C (2001)

Dietary phytoestrogens and estrogen inhibit experimental atherosclerosis.

Climacteric **4**: 151-159

Allen MJ, Hoffmann WE, Richardson DC and Breur GJ (1998)

Serum markers of bone metabolism in dogs.

Am J Vet Res **59**: 250-254

Allen LC, Allen MJ, Breur GJ, Hoffmann WE and Richardson DC (2000a)

A comparison of two techniques for the determination of serum bone-specific alkaline phosphatase activity in dogs.

Res Vet Sci **68**: 231-235

Allen MJ, Allen LC, Hoffmann WE, Richardson DC and Breur GJ (2000b)
Urinary markers of type I collagen degradation in the dog.
Res Vet Sci **69**: 123-127

Anderson JJ, Ambrose WW and Garner SC (1995)
Orally Dosed Genistein from Soy and Prevention of Cancellous Bone Loss in Two
Ovariectomized Rat Models.
J Nutr **125**: S799

Anderson JJ and Garner SC (1998)
Phytoestrogens and bone.
Baillieres Clin Endocrinol Metab **12**: 543-557

Andersson N, Lindberg MK, Ohlsson C, Andersson K and Ryberg B (2001)
Repeated in vivo determinations of bone mineral density during parathyroid hormone
treatment in ovariectomized mice.
J Endocrinol **170**: 529-537

Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz SM, Guo P and Kukreja SC
(1996)
Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of
osteoporosis.
J Nutr **126**: 161-167

Arjmandi BH, Birnbaum R, Goyal NV, Getlinger MJ, Juma S, Alekel L, Hasler CM,
Drum ML, Hollis BW and Kukreja SC (1998)
Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its
isoflavone content.
Am J Clin Nutr **68**: 1364S-1368S

Arjmandi BH, Khalil DA, Smith BJ, Lucas EA, Juma S, Payton ME and Wild RA
(2003)
Soy protein has a greater effect on bone in postmenopausal women not on hormone
replacement therapy, as evidenced by reducing bone resorption and urinary calcium
excretion.
J Clin Endocrinol Metab **88**: 1048-1054

Arts J, Kuiper GG, Janssen JM, Gustafsson JA, Lowik CW, Pols HA and van LJP
(1997)
Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during
differentiation of human osteoblast SV-HFO cells.
Endocrinology **138**: 5067-5070

Asakura H, Myou S, Ontachi Y, Mizutani T, Kato M, Saito M, Morishita E, Yamazaki
M and Nakao S (2001)
Vitamin K administration to elderly patients with osteoporosis induces no hemostatic
activation, even in those with suspected vitamin K deficiency.
Osteoporos Int **12**: 996-1000

Ballanti P, Minisola S, Pacitti MT, Scarnecchia L, Rosso R, Mazzuoli GF and Bonucci E (1997)

Tartrate-resistant acid phosphate activity as osteoclastic marker: sensitivity of cytochemical assessment and serum assay in comparison with standardized osteoclast histomorphometry.

Osteoporos Int **7**: 39-43

Barbier A, Martel C, de Vernejoul MC, Tirode F, Nys M, Mocaer G, Morieux C, Murakami H and Lacheretz F (1999)

The visualization and evaluation of bone architecture in the rat using three-dimensional X-ray microcomputed tomography.

J Bone Miner Metab **17**: 37-44

Barnes S (1995)

Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer.

J Nutr **125**: 777S-783S

Bassey EJ, Littlewood JJ, Rothwell MC and Pye DW (2000)

Lack of effect of supplementation with essential fatty acids on bone mineral density in healthy pre- and postmenopausal women: Two randomized controlled trials of EfacalR v. calcium alone.

Br J Nutr **83**: 629-635

Baumgrass R, Daenzer M and Felsenberg D (1999)

Improved in vitro stability of serum osteocalcin by using a new commercially available antiproteolytic compound.

Clin Chim Acta **281**: 47-55

Bellino FL (2000)

Nonprimate animal models of menopause: Workshop report.

Menopause **7**: 14-24

Benitez CL, Schneider DL, Barrett C-E and Sartoris DJ (2000)

Hand ultrasound for osteoporosis screening in postmenopausal women.

Osteoporos Int **11**: 203-210

Bennetts HW, Underwood EJ and Shier FL (1946)

A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia.

Aust Vet J **22**: 2-12

Bilezikian JP, Potts Jr JT, El H-F-G, Kleerekoper M, Neer R, Peacock M, Rastad J, Silverberg SJ, Udelsman R and Wells SA (2002)

Summary statement from a workshop on asymptomatic primary hyperparathyroidism: A perspective for the 21st century.

J Clin Endocrinol Metab **87**: 5353-5361

Black D, Duncan A and Robins SP (1988)

Quantitative analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in urine using ion-paired reversed-phase high-performance liquid chromatography.

Anal Biochem **169**: 197-203

- Blair HC, Jordan SE, Peterson TG and Barnes S (1996)
Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats.
J Cell Biochem **61**: 629-637
- Böhning RH, Suter PF, Hohn RB and Marshall J (1970)
Clinical and radiologic survey of canine panosteitis.
J Am Vet Med Assoc **156**: 870-883
- Bollerslev J and Andersen Jr PE (1988)
Radiological, biochemical and hereditary evidence of two types of autosomal dominant osteopetrosis.
Bone **9**: 7-13
- Bollerslev J and Mosekilde L (1993)
Autosomal dominant osteopetrosis.
Clin Orthop Relat Res -: 45-51
- Bolotin HH and Sievänen H (2001)
Inaccuracies inherent in dual-energy x-ray absorptiometry in vivo bone mineral density can seriously mislead diagnostic/prognostic interpretations of patient-specific bone fragility.
J Bone Miner Res **16**: 799-805
- Booth SL, Tucker KL, Chen H, Hannan MT, Gagnon DR, Cupples LA, Wilson PWF, Ordovas J, Schaefer EJ, Dawson H-B and Kiel DP (2000)
Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women.
Am J Clin Nutr **71**: 1201-1208
- Booth SL, Broe KE, Gagnon DR, Tucker KL, Hannan MT, McLean RR, Dawson H-B, Wilson PWF, Cupples LA and Kiel DP (2003)
Vitamin K intake and bone mineral density in women and men.
Am J Clin Nutr **77**: 512-516
- Bouillon R, Van C-S and Carmeliet G (2003)
Intestinal calcium absorption: Molecular vitamin D mediated mechanisms.
J Cell Biochem **88**: 332-339
- Boyce RW, Franks AF, Jankowsky ML, Orcutt CM, Piacquadio AM, White JM and Bevan JA (1990)
Sequential histomorphometric changes in cancellous bone from ovariectomized dogs.
J Bone Miner Res **5**: 947-953
- Brenner RE, Vetter U, Bollen AM, Morike M and Eyre DR (1994)
Bone resorption assessed by immunoassay of urinary cross-linked collagen peptides in patients with osteogenesis imperfecta.
J Bone Miner Res **9**: 993-997

