

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. Walter A. Rambeck

**Die Bestimmung der Knochenmarker Pyridinolin und
Desoxypyridinolin im Urin zur Beurteilung der Knochenresorption
am transgenen Tiermodell**

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

von
Tina Seibel
aus Würzburg

München 2005

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

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

Referent: Prof. Dr. W. Rambeck

Referentin: Priv.- Doz. Dr. B. Schalch

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 10 |
| 2. Literaturübersicht | 12 |
| 2.1 Geschichtlicher Rückblick | 12 |
| 2.2 Struktur und Wirkungsweise des Wachstumshormons..... | 13 |
| 2.2.1 Struktur | 13 |
| 2.2.2 Physiologische Effekte des Wachstumshormons auf den Stoffwechsel | 14 |
| 2.3 Die Regulation des Wachstumshormons..... | 16 |
| 2.3.1 Die Hypothalamus-Hypophysen-Achse..... | 16 |
| 2.3.2 Regulation des Wachstumshormons | 19 |
| 2.4 Effekte des Wachstumshormons auf den Knochenstoffwechsel..... | 26 |
| 2.4.1 Allgemein | 26 |
| 2.4.2 Effekte von Wachstumshormon und IGF auf das Längen-wachstum | 27 |
| 2.4.3 Effekte des Wachstumshormons auf den Knochenumbau und den Erhalt der Knochenmasse | 29 |
| 2.4.4 In vitro Effekte des Wachstumshormons auf Osteoblasten und Osteoklasten | 29 |
| 2.5 Störungen des Wachstumshormonstoffwechsels..... | 32 |
| 2.5.1 Hypersomatotropismus (Akromegalie) | 32 |
| 2.5.2 Hyposomatotropismus (Wachstumshormonmangel) | 40 |
| 2.6 Bedeutung des Wachstumshormons im Tiermodell Maus | 45 |
| 2.6.1 Allgemein | 45 |
| 2.6.2 Die Effekte des Wachstumshormons auf den Knochenstoffwechsel..... | 47 |
| 2.6.3 Die Effekte des Wachstumshormons auf das Herz-Kreislaufsystem..... | 47 |
| 2.6.4 Die Effekte des Wachstumshormons auf die Reproduktion | 48 |
| 2.6.5 Die Effekte des Wachstumshormons auf Tumorentstehung und Tumorwachstum..... | 50 |
| 2.7 Der medizinische Einsatz des Wachstumshormons..... | 51 |
| 2.7.1 Allgemein | 51 |
| 2.7.2 Wachstumshormon zur Therapie des Hyposomatotropismus | 51 |
| 2.7.3 Wachstumshormon zur Therapie der Osteoporose..... | 52 |
| 2.7.4 Wachstumshormon als Leistungsförderer | 53 |