- Brown DM and Dent PB (1971)
Pathogenesis of Osteopetrosis: A Comparison of Human and Animal Spectra.
Pediat Res **5**: 181-191
- Buck AC, Davies RL and Harrison T (1991)
The protective role of eicosapentaenoic acid [EPA] in the pathogenesis of nephrolithiasis.
J Urol **146**: 188-194
- Calve J (1910)
Sur une forme particuliere de pseudocoxalgie grefee sur des deformations caracteristiques de l'extremite superieure de femur.
Rev Chir **42**: 54-84
- Calvo MS, Eyre DR and Gundberg CM (1996)
Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover.
Endocr Rev **17**: 333-368
- Campbell BG, Wootton JA, Krook L, DeMarco J and Minor RR (1997)
Clinical signs and diagnosis of osteogenesis imperfecta in three dogs.
J Am Vet Med Assoc **211**: 183-187
- Campbell BG, Wootton JAM, MacLeod JN and Minor RR (2000)
Sequence of normal canine COL1A1 cDNA and identification of a heterozygous alpha-1(I) collagen Gly208Ala mutation in a severe case of canine osteogenesis imperfecta.
Arch Biochem Biophys **384**: 37-46
- Campbell BG, Wootton JAM, MacLeod JN and Minor RR (2001)
Canine COL1A2 mutation resulting in C-terminal truncation of pro-alpha-2(I) and severe osteogenesis imperfecta.
J Bone Miner Res **16**: 1147-1153
- Cantatore FP and Pipitone V (1999)
Markers of bone turnover: consideration on their clinical application in osteoporosis.
Panminerva Med **41**: 247-251
- Cassidy A, Bingham S and Setchell KD (1994)
Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women.
Am J Clin Nutr **60**: 333-340
- Catterall A (1971)
The natural history of Perthes' disease.
J Bone Joint Surg Br **53**: 37-53
- Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F, Brun J, Crouzet B, Arnaud S, Delmas PD and Meunier PJ (1992)
Vitamin D-3 and calcium to prevent hip fractures in elderly women.
New Engl J Med **327**: 1637-1642

Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, Stefanick ML, Gass M, Lane D, Rodabough RJ, Gilligan MA, Cyr MG, Thomson CA, Khandekar J, Petrovitch H and McTiernan A (2003)

Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial.

JAMA **289**: 3243-3253

Claassen N, Potgieter HC, Seppa M, Vermaak WJH, Coetzer H, Van P-DH and Kruger MC (1995)

Supplemented gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid influence bone status in young male rats: Effects on free urinary collagen crosslinks, total urinary hydroxyproline, and bone calcium content.

Bone **16**: 385S-392S

Cole WG (2002)

Advances in osteogenesis imperfecta.

Clin Orthop Relat Res -: 6-16

Colwell A, Russell RGG and Eastell R (1993)

Factors affecting the assay of urinary 3-hydroxy pyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption.

Eur J Clin Invest **23**: 341-349

Compston JE, Papapoulos SE and Blanchard F (1998)

Report on osteoporosis in the European Community: current status and recommendations for the future. Working Party from European Union Member States.

Osteoporos Int **8**: 531-534

Consensus development conference (1993)

Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis.

Am J Med **94**: 646-650

Cook SD, Skinner HB and Haddad RJ (1983)

A quantitative histologic study of osteoporosis produced by nutritional secondary hyperparathyroidism in dogs.

Clin Orthop -: 105-120

Coxam V (2003)

Prevention of osteopenia by phyto-oestrogens: animal studies.

Br J Nutr **89**: S75-S85

Dämmrich K (1981)

Zur Pathogenese der Skelettkrankheiten bei Hunden und Katzen.

Wien Tierärztl Mschr **68**: 109-115

- Dambacher MA, Neff M, Kissling R and Qin L (1998)
Highly precise peripheral quantitative computed tomography for the evaluation of bone density, loss of bone density and structures: Consequences for prophylaxis and treatment.
Drugs Aging **12**: 15-24
- Dannucci GA, Martin RB and Patterson B-P (1987)
Ovariectomy and trabecular bone remodeling in the dog.
Calcif Tissue Int **40**: 194-199
- Davis SR, Dalais FS, Simpson ER and Murkies AL (1999)
Phytoestrogens in health and disease.
Recent Prog Horm Res **54**: 185-210
- Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA and Dallal GE (1997)
Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older.
New Engl J Med **337**: 670-676
- De la Piedra C, Torres R, Rapado A, Diaz C-M and Castro N (1989)
Serum tartrate-resistant acid phosphatase and bone mineral content in postmenopausal osteoporosis.
Calcif Tissue Int **45**: 58-60
- De Vernejoul MC and Benichou O (2001)
Human osteopetrosis and other sclerosing disorders: Recent genetic developments.
Calcif Tissue Int **69**: 1-6
- Delmas PD (1993)
Biochemical markers of bone turnover for the clinical investigation of osteoporosis.
Osteoporos Int **3**: 81-86
- Di Meglio LA and Econs MJ (2001)
Hypophosphatemic rickets.
Rev Endocr Metab Disord **2**: 165-173
- Dotti R, Muller DM and Benini A (2002)
Klinik, Aetiologie, Pathogenese, Diagnostik und Therapie der aseptischen Knochennekrosen--eine aktuelle Literaturanalyse. [Clinical aspects, etiology, pathogenesis, diagnosis and therapy of aseptic bone necrosis--a current analysis of the literature].
Schweiz Rundsch Med Prax **91**: 163-176
- Drake WM, Kendler DL and Brown JP (2001)
Consensus statement on the modern therapy of Paget's disease of bone from a Western Osteoporosis Alliance symposium.
Clin Ther **23**: 620-626

Draper HH (1994)

Bone loss in animals.

in: Advances in Nutritional Research (ed.: Draper, HH), Volume **9**: 53-71

Plenum Press, New York

Dresner-Pollak R, Parker RA, Poku M, Thompson J, Seibel MJ and Greenspan SL (1996)

Biochemical markers of bone turnover reflect femoral bone loss in elderly women.

Calcif Tissue Int **59**: 328-333

Drezner MK and Nesbitt T (1990)

Role of calcitriol in prevention of osteoporosis: Part I.

Metab Clin Exp **39**: 18-23

Dubois EFL, Van d-B-JPW, Smals AGH, Van d-M-CWD, Zwinderman AH and Schweitzer DH (2001)

Comparison of quantitative ultrasound parameters with dual energy X-ray absorptiometry in pre- and postmenopausal women.

Neth J Med **58**: 62-70

Ebeling PR, Atley LM, Guthrie JR, Burger HG, Dennerstein L, Hopper JL and Wark JD (1996)

Bone turnover markers and bone density across the menopausal transition.

J Clin Endocrinol Metab **81**: 3366-3371

Eckstein F, Lochmuller EM, Koller B, Wehr U, Weusten A, Rambeck W, Hoeflich A and Wolf E (2002)

Body composition, bone mass and microstructural analysis in GH-transgenic mice reveals that skeletal changes are specific to bone compartment and gender.

Growth Horm IGF Res **12**: 116-125

Edelmann-Stergiou K (2000)

Biochemische Knochenstoffwechsellmarker prä- und postmenopausaler Frauen mit distalen Radiusfrakturen.

Vet Med Diss, München

Elder G (2002)

Pathophysiology and recent advances in the management of renal osteodystrophy.

J Bone Miner Res **17**: 2094-2105

Erben RG, Weiser H, Sinowatz F, Rambeck WA and Zucker H (1992)

Vitamin D metabolites prevent vertebral osteopenia in ovariectomized rats.

Calcif Tissue Int **50**: 228-236

Eriksen EF (2002)

Primary hyperparathyroidism: Lessons from bone histomorphometry.

J Bone Miner Res **17**: N95-N97

- Eyre DR, Dickson IR and Van N-K (1988)
Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues.
Biochem J **252**: 495-500
- Fanti P, Monier F-MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D and Malluche HH (1998)
The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats.
Osteoporos Int **8**: 274-281
- Fardellone P, Brazier M, Kamel S, Gueris J, Graulet AM, Lienard J and Sebert JL (1998)
Biochemical effects of calcium supplementation in postmenopausal women: Influence of dietary calcium intake.
Am J Clin Nutr **67**: 1273-1278
- Faugere MC, Friedler RM, Fanti P and Malluche HH (1990)
Bone changes occurring early after cessation of ovarian function in beagle dogs: A histomorphometric study employing sequential biopsies.
J Bone Miner Res **5**: 263-272
- Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G and Kleerekoper M (1989)
The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography.
J Bone Miner Res **4**: 3-11
- Finnern HW and Sykes DP (2003)
The hospital cost of vertebral fractures in the EU: estimates using national datasets.
Osteoporos Int **14**: 429-436
- Friedrichs WE, Reddy SV, Bruder JM, Cundy T, Cornish J, Singer FR and Roodman GD (2002)
Sequence analysis of measles virus nucleocapsid transcripts in patients with Paget's disease.
J Bone Miner Res **17**: 145-151
- Frischknecht Y (2003)
Wirkung von omega-3-fettsäurehaltigen Mikroalgen auf den Knochenstoffwechsel des Hundes.
Vet Med Diss, München
- Fujita T (1996)
Osteoporosis in Japan: Factors Contributing to the Low Incidence of Hip Fracture.
Adv Nutr Res **9**: 89-99
- Gärtner R (2001)
Osteodensitometry in osteoporosis: Inadequate for diagnosis; Osteodensitometrie bei Osteoporose-Zur Diagnose nicht ausreichend.
Dtsch Med Wochenschr **126**: 799-800

- Gallagher JC (1990)
Metabolic effects of synthetic calcitriol (RocaltrolR) in the treatment of postmenopausal osteoporosis.
Metab Clin Exp **39**: 27-29
- Gao YH and Yamaguchi M (1999)
Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclasts: apoptosis is induced through Ca²⁺ signaling.
Biol Pharm Bull **22**: 805-809
- Genant HK, Gordon C, Jiang Y, Link TM, Hans D, Majumdar S and Lang TF (2000)
Advanced imaging of the macrostructure and microstructure of bone.
Horm Res **54**: 24-30
- Glorieux FH, Ward LM, Rauch F, Lalic L, Roughley PJ and Travers R (2002)
Osteogenesis imperfecta type VI: A form of brittle bone disease with a mineralization defect.
J Bone Miner Res **17**: 30-38
- Goldberg B and Sherr CJ (1973)
Secretion and extracellular processing of procollagen by cultured human fibroblasts.
Proc Natl Acad Sci USA **70**: 361-365
- Goldstein DJ, Rogers CE and Harris H (1980)
Expression of alkaline phosphatase loci in mammalian tissues.
Proc Natl Acad Sci USA **77**: 2857-2860
- Goulet RW, Goldstein SA, Ciarelli MJ, Kuhn JL, Brown MB and Feldkamp LA (1994)
The relationship between the structural and orthogonal compressive properties of trabecular bone.
J Biomech **27**: 375-389
- Halleen JM, Ylipahkala H, Alatalo SL, Janckila AJ, Heikkinen JE, Suominen H, Cheng S and Vaananen HK (2002)
Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b, but not 5a, correlates with other markers of bone turnover and bone mineral density.
Calcif Tissue Int **71**: 20-25
- Hans D, Dargent M-P, Schott AM, Sebert JL, Cormier C, Kotzki PO, Delmas PD, Pouilles JM, Breart G, Meunier PJ, Baudoin C, Chapuy MC, Favier F, Marcelli C, Menkes CJ, Cormier C, Hausherr E, Grandjean H and Ribot C (1996)
Ultrasoundographic heel measurements to predict hip fracture in elderly women: The EPIDOS prospective study.
Lancet **348**: 511-514
- Harrison E, Adjei A, Ameho C, Yamamoto S and Kono S (1998)
The effect of soybean protein on bone loss in a rat model of postmenopausal osteoporosis.
J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) **44**: 257-268

Hart JP, Catterall A, Dodds RA, Klenerman L, Shearer MJ, Bitensky L and Chayen J (1984)

Circulating vitamin K1 levels in fractured neck of femur.
Lancet **2**: 283

Hartke J (1998)

Non-primate models of osteoporosis.
Lab Anim Sci **48**: 623-629

Hauschka PV and Reid ML (1978)

Vitamin D dependence of a calcium-binding protein containing gamma-carboxyglutamic acid in chicken bone.
J Biol Chem **253**: 9063-9068

Hauschka PV, Lian JB, Cole DE and Gundberg CM (1989)

Osteocalcin and matrix Gla protein: Vitamin K-dependent proteins in bone.
Physiol Rev **69**: 990-1047

Hazewinkel HAW and Tryfonidou MA (2002)

Vitamin D3 metabolism in dogs.
Mol Cell Endocrinol **197**: 23-33

Herring JA, Neustadt JB, Williams JJ, Early JS and Browne RH (1992)

The lateral pillar classification of Legg-Calve-Perthes disease.
J Pediatr Orthop **12**: 143-150

Hild S (2001)

Biochemische Marker der Knochenformation nach Fraktur des proximalen Femur bei Patienten mit Altersosteoporose.
Vet Med Diss, München

Hildebrand T and Ruegsegger P (1997a)

A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images.
J Microsc **185**: 67-75

Hildebrand T and Ruegsegger P (1997b)

Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index.
Comput Methods Biomech Biomed Engin **1**: 15-23

Hildebrand T, Laib A, Muller R, Dequeker J and Ruegsegger P (1999)

Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus.
J Bone Miner Res **14**: 1167-1174

Ho SC, Woo J, Lam S, Chen Y, Sham A and Lau J (2003)

Soy protein consumption and bone mass in early postmenopausal Chinese women.
(Online Version auf www.springerlink.com, eingesehen am 01.09.2003)

Hodges SJ, Akesson K, Vergnaud P, Obrant K and Delmas PD (1993)
Circulating levels of vitamins K-1 and K-2 decreased in elderly women with hip fracture.
J Bone Miner Res **8**: 1241-1245

Hörmann P (2000)
Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels bei ovariektomierten Ratten unter Phytoöstrogentherapie.
Vet Med Diss, München

Hofmann S, Kramer J and Plenk Jr H (2002)
Osteonecrosis of the hip joint in adults; Die Osteonekrose des Hüftgelenks im Erwachsenenalter.
Radiologe **42**: 440-450

Holick MF (1996)
Vitamin D and bone health.
J Nutr **126**: 1159S-1164S

Horiuchi T, Onouchi T, Takahashi M, Ito H and Orimo H (2000)
Effect of soy protein on bone metabolism in postmenopausal Japanese women.
Osteoporos Int **11**: 721-724

How KL, Hazewinkel HAW and Mol JA (1994)
Dietary vitamin D dependence of cat and dog due to inadequate cutaneous synthesis of vitamin D.
Gen Comp Endocrinol **96**: 12-18

Hresko MT, McDougall PA, Gorlin JB, Vamvakas EC, Kasser JR and Neufeld EJ (2002)
Prospective reevaluation of the association between thrombotic diathesis and Legg-Perthes disease.
J Bone Jt Surg Am **84**: 1613-1618

Hu JH, Ding M, Soballe K, Bechtold JE, Danielsen CC, Day JS and Hvid I (2002)
Effects of short-term alendronate treatment on the three-dimensional microstructural, physical, and mechanical properties of dog trabecular bone.
Bone **31**: 591-597

Hubbard AM and Dormans JP (1995)
Evaluation of developmental dysplasia, Perthes disease, and neuromuscular dysplasia of the hip in children before and after surgery: An imaging update.
Am J Roentgenol **164**: 1067-1073

Ingram D, Sanders K, Kolybaba M and Lopez D (1997)
Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer.
Lancet **350**: 990-994

Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, Onoe Y, Sato T, Uchiyama Y, Ito M, Wang X, Suda T and Ikegami S (1999)

Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B- lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency.