| | |
|---|------------|
| 3. Material und Methoden | 55 |
| 3.1 Versuchsdurchführung..... | 55 |
| 3.2 Versuchstiere | 56 |
| 3.3 Bestimmung biochemischer Marker des Knochen-stoffwechsels: Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Deoxypyridinolin | 57 |
| 3.3.1 Prinzip | 57 |
| 3.3.2 Bestimmung | 57 |
| 3.3.3 Kreatinin..... | 59 |
| 3.3.4 Reagenzien und Material | 60 |
| 3.3.5 Apparate | 60 |
| 3.5 Statistische Auswertung..... | 61 |
| 4. Ergebnisse..... | 62 |
| 4.1 Versuch 1 | 62 |
| 4.2 Versuch 2 | 66 |
| 5. Diskussion | 70 |
| 5.1 Kritik der Methoden..... | 70 |
| 5.1.1 Das transgene Maus-Modell | 70 |
| 5.1.2 Bestimmung der Collagen-Crosslinks im Urin..... | 71 |
| 5.2 Ergebnisdiskussion | 73 |
| 5.2.1 Versuch 1 | 73 |
| 5.2.2 Versuch 2 | 81 |
| 5.3 Abschließende Interpretationen..... | 86 |
| 6. Zusammenfassung | 88 |
| 7. Summary | 90 |
| 8. Literaturverzeichnis | 92 |
| 9. Lebenslauf..... | 113 |
| 10. Danksagung | 114 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Auswirkungen des Wachstumshormons auf den Stoffwechsel | 15 |
| Tabelle 2: Releasing-Hormone des Hypothalamus und ihre Wirkung auf die Hypophyse | 18 |
| Tabelle 3: Release-Inhibiting-Hormone des Hypothalamus und ihre Wirkung auf die Hypophyse | 19 |
| Tabelle 4: Mittlere Konzentrationen von Pyridinolin [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der weiblichen Mäuse | 63 |
| Tabelle 5: Mittlere Konzentrationen von Pyridinolin [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der männlichen Mäuse | 64 |
| Tabelle 6: Mittlere Konzentrationen von Desoxypyridinolin [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der weiblichen Mäuse | 65 |
| Tabelle 7: Mittlere Konzentrationen von Desoxypyridinolin [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der männlichen Mäuse | 65 |
| Tabelle 8: Mittlere Konzentrationen von Pyridinolin [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der männlichen Mäuse | 66 |
| Tabelle 9: Mittlere Konzentrationen von Pyridinolin [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der weiblichen Mäuse | 67 |
| Tabelle 10: Mittlere Konzentrationen von Desoxypyridinolin [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der männlichen Mäuse | 68 |
| Tabelle 11: Mittlere Konzentrationen von Desoxypyridinolin [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der weiblichen Mäuse | 68 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Die Aminosäurenkette des Wachstumshormons | 14 |
| Abbildung 2: Das Hypophysen-Hypothalamus-System | 17 |
| Abbildung 3: Übersicht über die Regulation des Wachstumshormon und seine Wirkung auf den Organismus..... | 21 |
| Abbildung 4: Das Zusammenspiel von IGF-I und Wachstumshormon bei der Regulation des Knochenstoffwechsels wird durch drei verschiedene Feedback-Mechanismen kontrolliert (Leung et al., 1996):..... | 31 |
| Abbildung 5: Chromatogramm: HPLC Detektion von Pyridinolin und Deoxypyridinolin | 59 |
| Abbildung 6: Der Verlauf der Pyridinolin-Ausscheidung [nmol/mmol Kreatinin] zwischen der 3. und 38. Lebenswoche bei allen vier Gruppen..... | 74 |
| Abbildung 7: Der Verlauf der Desoxypyridinolin-Ausscheidung [nmol/mmol Kreatinin] zwischen der 3. und 38. Lebenswoche bei allen vier Gruppen..... | 74 |
| Abbildung 8: Die gesamte Pyridinolin-Ausscheidung [nmol/mmol Kreatinin] der weiblichen Tiere (Transgen und Kontrolle) im Vergleich zu den männlichen Tieren (Transgen und Kontrolle) der ersten neun Lebensmonate | 75 |
| Abbildung 9: Die gesamte Desoxypyridinolin-Ausscheidung [nmol/mmol Kreatinin] der weiblichen Tiere (Transgen und Kontrolle) im Vergleich zu den männlichen Tieren (Transgen und Kontrolle) der ersten neun Lebensmonate | 76 |
| Abbildung 10: Der Verlauf der Osteocalcin-Ausscheidung [nmol/mmol Kreatinin] der transgenen Männchen und Weibchen sowie der Kontrolltiere zwischen der 3. und 38. Lebenswoche..... | 77 |
| Abbildung 11: Der Verlauf der trabekulären Knochendichte der transgenen Weibchen und Männchen sowie der Kontrolltiere zwischen der 3. und 38. Lebenswoche | 80 |
| Abbildung 12: Die mittleren Pyridinolin-Konzentrationen [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der Mäuse der vier verschiedenen Gruppen | 83 |
| Abbildung 13: Die mittleren Desoxypyridinolin-Konzentrationen [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der Mäuse der vier verschiedenen Gruppen | 84 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|--|
| ACTH | Adrenocorticotropes Hormon |
| ADH | Antidiuretisches Hormon |
| bGH | Bovines GH |
| BMC | Bone mineral content, Knochenmineralgehalt |
| BMD | Bone mineral density, Knochendichte |
| cm | Zentimeter |
| CMV | Cytomegalie-Virus |
| con | Kontrolle |
| CRH | Corticotropin-Releasing-Hormon |
| DXA | Hochauflösende Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie |
| FSH | Follikel-Stimulierendes Hormon |
| GH | Growth hormone |
| GHD | Growth-hormone-deficiency, Wachstumshormonmangel |
| GHIH | Growth-Hormon-Inhibiting-Hormon |
| GHR | Growth-Hormon-Rezeptor |
| GHRIH | Growth-Hormon-Release-Inhibiting-Hormon |
| GHSR | Growth-Hormon-Secretagogue-Rezeptor |
| GnRH | Gonadotropin-Releasing-Hormon |
| GRH | Growth-Hormon-Releasing-Hormon |
| HFBA | Haptafluorobutyricacid |
| hGH | Humanes GH |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| IGF | Insulin-like-growth-factor |
| IGFBP | Insulin-like-growth-factor-binding-protein |
| kDa | Kilo Dalton |
| LH | Luteinisierendes Hormon |
| MAP | Mean arterial blood pressure |
| mg | Milligramm |

| | |
|-------|--|
| min | Minute |
| mm | Millimeter |
| mmol | Millimol |
| MRH | Melatonin-StimulierendeS-Hormon-Releasing-Hormon |
| Mt | Metallothionein |
| n | normal |
| NaOH | Natronlauge |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| nmol | Nanomol |
| p | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| PEPCK | Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase |
| PIH | Prolaktin-Inhibiting-Hormon |
| pQCT | Hochauflösende periphere Computertomographie |
| STH | Somatotropes Hormon |
| tg | Transgen |
| TRH | Thyreotropin-Releasing-Hormon |
| TSH | Thyreoidea-Stimulierendes-Hormon |
| vs | Versus, gegen |
| ZNS | Zentralnervensystem |
| μl | Mikroliter |

1. Einleitung

Osteoporose, eine der häufigsten Knochenstoffwechselerkrankungen, ist als eine systemische Erkrankung definiert, die durch eine reduzierte Knochenmasse sowie einer Beeinträchtigung der Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist und in Folge mit einer erhöhten Knochenbrüchigkeit sowie einem gesteigerten Frakturrisiko einhergeht (Consensus Development Conference, 1993). Seit 1994 ist es durch die US Food and Drug Administration vorgeschrieben, dass neue Therapieansätze zur Behandlung der Osteoporose zunächst am Tiermodell der Ratte sowie an einem ausgereiften Großtiermodell untersucht werden.