Endocrinology **140**: 1893-1900

Ismail AA, Pye SR, Cockerill WC, Lunt M, Silman AJ, Reeve J, Banzer D, Benevolenskaya LI, Bhalla A, Bruges AJ, Cannata JB, Cooper C, Delmas PD, Dequeker J, Dilsen G, Falch JA, Felsch B, Felsenberg D, Finn JD, Gennari C, Hozowski K, Jajic I, Janott J, Johnell O, Kanis JA, Kragl G, Lopez VA, Lorenc R, Lyritis G, Marchand F, Masaryk P, Matthis C, Miazgowski T, Naves DM, Pols HA, Poor G, Rapado A, Raspe HH, Reid DM, Reisinger W, Scheidt NC, Stepan J, Todd C, Weber K, Woolf AD and O'Neill TW (2002)

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

Osteoporos Int **13**: 565-571

Iwamoto J, Takeda T and Ichimura S (2000)

Effect of combined administration of vitamin D-3 and vitamin K-2 on bone mineral density of the lumbar spine in postmenopausal women with osteoporosis.

J Orthop Sci **5**: 546-551

Jaffe M (1886)

Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und ueber eine neue Reaktion des Kreatinins.

Hoppe Seylers Z Physiol Chem **10**: 391-400

Jesudason D, Need AG, Horowitz M, O'Loughlin PD, Morris HA and Nordin BEC (2002)

Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and bone resorption markers in vitamin D insufficiency.

Bone **31**: 626-630

Jie KSG, Bots ML, Vermeer C, Witteman JCM and Grobbee DE (1996)

Vitamin K status and bone mass in women with and without aortic atherosclerosis: A population-based study.

Calcif Tissue Int **59**: 352-356

Kalu DN (1991)

The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss.

Bone Miner **15**: 175-191

Kann PH (2001)

Osteodensitometry and ultrasound measurements of bone. Methods, indications, and efficacy; Osteodensitometrie und Ultraschalluntersuchungen des Knochens: Methoden, Indikationen und Aussagekraft.

Orthopäde **30**: 437-443

Kato S, Yoshizawa T, Kitanaka S, Murayama A and Takeyama KI (2002)

Molecular genetics of vitamin D-dependent hereditary rickets.

Horm Res **57**: 73-78

- Khan SA, Brennan P, Newman J, Gray RES, McCloskey EV and Kanis JA (1996)
Paget's disease of bone and unvaccinated dogs.
Bone **19**: 47-50
- Kienzle E, Opitz B, Earle KE, Smith PM, Maskell LE and Iben C (1998)
The development of an improved method of predicting the energy content in prepared dog and cat food.
J Anim Physiol Anim Nutr **79**: 69-79
- Kitanaka S, Takeyama K, Murayama A and Kato S (2001)
The molecular basis of vitamin D-dependent rickets type I.
Endocr J **48**: 427-432
- Kitoh H, Kitakoji T, Katoh M and Takamine Y (2003)
Delayed ossification of the proximal capital femoral epiphysis in Legg-Calve-Perthes' disease.
J Bone Jt Surg Br **85**: 121-124
- Koshihara Y and Hoshi K (1997)
Vitamin K2 enhances osteocalcin accumulation in the extracellular matrix of human osteoblasts in vitro.
J Bone Miner Res **12**: 431-438
- Kraenzlin ME (1995)
Sinnvolle Osteoporose-Diagnostik in der Praxis.
in: *Osteoporose: Moderne Diagnostik - Therapeutische Konsequenzen für Klinik und Praxis* (ed.: Seibel, MJ and Kraenzlin, ME), 24-29, Karger, Freiburg
- Krammer SJM (2001)
Das Osteoporosemodell Ratte: Einfluss von Phytoöstrogenen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren sowie Vitamin D und K.
Vet Med Diss, München
- Krauspe R and Raab P (1997)
Morbus Perthes; [Morbus Perthes].
Orthopäde **26**: 289-302
- Kronenberg F and Fugh-Bergman A (2002)
Complementary and alternative medicine for menopausal symptoms: a review of randomized, controlled trials.
Ann Intern Med **137**: 805-813
- Kruger MC and Horrobin DF (1997)
Calcium metabolism, osteoporosis and essential fatty acids: A review.
Prog Lipid Res **36**: 131-151
- Kruger MC, Coetzer H, De W-R, Gericke G and Van P-DH (1998)
Calcium, gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid supplementation in senile osteoporosis.
Aging Clin Exp Res **10**: 385-394

- Kuhn JL, Goldstein SA, Ciarelli MJ and Matthews LS (1989)
The limitations of canine trabecular bone as a model for human: A biomechanical study.
J Biomech **22**: 95-107
- Kuiper JW, Van K-C, Grashuis JL, Ederveen AGH and Schutte HE (1996)
Accuracy and the influence of marrow fat on quantitative CT and dual-energy X-ray absorptiometry measurements of the femoral neck in vitro.
Osteoporos Int **6**: 25-30
- Kung AWC, Luk KDK, Chu LW and Chiu PKY (1998)
Age-related osteoporosis in Chinese: An evaluation of the response of intestinal calcium absorption and calcitropic hormones to dietary calcium deprivation.
Am J Clin Nutr **68**: 1291-1297
- Kushida K, Takahashi M, Kawana K and Inoue T (1995)
Comparison of markers for bone formation and resorption in premenopausal and postmenopausal subjects, and osteoporosis patients.
J Clin Endocrinol Metab **80**: 2447-2450
- La Flamme DP (1997)
Development and validation of a body conditioning score system for dogs.
Canine Practice **22**: 10-15
- La Fond E, Breur GJ and Austin CC (2002)
Breed susceptibility for developmental orthopedic diseases in dogs.
J Am Anim Hosp Assoc **38**: 467-477
- Ladlow JF, Hoffmann WE, Breur GJ, Richardson DC and Allen MJ (2002)
Biological variability in serum and urinary indices of bone formation and resorption in dogs.
Calcif Tissue Int **70**: 186-193
- Laib A and Ruegsegger P (1999)
Local x-ray tomography for in vivo bone structure examinations.
Med Phys **26**: 447-452
- Lavernia CJ, Sierra RJ and Grieco FR (1999)
Osteonecrosis of the femoral head.
J Am Acad Orthop Surg **7**: 250-261
- Lee R and Fry PD (1969)
Some observations on the occurrence of Legg-Calve-Perthes' disease (coxaplasia) in the dog, and an evaluation of excision arthroplasty as a method of treatment.
J Small Anim Pract **10**: 309-317
- Lees GE and Sautter JH (1979)
Anemia and osteopetrosis in a dog.
J Am Vet Med Assoc **175**: 820-824

Legg AT (1910)

An obscure affection of the hip joint.

Boston Med Chir J **162**: 202

Li Y and Watkins BA (1998)

Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce ex vivo prostaglandin E-2 biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids.

Lipids **33**: 417-425

Liesegang A, Reutter R, Sassi ML, Risteli J, Kraenzlin M, Riond JL and Wanner M (1999)

Diurnal variation in concentrations of various markers of bone metabolism in dogs.