Das klassische Tiermodell für die Untersuchung des Knochenstoffwechsels stellt die durch Ovariectomie induzierte Osteopenie beim Kleintier (Maus, Ratte) sowie beim Großtier (Affe, Hund, Schaf, Minipig) dar. Die Nachteile der ovariectomierten Tiermodelle sind, neben der Begrenzung auf weibliche Tiere, zum einen der invasive Eingriff der Ovariectomie, zum anderen die alleinige Untersuchung der Östrogenwirkung auf den Knochenstoffwechsel.

Ein großer Vorteil des transgenen Tiermodells gegenüber den ovariectomierten Modellen besteht darin, dass die Auswirkung eines Faktors durch die gezielte Überexpression bzw. Ausschaltung eines bestimmten Gens untersucht werden kann. Im Jahr 2002 gelang es, das Maus-Genom vollständig zu entschlüsseln und somit einen direkten Vergleich mit dem menschlichen Genom aufzustellen. Da das Genom von Mensch und Maus zu etwa 99% übereinstimmt, lassen sich wissenschaftliche Erkenntnisse, die an Mäusen gewonnen wurden, relativ gut auf den Menschen übertragen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Rahmen zweier Versuche die Wirkung von Wachstumshormon (Versuch 1) und Insulin-ähnlichen-Bindungsprotein-2 (Versuch 2) auf die Knochenresorption anhand des transgenen Tiermodells Maus zu untersuchen. Dabei sollte durch die Analyse der Knochenresorptionsmarker Pyridinolin und

Desoxypyridinolin im Urin die Änderungen des Knochenstoffwechsels auf nichtinvasive Weise untersucht werden. In Versuch 1 sollte dabei vor allem der Verlauf der Resorptionsmarker im Urin während unterschiedlicher Entwicklungsstadien in Verbindung mit der, an der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität gemessenen, Knochendichte beurteilt werden. In Versuch 2 sollte ausschließlich in der 18. Lebenswoche die Auswirkung der Insulin-ähnlichen-Bindungsprotein-2-Überexpression auf die Knochenresorption in An- und Abwesenheit einer Wachstumshormon-Überexpression untersucht werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Geschichtlicher Rückblick

In den Anfängen der Erforschung der Hypophyse gab es verschiedenste Denkansätze. 100 Jahre v. Chr. beschrieb Galen von Pergamon als erster das Vorhandensein der Hypophyse und nahm an, dass ihre Funktion die Filtration eines vom Gehirn produzierten mukösen Sekretes sei, das anschließend in den Nasopharynx sezerniert wird. 1663 hielt Piccolhomini die Hypophyse für den wichtigen Verschluss des Infundibulums, um ein Entweichen des Lebensgeistes zu verhindern (Collip, 1999).

Der Zusammenhang zwischen Hypophyse und Wachstum wurde deutlich, als man erkannte, dass Patienten mit Riesenwuchs Hypophysentumore aufweisen. 1864 berichtet Verga von einer Patientin mit typischen Symptomen, wie Hypertrophie der Hände, Füße und des Gesichtes. Im weiteren Krankheitsverlauf entwickelte sie Arrhythmien und Arthropathien. Nach ihrem Tod stellte er bei der Obduktion eine starke Vergrößerung der Hypophyse fest (Verga 1864). 1886 beschrieb Pierre Marie eine Erkrankung der Hypophyse, die mit Organomegalie und Veränderungen an den Akren einhergeht, wobei er unsicher war, ob die Vergrößerung der Hypophyse die Ursache oder eine Folge der Akromegalie war (Marie, 1886). Massalongo und Benda waren 1892 und 1900 die ersten, welche die Veränderungen der Hypophyse als Ursache für ein Entstehen der Akromegalie erklärten (Lane und Law, 2001).

Mit der Durchführung der ersten Hypophysektomie gelang 1886 Sir Victor Horsley ein großer Schritt in der Erforschung der Hypophyse. Da die Versuchstiere diese Operation nicht überlebten, galt die Hypophyse als lebensnotwendiges Organ (Biedl et al., 1897). Mit verbesserten chirurgischen Methoden und einer besseren medizinischen Versorgung führte Aschner 1909 die ersten erfolgreichen Hypophysektomien bei Hunden durch. Er beobachtete daraufhin nicht nur einen Wachstumsstillstand, sondern auch eine massive Fetteinlagerung im Körper dieser Tiere (Aschner, 1912). Cushing erreichte 1909 einen großen Erfolg in der Erforschung und der Therapie der Akromegalie, indem er eine

partielle Hypophysektomie durchführte und anschließend eine schnelle Besserung der Symptome beobachten konnte (Cushing, 1909).

Anfang der zwanziger Jahre züchteten Evans und Long Riesenratten, indem sie normalwüchsigen Ratten Extrakt aus Rinderhypophysen injizierten (Evans und Long 1921). In den fünfziger Jahren konnte man eine Speziespezifität des Wachstumshormons nachweisen, als man bei der Injektion von Extrakten aus Fischhypophysen bei Fischen, jedoch nicht bei Ratten, eine Wachstumssteigerung feststellen konnte (Wilhelmi, 1959). Präparate aus Schweine- und Rinderhypophysen waren bei Affen unwirksam, Extrakte aus Affenhypophysen dagegen erreichten eine Wachstumssteigerung. Hypophysenextrakte höherer Säugetiere wirken bei niederen Säugetieren, jedoch nicht umgekehrt. 1951 gelang es erstmals Wachstumshormon aus den Hypophysen verstorbener Menschen zu isolieren, um es anschließend erfolgreich bei zwergwüchsigen Kindern zur Wachstumssteigerung einzusetzen, bis dies 1985 weltweit aufgrund der hohen Infektionsgefahr verboten wurde (Raben und Westermeyer, 1951). Seit Dezember 1985 wird Wachstumshormon gentechnologisch hergestellt.