Am J Vet Res **60**: 949-953

Liesegang A (2000)

Anwendung von Knochenmarkern in der Veterinärmedizin. [Use of bone markers in veterinary medicine].

Schweiz Arch Tierheilkd **142**: 613-623

Lips P (1994)

Suboptimal vitamin D status: a risk factor for osteoporosis?

Adv Nutr Res **9**: 151-166

Liu SL and Ho TC (1991)

The role of venous hypertension in the pathogenesis of Legg-Perthes disease: A clinical and experimental study.

J Bone Jt Surg Am **73**: 194-200

Llach F and Forero FV (2001)

Secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure: Pathogenic and clinical aspects.

Am J Kidney Dis **38**: S20-S33

Looker AC, Bauer DC, Chesnut Iii CH, Gundberg CM, Hochberg MC, Klee G, Kleerekoper M, Watts NB and Bell NH (2000)

Clinical use of biochemical markers of bone remodeling: Current status and future directions.

Osteoporos Int **11**: 467-480

Lukert BP, Higgins J and Stoskopf M (1992)

Menopausal bone loss is partially regulated by dietary intake of vitamin D.

Calcif Tissue Int **51**: 173-179

Majkic-Singh N, Ilic M, Ignjatovic S and Aleksandra-Postic-Grujin (2002)

Assessment of four biochemical markers of bone metabolism in postmenopausal osteoporosis.

Clin Lab **48**: 407-413

Malluche HH, Matthews C, Faugere MC, Fanti P, Endres DB and Friedler RM (1986a)

1,25-Dihydroxyvitamin D maintains bone cell activity, and parathyroid hormone modulates bone cell number in dogs.

Endocrinology **119**: 1298-1304

Malluche HH, Faugere MC, Rush M and Friedler R (1986b)

Osteoblastic insufficiency is responsible for maintenance of osteopenia after loss of ovarian function in experimental beagle dogs.

Endocrinology **119**: 2649-2654

Malluche HH, Faugere MC, Friedler RM and Fanti P (1988)

1,25-Dihydroxyvitamin D-3 corrects bone loss but suppresses bone remodeling in ovariectomized beagle dogs.

Endocrinology **122**: 1998-2006

Malluche HH and Faugere MC (1990)

Role of calcitriol in the management of osteoporosis.

Metab Clin Exp **39**: 24-26

Manson JE and Hsia J (2003)

Estrogen and Progestin and the risk of Coronary Heart Disease.

New Engl J Med **349**: 523-534

Marks SC, Jr. (1982)

Morphological evidence of reduced bone resorption in osteopetrotic (op) mice.

Am J Anat **163**: 157-167

Martin RK, Albright JP, Jee WS, Taylor GN and Clarke WR (1981)

Bone loss in the beagle tibia: influence of age, weight, and sex.

Calcif Tissue Int **33**: 233-238

Martin RB, Butcher RL, Sherwood LL, Buckendahl P, Boyd RD, Farris D, Sharkey N and Dannucci G (1987)

Effects of ovariectomy in beagle dogs.

Bone **8**: 23-31

Martin KJ and Gonzalez EA (2001)

Strategies to minimize bone disease in renal failure.

Am J Kidney Dis **38**: 1430-1436

Massie A, Reid DM and Porter RW (1993)

Screening for osteoporosis: Comparison between dual energy X-ray absorptiometry and broadband ultrasound attenuation in 1000 perimenopausal women.

Osteoporos Int **3**: 107-110

Matsunaga S, Ito H and Sakou T (1999)

The effect of vitamin K and D supplementation on ovariectomy-induced bone loss.

Calcif Tissue Int **65**: 285-289

Mawatari T, Miura H, Higaki H, Moro O-T, Kurata K, Murakami T and Iwamoto Y (2000)

Effect of vitamin K-2 on three-dimensional trabecular microarchitecture in ovariectomized rats.

J Bone Miner Res **15**: 1810-1817

Mc Laren AM, Hordon LD, Bird HA and Robins SP (1992)

Urinary excretion of pyridinium crosslinks of collagen in patients with osteoporosis and the effects of bone fracture.

Ann Rheum Dis **51**: 648-651

Mee AP, May C, Bennett D and Sharpe PT (1995a)

Generation of multinucleated osteoclast-like cells from canine bone marrow: Effects of canine distemper virus.

Bone **17**: 47-55

Mee AP, Hoyland JA, Baird P, Bennett D and Sharpe PT (1995b)

Canine bone marrow cell cultures infected with canine distemper virus: an in vitro model of Paget's disease.

Bone **17**: 461S-466S

Mehl B, Delling G, Schlindwein I, Heilmann P, Voia C, Ziegler R, Nawroth P and Kasperk C (2002)

Korrelieren biochemische Knochenstoffwechsellmarker mit einer histologisch gesicherten High- bzw. Low-Turnover-Osteoporose? [Do markers of bone metabolism reflect the presence of a high- or low-turnover state of bone metabolism?].

Med Klin **97**: 588-594

Mei J, Yeung SS and Kung AW (2001)

High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women.

J Clin Endocrinol Metab **86**: 5217-5221

Mellanby T (1918)

The part played by an "accessory factor" in the production of experimental rickets.

J Physiol **52**: 1-14

Mendez RO, Gomez MA, Lopez AM, Gonzalez H and Wyatt CJ (2002)

Effects of calcium and phosphorus intake and excretion on bone density in postmenopausal women in Hermosillo, Mexico.

Ann Nutr Metab **46**: 249-253

Meyer H and Zentek J (1998)

Ernährung des Hundes

3. Auflage, Parey Buchverlag, Berlin.

Mickelson MR, McCurnin DM, Awbrey BJ, Maynard JA and Martin RK (1981)

Legg-Calve-Perthes disease in dogs: a comparison to human Legg-Calve-Perthes disease.

Clin Orthop -: 287-300

Migliaccio S and Anderson JJ (2003)
Isoflavones and skeletal health: are these molecules ready for clinical application?
Osteoporos Int **14**: 361-368

Miller SC, Bowman BM and Jee WSS (1995)
Available animal models of osteopenia - Small and large.
Bone **17**: 117S-123S

Million women study colloberators (2003)
Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study.
Lancet **362**: 419-427

Miyake N, Hoshi K, Sano Y, Kikuchi K, Tadano K and Koshihara Y (2001)
1,25-Dihydroxyvitamin D3 promotes vitamin K2 metabolism in human osteoblasts.
Osteoporos Int **12**: 680-687

Monier-Faugere MC, Friedler RM, Bauss F and Malluche HH (1993)
A new bisphosphonate, BM 21.0955, prevents bone loss associated with cessation of ovarian function in experimental dogs.
J Bone Miner Res **8**: 1345-1355

Monier-Faugere MC, Geng Z, Qi Q, Arnala I and Malluche HH (1996)
Calcitonin prevents bone loss but decreases osteoblastic activity in ovariectomized beagle dogs.
J Bone Miner Res **11**: 446-455

Monier-Faugere MC, Geng Z, Paschalis EP, Qi Q, Arnala I, Bauss F, Boskey AL and Malluche HH (1999)
Intermittent and continuous administration of the bisphosphonate ibandronate in ovariectomized beagle dogs: effects on bone morphometry and mineral properties.
J Bone Miner Res **14**: 1768-1778

Mont MA and Hungerford DS (1995)
Non-traumatic avascular necrosis of the femoral head.
J Bone Jt Surg Am **77**: 459-474