2.2 Struktur und Wirkungsweise des Wachstumshormons

2.2.1 Struktur

Das Wachstumshormon (growth hormone: GH), auch Somatotropin genannt, ist ein Peptidhormon, das in den somatotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens synthetisiert und von dort ins Blut sezerniert wird. Es existieren zwei aktive Formen des Wachstumshormons, die sich in der Anzahl der Aminosäuren und im Molekulargewicht unterscheiden. Die mit einem Anteil von ungefähr 90% vorherrschende Variante besteht aus 191 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 22 kDa, während die zweite Form mit 176 Aminosäuren ein Molekulargewicht von 20 kDa hat (Goodman et al., 1991). Die Struktur beider Formen weist zwei Disulfidbrücken auf (Abbildung 1),

durch die die Aminosäurenkette des Hormons in zwei Schleifen gelegt ist (Li und Graf,1974).

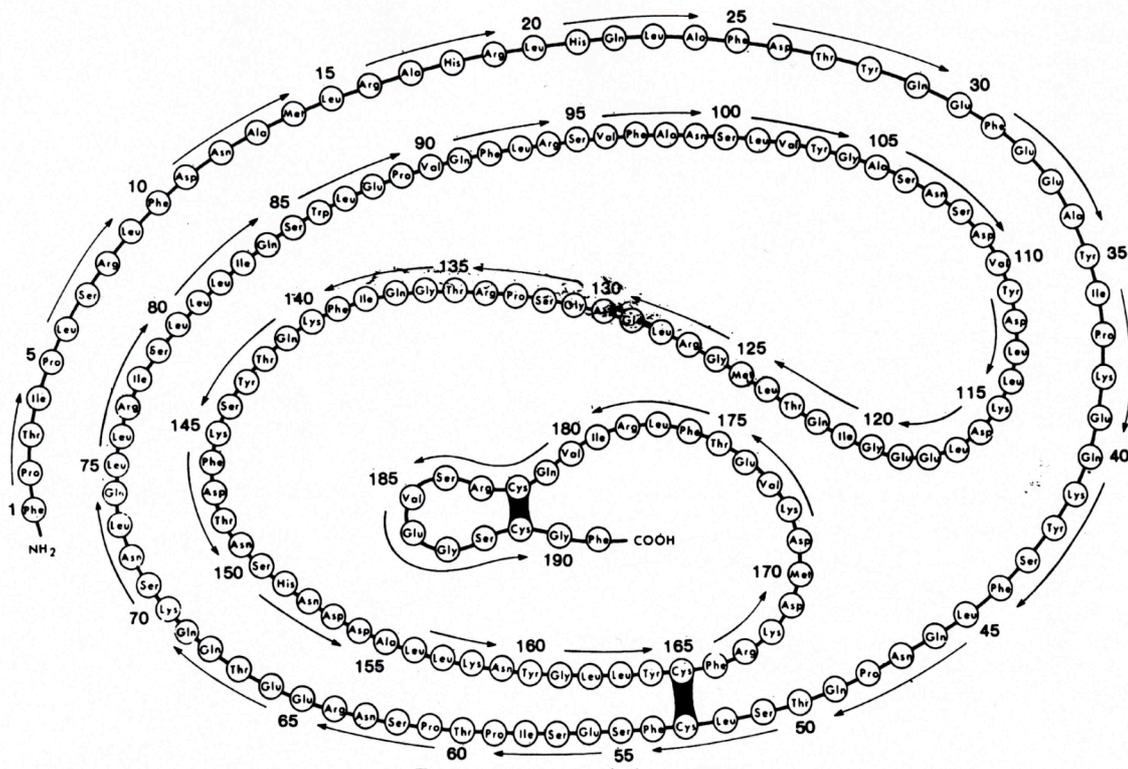


Abbildung 1: Die Aminosäurenkette des Wachstumshormons

2.2.2 Physiologische Effekte des Wachstumshormons auf den Stoffwechsel

Das Wachstumshormon kontrolliert eine Vielzahl verschiedener Stoffwechselvorgänge und hat einen direkten Einfluss auf Wachstum und Differenzierung von Zellen. Protein-, Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel werden durch die sowohl anabole als auch katabole Wirkungsweise des Wachstumshormons beeinflusst. Gemäß der sogenannten Somatomedin-Hypothese (Kapitel 2.3.2.2) werden die Zielzellen nicht ausschließlich direkt durch das Wachstumshormon, sondern auch indirekt durch Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (Somatomedine: IGF-I und IGF-II) beeinflusst. So wird auch die

wohl bekannteste Wirkung des Wachstumshormons, die Steuerung des postnatalen Körperwachstums, über die Stimulierung der IGF-I-Synthese in der Leber geregelt.