Morales-Piga AA, Bachiller-Corral FJ, Abaira V, Beltran J and Rapado A (2002)
Is clinical expressiveness of Paget's disease of bone decreasing?
Bone **30**: 399-403

Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M and Masamune Y (2001)
Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta.
Biol Pharm Bull **24**: 351-356

Moss DW (1982)
Alkaline phosphatase isoenzymes.
Clin Chem **28**: 2007-2016

- Mosselman S, Polman J and Dijkema R (1996)
ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor.
FEBS Lett **392**: 49-53
- Mughal Z (2002)
Rickets in childhood.
Semin Muscoloskelet Radiol **6**: 183-190
- Müller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T and Ruegsegger P (1999)
Morphometric analysis of human bone biopsies: A quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography.
Bone **23**: 59-66
- Nagai S and Shindo H (1997)
Mechanical strength of bone in canine osteoporosis model: Relationship between bone mineral content and bone fragility.
J Orthop Sci **2**: 428-433
- Nagata C, Shimizu H, Takami R, Hayashi M, Takeda N and Yasuda K (2002)
Soy product intake and serum isoflavonoid and estradiol concentrations in relation to bone mineral density in postmenopausal Japanese women.
Osteoporos Int **13**: 200-204
- Nakamura T, Nagai Y, Yamato H, Suzuki K and Orimo H (1992)
Regulation of bone turnover and prevention of bone atrophy in ovariectomized beagle dogs by the administration of 24R,25(OH)-2D-3.
Calcif Tissue Int **50**: 221-227
- New SA (1999)
Bone health: The role of micronutrients.
Br Med Bull **55**: 619-633
- Newman E, Turner AS and Wark JD (1995)
The potential of sheep for the study of osteopenia: Current status and comparison with other animal models.
Bone **16**: 277S-284S
- Nishizawa Y, Nakamura T, Ohata H, Kushida K, Gorai I, Shiraki M, Fukunaga M, Hosoi T, Miki T, Nakatsuka K and Miura M (2001)
Guidelines on the use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis (2001).
J Bone Miner Metab **19**: 338-344
- NRC (2003)
Nutrient Requirements of Dogs and Cats.
National Academy of Sciences, National Research Council, 4 Auflage,
Washington D.C.

Ohishi T, Takahashi M, Kushida K, Hoshino H, Tsuchikawa T, Naitoh K and Inoue T (1998)

Changes of biochemical markers during fracture healing.

Arch Orthop Trauma Surg **118**: 126-130

Ohta H, Makita K, Komukai S and Nozawa S (2002)

Bone resorption versus estrogen loss following oophorectomy and menopause.

Maturitas **43**: 27-33

Ooi CG, Walsh CA, Gallagher JA and Fraser WD (2000)

Absence of measles virus and canine distemper virus transcripts in long-term bone marrow cultures from patients with Paget's disease of bone.

Bone **27**: 417-421

Oreffo RO and Triffitt JT (1999)

Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics.

Bone **25**: 5S-9S

Orimo H, Shiraki M, Tomita A, Morii H, Fujita T and Ohata M (1998)

Effects of menatetrenone on the bone and calcium metabolism in osteoporosis: A double-blind placebo-controlled study.

J Bone Miner Metab **16**: 106-112

Papadimitropoulos E, Wells G, Shea B, Gillespie W, Weaver B, Zytaruk N, Cranney A, Adachi J, Tugwell P, Josse R, Greenwood C and Guyatt G (2002)

VIII: Meta-analysis of the efficacy of vitamin D treatment in preventing osteoporosis in postmenopausal women.

Endocr Rev **23**: 560-569

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM and Recker RR (1987)

Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee.

J Bone Miner Res **2**: 595-610

Pedrazzoni M, Alfano FS, Girasole G, Giuliani N, Fantuzzi M, Gatti C, Campanini C and Passeri M (1996)

Clinical observations with a new specific assay for bone alkaline phosphatase: a cross-sectional study in osteoporotic and pagetic subjects and a longitudinal evaluation of the response to ovariectomy, estrogens, and bisphosphonates.

Calcif Tissue Int **59**: 334-338

Perthes G (1910)

Ueber Arthritis deformans juvenilis.

Dtsch Zschr Chir **107**: 11

Pettifor JM (2002)

Rickets.

Calcif Tissue Int **70**: 398-399

Pidduck H and Webbon PM (1978)

The genetic control of Perthes' disease in toy poodles--a working hypothesis.
J Small Anim Pract **19**: 729-733

Pool RR and Leighton RL (1969)

Cranio-mandibular osteopathy in a dog.
J Am Vet Med Assoc **154**: 657-660

Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF and Erdman JW, Jr. (1998)

Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women.
Am J Clin Nutr **68**: 1375S-1379S

Raisz LG (1999)

Physiology and pathophysiology of bone remodeling.
Clin Chem **45**: 1353-1358

Rambeck WA, Birner H, Wehr U, Stempfle HU, Scholz-Ahrens K and Rambeck B (1996)

Urinary pyridinium crosslinks as markers of bone resorption in osteoporosis.
Osteoporosis **6**: Suppl. 1 PTu 771

Rao DS, Agarwal G, Talpos GB, Phillips ER, Bandeira F, Mishra SK and Mithal A (2002)

Role of vitamin D and calcium nutrition in disease expression and parathyroid tumor growth in primary hyperparathyroidism: A global perspective.
J Bone Miner Res **17**: N75-N80

Reinli K and Block G (1996)

Phytoestrogen content of foods--a compendium of literature values.
Nutr Cancer **26**: 123-148

Rico H, Arribas I, Villa LF, Casanova FJ, Hernandez ER and Cortes PJ (2002)

Can a determination of tartrate-resistant acid phosphatase predict postmenopausal loss of bone mass?
Eur J Clin Invest **32**: 274-278

Rieder MA (2000)

Knochenmarker bei ovariectomierten Ratten und Schafen: Tiermodelle der postmenopausalen Osteoporose.
Vet Med Diss, München

Riggs BL and Melton LJ (1995)

The worldwide problem of osteoporosis: Insights afforded by epidemiology.
Bone **17**: 505S-511S

Rodan GA (2002)

Bisphosphonates and primary hyperparathyroidism.
J Bone Miner Res **17**: N150-N153

- Roposch A, Mayr J and Linhart WE (2003)
Age at onset, extent of necrosis, and containment in Perthes disease. Results at maturity.
Arch Orthop Trauma Surg **123**: 68-73
- Rueggsegger P, Koller B and Muller R (1996)
A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture.
Calcif Tissue Int **58**: 24-29
- Sairanen S, Karkkainen M, Tahtela R, Laitinen K, Makela P, Lamberg A-C and Valimaki MJ (2000)
Bone mass and markers of bone and calcium metabolism in postmenopausal women treated with 1,25-dihydroxyvitamin D (calcitriol) for four years.
Calcif Tissue Int **67**: 122-127
- Sakaguchi K, Morita I and Murota S (1994)
Eicosapentaenoic acid inhibits bone loss due to ovariectomy in rats.
Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids **50**: 81-84
- Salter RB and Thompson GH (1984)
Legg-Calve-Perthes disease. The prognostic significance of the subchondral fracture and a two-group classification of the femoral head involvement.
J Bone Joint Surg Am **66**: 479-489
- Sanecki RK, Hoffmann WE, Dorner JL and Kuhlenschmidt MS (1990)
Purification and comparison of corticosteroid-induced and intestinal isoenzymes of alkaline phosphatase in dogs.
Am J Vet Res **51**: 1964-1968
- Sanecki RK, Hoffmann WE, Hansen R and Schaeffer DJ (1993)
Quantification of Bone Alkaline Phosphatase in Canine Serum.
Vet Clin Pathol **22**: 17-23
- Scariano JK, Garry PJ, Montoya GD, Duran VE and Baumgartner RN (2002)
Diagnostic efficacy of serum cross-linked N-telopeptide (NTx) and aminoterminal procollagen extension propeptide (PINP) measurements for identifying elderly women with decreased bone mineral density.
Scand J Clin Lab Invest **62**: 237-243
- Schacky von C (2000)
n-3 fatty acids and the prevention of coronary atherosclerosis.
Am J Clin Nutr **71**: 224S-227S
- Schawalder P, Andres HU, Jutzi K, Stoupis C and Bosch C (2002)
Die Panostitis beim Hund--eine kryptogenetische Skeletterkrankung im Blickwinkel einer neuen ätiopathogenetischen Hypothese. Teil 1: Klinische und diagnostische Aspekte. [Canine panosteitis: an idiopathic bone disease investigated in the light of a new hypothesis concerning pathogenesis. Part 1: Clinical and diagnostic aspects].
Schweiz Arch Tierheilkd **144**: 115-130

Schmolke B (2001)

Labordiagnostik der Osteoporose. [Laboratory diagnosis of osteoporosis].
Orthopäde **30**: 425-436

Schurgers LJ, Hamulyak K, Shearer MJ and Vermeer C (2002)

Effect of dietary vitamin K on stability of oral anticoagulant therapy: Dose response relationships in healthy subjects.
Background Information on the Workshop on Vitamin K and Bone Health

Seibel MJ, Cosman F, Shen V, Gordon S, Dempster DW, Ratcliffe A and Lindsay R (1993)

Urinary hydroxypyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption and estrogen efficacy in postmenopausal osteoporosis.
J Bone Miner Res **8**: 881-889

Seibel MJ and Raue F (1993)

Biochemical markers of bone metabolism - Significance for evaluation of osteoporosis Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels und ihre Bedeutung bei der Osteoporose-Diagnostik; Stellungnahme der Sektion "Calcium-regulierende Hormone und Knochenstoffwechsel", Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie.
Klin Labor **39**: 341-345

Seibel MJ (1996)

Biochemical markers of bone metabolism in the diagnosis and follow-up of post-transplantation osteopathies; Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels in der Diagnose und Verlaufskontrolle von Post-Transplantations-Osteopathien.
Klin Labor **42**: 927-937

Seifert-Klauss V, Mueller JE, Luppä P, Probst R, Wilker J, Hoss C, Treumann T, Kastner C and Ulm K (2002)

Bone metabolism during the perimenopausal transition: a prospective study.
Maturitas **41**: 23-33

Senel K, Ugur M, Erdal A and Ozdemir H (2002)

Type II autosomal dominant osteopetrosis.
Rheumatol Int **22**: 116-118

Shen V, Dempster DW, Birchman R, Mellish RWE, Church E, Kohn D and Lindsay R (1992)

Lack of changes in histomorphometric, bone mass, and biochemical parameters in ovariectomized dogs.
Bone **13**: 311-316

Shiraishi A, Higashi S, Masaki T, Saito M, Ito M, Ikeda S and Nakamura T (2002)

A comparison of alfacalcidol and menatetrenone for the treatment of bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis.
Calcif Tissue Int **71**: 69-79

Shiraki M (1993)

Treatment of osteoporosis with vitamin D-3.
Osteoporos Int **3**: 176-180

- Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C and Miura M (2000)
Vitamin K-2 (menatetrenone) effectively prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis.
J Bone Miner Res **15**: 515-521
- Sillence DO, Senn A and Danks DM (1979)
Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta.
J Med Genet **16**: 101-116
- Siris ES (1998)
Paget's disease of bone.
J Bone Miner Res **13**: 1061-1065
- Somekawa Y, Chiguchi M, Ishibashi T and Aso T (2001)
Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women.
Obstet Gynecol **97**: 109-115
- Stead AC, Stead MC and Galloway FH (1983)
Panosteitis in dogs.
J Small Anim Pract **24**: 623-635
- Stoker DJ (2002)
Osteopetrosis.
Semin Musculoskelet Radiol **6**: 299-305
- Stracke H (1992)
Osteoporose: Was ist gesichert in der Therapie?
Arcis Verlag, München.
- Szulc P, Chapuy MC, Meunier PJ and Delmas PD (1993)
Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women.
J Clin Invest **91**: 1769-1774
- Szulc P, Arlot M, Chapuy MC, Duboeuf F, Meunier PJ and Delmas PD (1994)
Serum undercarboxylated osteocalcin correlates with hip bone mineral density in elderly women.
J Bone Miner Res **9**: 1591-1595
- Szulc P, Chapuy MC, Meunier PJ and Delmas PD (1996)
Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture: A three year follow-up study.
Bone **18**: 487-488
- Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM and Ke HZ (1995)
FDA guidelines and animal models for osteoporosis.
Bone **17**: 125S-133S

- Tortolani PJ, McCarthy EF and Sponseller PD (2002)
Bone mineral density deficiency in children.
J Am Acad Orthop Surg **10**: 57-66
- Van Hoof VO and De Broe ME (1994)
Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns.
Crit Rev Clin Lab Sci **31**: 197-293
- Vanpapendorp DH, Coetzer H, Kruger MG (1995)
Biochemical profile of osteoporotic patients on essential fatty-acids supplementation.
Nutr Res **15**: 325-34
- Van Rietbergen B, Muller R, Ulrich D, Ruegsegger P and Huiskes R (1999)
Tissue stresses and strain in trabeculae of a canine proximal femur can be quantified from computer reconstructions.
J Biomech **32**: 165-173
- Vasseur PB, Foley P, Stevenson S and Heitter D (1989)
Mode of inheritance of Perthes' disease in Manchester terriers.
Clin Orthop -: 281-292
- Vergnaud P, Garnero P, Meunier PJ, Breart G, Kamihagi K and Delmas PD (1997)
Undercarboxylated osteocalcin measured with a specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women: The EPIDOS study.
J Clin Endocrinol Metab **82**: 719-724
- Viereck V, Grundker C, Blaschke S, Siggelkow H, Emons G and Hofbauer LC (2002)
Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts.
J Cell Biochem **84**: 725-735
- Vila-Verde VMR and Da Silva KC (2001)
Bone age delay in Perthes disease and transient synovitis of the hip.
Clin Orthop Relat Res -: 118-123
- Wangen KE, Duncan AM, Merz D-BE, Xu X, Marcus R, Phipps WR and Kurzer MS (2000)
Effects of soy isoflavones on markers of bone turnover in premenopausal and postmenopausal women.
J Clin Endocrinol Metab **85**: 3043-3048
- Wassertheil-Smoller S, Hendrix SL, Limacher M, Heiss G, Kooperberg C, Baird A, Kotchen T, Curb JD, Black H, Rossouw JE, Aragaki A, Safford M, Stein E, Laowattana S and Mysiw WJ (2003)
Effect of estrogen plus progestin on stroke in postmenopausal women: the Women's Health Initiative: a randomized trial.
JAMA **289**: 2673-2684