In erster Linie ist das Wachstumshormon ein Hormon mit einer anabolen Wirkung, das neben dem Knochenwachstum u.a. die Proteinsynthese im Muskel und somit das Muskelwachstum stimuliert. Die katabole Wirkungsweise betrifft neben dem Fettstoffwechsel, der mit gesteigerter Lipolyse und damit einhergehender Erhöhung der freien Fettsäuren reagiert, auch den Kohlenhydratstoffwechsel (Tabelle 1). Die Effekte auf den Glukosestoffwechsel sind abhängig von der Dauer der Einwirkung. Kurzfristig bewirkt das Wachstumshormon eine vermehrte Glukoseaufnahme in der Zelle (Insulin-ähnliche Wirkung), bei lang anhaltender Erhöhung des Hormons dagegen wird die Aufnahme von Glukose, als auch die Gluconeogenese in der Leber gehemmt (Insulin-antagonistische Wirkung) und gleichzeitig die Insulin Synthese im Pankreas stimuliert. Die Folge sind ein erhöhter Glukose- und Insulinspiegel im Blut, so dass es im Laufe einer Akromegalie oder einer GH-Therapie zu einer Hyperglykämie aufgrund steigender Insulinresistenz kommen kann (MacGorman et al., 1981; Rosenfeld et al., 1982).

Tabelle 1: Auswirkungen des Wachstumshormons auf den Stoffwechsel

| Stoffwechsel | Wirkweise | Wirkung |
|--------------------------|------------------|--|
| Knochenstoffwechsel | anabol | Proliferation von Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten |
| Proteinstoffwechsel | anabol | gesteigerte Protein-Synthese, erhöhte Aminosäureaufnahme, verzögerte Oxidation von Proteinen |
| Fettstoffwechsel | katabol | gesteigerte Fettverbrennung, Freisetzung von Triglyzeriden aus den Fettzellen |
| Kohlenhydratstoffwechsel | katabol | kurzfristig erhöhte Glukoseaufnahme (insulin-ähnlich), langfristig Insulin-antagonistische Wirkung: Erhöhung der Blutglukose-Konzentration |

2.3 Die Regulation des Wachstumshormons

2.3.1 Die Hypothalamus-Hypophysen-Achse

2.3.1.1 Anatomie des Hypothalamus und der Hypophyse

Das Zwischenhirn (Diencephalon) der Säugetiere und des Menschen besteht aus Hypothalamus, Epithalamus, Thalamus und Metathalamus. Der Hypothalamus bildet den Boden des Zwischenhirns und geht trichterförmig in den Hypophysenstiel über, welcher die Verbindung zur Hypophyse (Hirnanhangsdrüse) darstellt.

Die Hypophyse setzt sich aus Vorderlappen (Adenohypophyse), dem dazugehörigen Mittellappen und einem Hinterlappen (Neurohypophyse) zusammen. Sie liegt in der Fossa interpeduncularis zwischen dem Chiasma opticum und dem Corpus mamillare ventral am Diencephalon. Am Hypophysenstiel befindet sich die Neurohypophyse als neurale Ausstülpung des Hypothalamus. Rostral der Neurohypophyse schließt sich die Adenohypophyse an.

Hypothalamus und Hypophyse stehen über Pfortadersystem in Verbindung, das sich aus zwei hintereinander geschalteten Kapillarsystemen zusammensetzt. Über dieses System gelangen die im Hypothalamus produzierten Hormone zur Adenohypophyse. Der Transport zur Neurohypophyse dagegen erfolgt intraaxonal.

Histologisch kann man die Drüsenzellen der Adenohypophyse in drei verschiedene Typen unterscheiden: acidophile, basophile und chromophobe Zellen. Die Synthese der verschiedenen Hypophysen-Hormone kann zum Teil den einzelnen Zelltypen zugeordnet werden, wobei das Wachstumshormon hauptsächlich von den acidophilen Zellen synthetisiert wird.

2.3.1.2 Die Hypothalamus-Hypophysen-Achse

Das Hypothalamus-Hypophysen-System (Abbildung 2) ist ein komplexer Regelkreis von Hormonen, dem nahezu alle endokrinen Drüsen des Körpers untergeordnet sind. Der Hypothalamus, der als Teil des Zwischenhirns direkt durch das ZNS gesteuert wird, produziert in den neurosekretorischen Zellen zwei Hormon-Arten.

Es handelt sich dabei zum einen um die beiden Hormone ADH (Antidiuretisches Hormon) und Oxytozin, die intraaxonal über Nervenzellfortsätze direkt zum Hypophysen-Hinterlappen transportiert, dort gespeichert und bei Bedarf ans Blut abgegeben werden. Zum anderen werden im Hypothalamus sog. glandotrope Releasing- (Liberine), bzw. Release-Inhibitin-Hormone (Statine) gebildet, die über die Blutkapillaren des venösen Pfortadersystems zum Hypophysenvorderlappen gelangen.

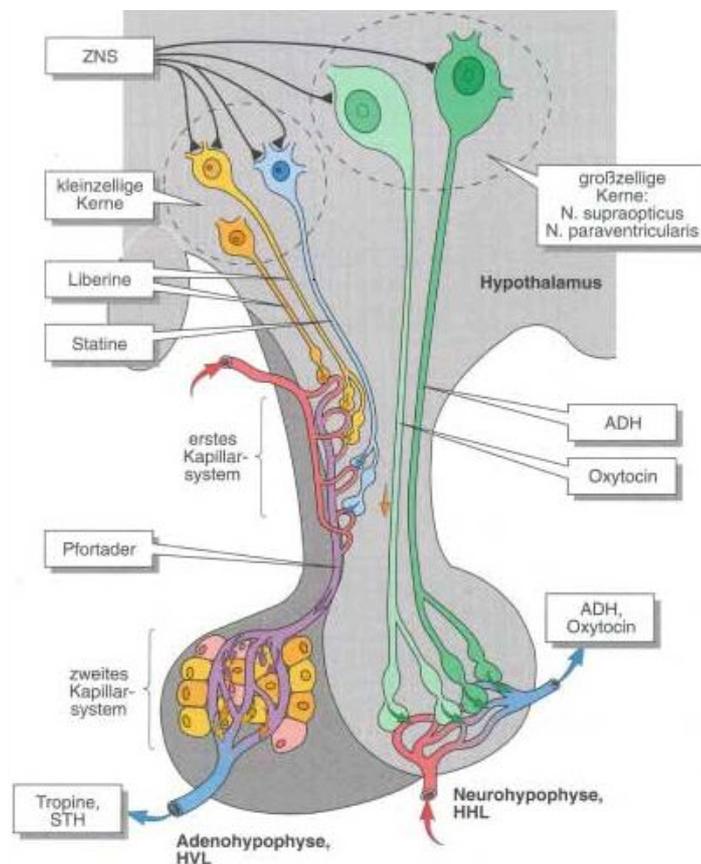


Abbildung 2: Das Hypophysen-Hypothalamus-System

Zu der Gruppe der Liberine (Tabelle 2) zählen neben dem Growth-Hormon-Releasing-Hormon (GRH), das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH), das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH), das Melatonin-stimulierende-Hormon-Releasing-Hormon (MRH) sowie das Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH). Die Gruppe der Statine (Tabelle 3) wird gebildet aus dem Growth-Hormon-Inhibiting-Hormon (GHIH) und dem Prolaktin-Inhibiting-Hormon (Dopamin).

Die Liberine und Statine gelangen über Kapillaren des venösen Pfortadersystems zur Adenohypophyse. Über kurze Axone werden sie an das erste Kapillarsystem abgegeben und gelangen mit dem Blut zum Kapillarsystem des Hypophysen-Vorderlappens.

In der Adenohypophyse binden Liberine und Statine an Oberflächenrezeptoren der hormonproduzierenden Zellen, die somit angeregt werden, sog. glandotrope Hormone auszuschütten, welche wiederum die Hormonausschüttung der endokrinen Organe stimulieren und gleichzeitig die weitere Ausschüttung von Liberinen und Statinen aus der Hypophyse hemmen (negatives Feedback).

Tabelle 2: Releasing-Hormone des Hypothalamus und ihre Wirkung auf die Hypophyse

| Bezeichnung | Synonym | Abkürzung | Freisetzung aus Hypophyse |
|--------------------------------|-----------------|------------------|--|
| Growth-Hormon-Releasing-Hormon | Somatoliberin | GHRH | Somatotropes Hormon (STH), bzw. Somatotropin, Wachstumshormon |
| Thyreotropin-Releasing-Hormon | Thyreoliberin | TRH | Thyreoida-stimulierendes-Hormon (TSH), bzw. Thyreotropin |
| Corticotropin-Releasing-Hormon | Corticoliberin | CRH | Adrenocorticotropes Hormon (ACTH), bzw. Corticotropin |
| Gonadotropin-Releasing-Hormon | Gonadoliberin | GnRH | Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH) |
| Prolaktin-Releasing-Hormon | Prolaktoliberin | PRH | Prolaktin |

Tabelle 3: Release-Inhibiting-Hormone des Hypothalamus und ihre Wirkung auf die Hypophyse

| Bezeichnung | Synonym | Abkürzung | hemmt die Freisetzung von |
|--|---------------------------|------------------|----------------------------------|
| Somatotropin-Release-Inhibiting-Hormon | Somatostatin | GHIH | STH |
| Prolaktin-Release-Inhibiting-Hormon | Prolactostatin Dopamin | PIH | Prolaktin |

2.3.2 Regulation des Wachstumshormons

Die spontane Wachstumshormon-Sekretion durch die Adenohypophyse erfolgt pulsatil in einem diurnalen Rhythmus. Die Hauptfreisetzung findet mit erhöhter Amplitude während des Schlafens statt. Die GH-Sekretion ist im Säuglingsalter und der Pubertät am höchsten (Winer et al., 1990; Parker et al., 1969).

Die Synthese und Sekretion von Wachstumshormon wird hauptsächlich durch zwei im Hypothalamus gebildete Hormone gesteuert (Abbildung 3), das Growth-Hormon-Releasing-Hormon (GHRH) und das entsprechend inhibitorisch wirkende Growth-Hormon-Release-Inhibiting-Hormon (GHRIH, Synonym Somatostatin). Die Produktion beider hypothalamischer Hormone wird durch verschiedene Faktoren wie Alter, Geschlecht, Entwicklungsstadium, Ernährungszustand, Stress und über Neurotransmitter gesteuert. So bewirken zum Beispiel Hypoglykämie, Stress und Muskelarbeit einen Anstieg des Wachstumshormongehaltes im Blut. Ein hoher Blutzuckerspiegel senkt dagegen die Hormonproduktion.

GHRH und GHRIH erreichen über den Blutweg die Hypophyse. Dort stimuliert GHRH sowohl die Synthese als auch die Freisetzung des Wachstumshormons. Somatostatin dagegen hemmt nur die Freisetzung, nicht die Synthese (Reichlin, 1983).