- Watkins BA, Shen CL, Allen KGD and Seifert MF (1996)
Dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturates and acetylsalicylic acid alter ex vivo PGE-2 biosynthesis, tissue IGF-I levels, and bone morphometry in chicks.
J Bone Miner Res **11**: 1321-1332
- Watkins BA, Li Y, Allen KGD, Hoffmann WE and Seifert MF (2000)
Dietary ratio of (n-6)/(n-3) polyunsaturated fatty acids alters the fatty acid composition of bone compartments and biomarkers of bone formation in rats.
J Nutr **130**: 2274-2284
- Watkins BA, Li Y, Lippman HE and Seifert MF (2001)
Omega-3 polyunsaturated fatty acids and skeletal health.
Exp Biol Med **226**: 485-497
- Wehr U, Schlachter M, Lensing A, Scholz-Ahrens KE, Thielen C, Kienzle E and Rambeck WA (1997)
Biochemical markers of bone resorption in rats, pigs and horses.
Abstract book ESVCN Conference Munich 27
- Wehr U (1998)
Diagnose, Prävention und Therapie von Knochenstoffwechselerkrankungen in der Humanmedizin: Möglichkeiten und Grenzen von biochemischen Knochenmarkern.
Vet Med Diss, München
- Wessler S (1976)
Introduction: What is a model?
Animal models of thrombosis and hemorrhagic diseases
Report of a workshop organized by the Institute of Laboratory Animal Resources (ILAR)
Committee on Animal Models for Thrombosis and Hemorrhagic Diseases, held March 12-13, 1975 at the National Academy of Sciences, Washington D. C. DHEW Pub. No. (NIH) 76-82 Washington D. C.: US Department of Health, Education and Welfare
- WHO (1994)
Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group.
World Health Organ Tech Rep Ser **843**: 1-129
- Wilson AK, Bhattacharyya MH, Miller S, Mani A and Sacco G-N (1998)
Ovariectomy-induced changes in aged beagles: Histomorphometry of rib cortical bone.
Calcif Tissue Int **62**: 237-243
- Wilson CJ and Vellodi A (2000)
Autosomal recessive osteopetrosis: Diagnosis, management, and outcome.
Arch Dis Child **83**: 449-452

Wirner M (1997)

Knochenresorptionsparameter bei Herztransplantationen. Osteoporoseprävention mit 1 alpha, 25 Dihydroxyvitamin D3
Vet Med Diss, München

Withold W (1996)

Monitoring of bone turnover biological, preanalytical and technical criteria in the assessment of biochemical markers.
Eur J Clin Chem Clin Biochem **34**: 785-799

Woitge HW, Seibel MJ and Ziegler R (1996)

Comparison of total and bone-specific alkaline phosphatase in patients with nonskeletal disorder or metabolic bone diseases.
Clin Chem **42**: 1796-1804

Wronski TJ, Cintron M and Dann LM (1988)

Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats.
Calcif Tissue Int **43**: 179-183

Yamaguchi M and Gao YH (1997)

Inhibitory effect of genistein on bone resorption in tissue culture.
Biochem Pharmacol **55**: 71-76

Yamaguchi M, Taguchi H, Ying H-G, Igarashi A and Tsukamoto Y (1999)

Effect of vitamin K-2 (menaquinone-7) in fermented soybean (natto) on bone loss in ovariectomized rats.
J Bone Miner Metab **17**: 23-29

Yamaura M, Nakamura T, Nagai Y, Yoshihara A and Suzuki K (1993)

Reduced mechanical competence of bone by ovariectomy and its preservation with 24R,25-dihydroxyvitamin D-3 administration in beagles.
Calcif Tissue Int **52**: 49-56

Yilmaz N, Bayram M, Erbagci AB and Kilincer MS (1999)

Diagnostic value of biochemical markers of bone turnover and postmenopausal osteoporosis.
Clin Chem Lab Med **37**: 137-143

Yoon HK, Chen K, Baylink DJ and Lau KH (1998)

Differential effects of two protein tyrosine kinase inhibitors, tyrphostin and genistein, on human bone cell proliferation as compared with differentiation.
Calcif Tissue Int **63**: 243-249

Yoshida Y, Moriya A, Kitamura K, Inazu M, Okimoto N, Okazaki Y and Nakamura T (1998)

Responses of trabecular and cortical bone turnover and bone mass and strength to bisphosphonate YH529 in ovariohysterectomized beagles with calcium restriction.
J Bone Miner Res **13**: 1011-1022

9. Danksagung

Bei Herrn Prof. W. A. Rambeck möchte ich mich natürlich als erstes bedanken. Ihm danke ich für die Überlassung des Themas, sowie für seine hervorragende Betreuung und Hilfe zu jeder Zeit.

Ein weiterer, besonderer Dank gilt meinem Betreuer Uli, der sich immer für alle Fragen Zeit nahm und mir bei allen Problemen geduldig weiterhalf.

Herrn Prof. W. Erhardt und Dr. J. Henke, sowie ihren Mitarbeitern und Doktoranden im Klinikum rechts der Isar danke ich ganz herzlich für die Hilfe bei den Operationen. Vor allem wenn es „brenzlig“ wurde, konnte ich mich auf ihre Hilfe verlassen.

Mein Dank gilt außerdem PD Dr. Dr. F. Eckstein und seinen Mitarbeitern in der Anatomischen Anstalt der Medizinischen Fakultät der LMU für die Unterstützung bei der Mikrocomputertomographie der Knochenbiopsien.

Frau Antje Wetzel, Herrn Werner Hesselbach, Frau Elke Kleiner und Frau Jelena Lazic danke ich ganz herzlich für die Hilfe bei meinen Laborarbeiten. Für die Beantwortung unzähliger Fragen und die Hilfe beim Ausdrucken danke ich Didi.

Mein aufrichtiger Dank gilt außerdem den Mitarbeitern am Oberwiesenfeld. Frau Stadler, Walter, Uli, Gabi, Adrian und ganz besonders Nadja möchte ich für die Hilfe bei der Fütterung und Betreuung „meiner“ Hunde, sowie bei allen anderen anfallenden Arbeiten danken.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung danke ich Herrn Prof. K. Osterkorn und Herrn J. Stanglmeier.

Der Firma Hoffmann-LaRoche möchte ich für die zur Verfügungstellung des Futters und der Wirkstoffe danken. Ein weiterer Dank gilt hier Herrn M. Schlachter, der mir bei fachlichen Fragen immer wieder gute Ratschläge gab.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Mitdoktoranden Joseph bedanken, der mir beim Füttern sehr geholfen hat und bei Konstanze, die sich immer Zeit zum Blutnehmen genommen hat. Auch allen anderen Mitdoktoranden, die mir bei meinem Versuch und im Labor geholfen haben, möchte ich an dieser Stelle danken.

Von ganzem Herzen danke ich auch meiner Mutter, die mich zu jeder Zeit unterstützt hat und immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte.

Mein Dank gilt auch allen anderen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, vor allem Petra und Yvonne, die mir immer wieder gute Tipps gaben. Ganz besonders danke ich meinem Freund Fabi. Seinem Verständnis und seiner Unterstützung konnte ich mir immer sicher sein.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich ganz herzlich für die finanzielle Unterstützung meiner Dissertation.

10. Lebenslauf

Susanne Kern

- 17.02.1976 geboren in München als Tochter von Renate Kern, geb. Neuburger und Dr. Joachim Kern
- 1982 – 1986 Besuch der Grundschule am Canisiusplatz in München
- 1986 – 1995 Besuch des Erasmus-Grasser-Gymnasiums in München
- 30.06.1995 Allgemeine Hochschulreife
- 1995 - 2001 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 17.12.2001 3. Staatsexamen
- Januar 2002 Beginn der Arbeit an der vorliegenden Dissertation
- 06.02.2002 Approbation als Tierärztin