Neuere Untersuchungen ergaben, dass zusätzlich zu GHRH und Somatostatin die sogenannten Growth-Hormon-Secretagogue-Rezeptoren (GHSR) der Hypophyse und des Hypothalamus und der dazugehörige Ligand Ghrelin eine wichtige Rolle in der Regulation der GH-Ausschüttung spielen. Ghrelin wird im Magen bei Nahrungsentzug vermehrt, bei Nahrungsaufnahme vermindert synthetisiert und sezerniert und bewirkt eine gesteigerte GH-Sekretion aus der Hypophyse (Camina et al., 2003).

Membranständige Glykoproteinrezeptoren in den verschiedensten Geweben, wie z.B. Muskulatur, Fettgewebe, Herz, Leber, Fibroblasten und Osteoblasten ermöglichen es, dem Wachstumshormon direkten Einfluss auf seine Zielzellen zu nehmen.

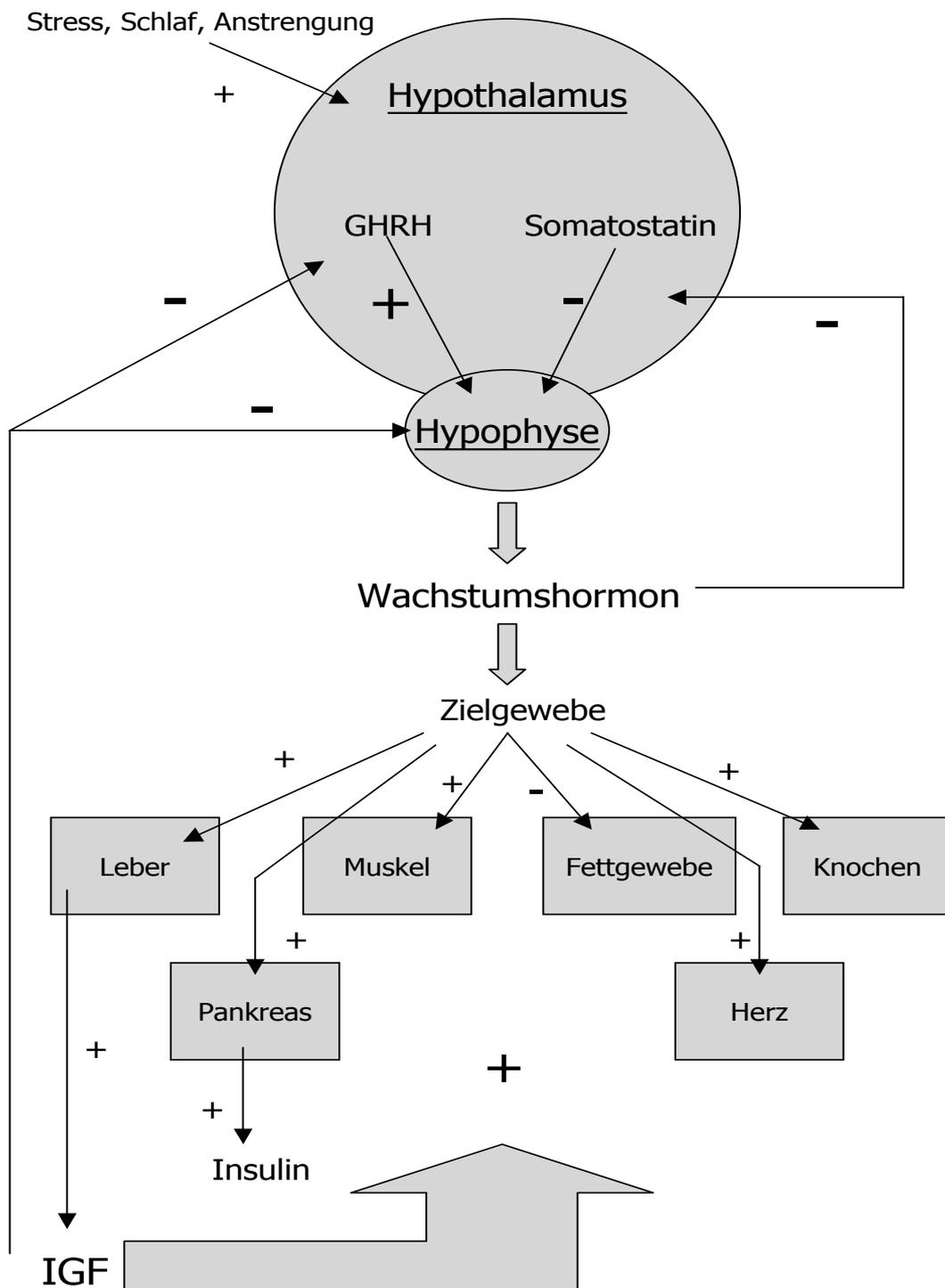


Abbildung 3: Übersicht über die Regulation des Wachstumshormon und seine Wirkung auf den Organismus.

2.3.2.1 Wachstumshormon-Bindungsproteine

Wird das Wachstumshormon vom Hypophysenvorderlappen ins Blut abgegeben, gelangt es entweder frei, oder an ein Bindungsprotein gebunden, zur Zielzelle. Durch Eingehen dieses Komplexes gelingt es dem Wachstumshormon, seine Halbwertszeit von 20 Minuten in freier Form auf mehrere Stunden zu verlängern.

Man unterscheidet zwei verschiedene Wachstumshormon-Bindungsproteine, wobei das eine sich durch seine besonders hohe Affinität zu der vorherrschenden 22 kDa Variante des Wachstumshormons auszeichnet und in seiner Struktur mit dem extrazellulären Anteil des Wachstumshormon-Rezeptors identisch ist. Das andere Bindungsprotein geht Komplexe mit der seltener vorkommenden 20 kDa Variante des Wachstumshormons ein (Leung et al., 1987; Bauman et al., 1989).

2.3.2.2 Insulin-like-growth-factors

Somatomedin-Hypothese

Salmon und Daughaday waren vor ca. 50 Jahren die ersten, die feststellten, dass das Wachstumshormon nicht ausschließlich auf direktem Wege das Wachstum fördert (Salmon and Daughaday, 1957). In vivo und in vitro Versuche, in denen sie die Einlagerung von Sulfat in Knorpelzellen messen konnten, zeigten, dass diese Einlagerung bei hypophysektomierten Ratten signifikant reduziert war (Murphy et al., 1956; Daughaday et al., 1972). Injektionen von Hypophysenextrakt bzw. isoliertem Wachstumshormon bewirkten die Wiederaufnahme von Sulfat in die Knorpelzellen (Denko und Bergenstal, 1955; Salmon et Daughaday, 1957). Bei einer direkten Wachstumshormon-Applikation an die Knorpelzellen, wurden nur minimale Effekte beobachtet. Bei Verwendung von Serum gesunder Ratten konnte die Sulfataufnahme in die Zelle wieder gemessen werden, nicht jedoch bei der Verwendung von Serum hypophysektomierter Tiere. Als man letztendlich diesen hypophysektomierten Tieren bovines Wachstumshormon injizierte und daraufhin wieder positive Effekte an den Knorpelzellen messen konnte, galt diese Studie als Hinweis dafür, dass die

wachstumsfördernde Eigenschaft nicht durch das Wachstumshormon selbst, sondern durch Mediatoren vermittelt werden muss. Da diese Mediatoren die Eigenschaft haben, die Sulfat-Aufnahme in die Zelle zu stimulieren, nannte man sie „sulfation-factors.“

1978 wurden die beiden sulfation-factors erstmals isoliert und ihre Struktur identifiziert. Aufgrund ihrer Fähigkeit wie Insulin, die Glukoseaufnahme in die Zelle zu erhöhen, nannte man sie „insulin-like-growth-factors.“ Neben der Ähnlichkeit in der Wirkungsweise zeigen die IGFs und Insulin ca. 50% Übereinstimmungen in ihrer Struktur (Rinderknecht und Humbel, 1978).

Die Somatomedin-Hypothese steht für die Abhängigkeit der wachstumsfördernden Eigenschaft des Wachstumshormons von der Synthese und Freisetzung der IGFs aus der Leber.

1982 wurde die Somatomedin-Hypothese durch Isaaksson et al. zur „Erweiterten-Somatomedin-Hypothese“ ergänzt, indem sie durch die direkte Injektion von Wachstumshormon in die Tibia hypophysektomierter Ratten einen signifikanten Anstieg des Knochenwachstums nachweisen konnten. Da an der kontrolateralen Gliedmaße, die keine Injektion erhielt, keine Wachstumssteigerung nachgewiesen werden konnte, ging man davon aus, dass es sich um eine lokale Produktion von IGF handeln musste (Isaksson et al., 1982). Die Erweiterte-Somatomedin-Hypothese besagt demnach, dass neben dem systemisch zirkulierenden auch das lokal gebildete IGF eine wichtige Rolle für die Vermittlung der Wachstumshormon-Wirkung spielt.

IGF-I und IGF-II

IGF-I und IGF-II sind Polypeptide mit einer Länge von 70 bzw. 67 Aminosäuren. IGF-II ist verantwortlich für die Embryonalentwicklung, während IGF-I ein wichtiger Bestandteil in der postnatalen Entwicklung und im Erwachsenenalter ist (DeChiara et al., 1991). So ergaben Untersuchungen, dass bei einem angeborenen Wachstumshormon-Mangel die Körpergröße bei Geburt kaum, bei einem angeborenen IGF-I-Mangel dagegen stark beeinträchtigt ist (Woods et al., 1996).

Übereinstimmende Ergebnisse wurden bei einer Studie mit IGF-I Knockout Mäusen erzielt, die bei Geburt stark kleinwüchsig waren (Powell-Braxton et al., 1993). Eine Behandlung mit Wachstumshormon erzielt weder bei einem angeborenen IGF-I-Mangel beim Menschen, noch bei IGF-I-Knockout Mäusen einen Effekt auf das Längenwachstum und das Körpergewicht. Die IGF-I Synthese ist hauptsächlich vom Wachstumshormon abhängig, während IGF-II weitgehend unabhängig von diesem ist (Daughaday und Rotwein, 1989). Die mitogene Wirkung des IGF-I ist abhängig von der Verfügbarkeit des freien IGF-I, dessen Konzentration wiederum abhängig von der Synthese in der Leber und dem Bindungsgrad an IGF-Bindungsproteine (IGFBP) ist, wobei es zu 95% in gebundener Form vorliegt (Blum und Ranke, 1990).

2.3.2.3 IGF-Rezeptoren

Die IGF-Rezeptoren, die in den verschiedensten Geweben vorliegen, vermitteln die Wirkung der IGFs auf ihre Zielzellen.

Bei dem IGF-I-Rezeptor, der eine sehr große Ähnlichkeit zum Insulin-Rezeptor hat, handelt es sich um ein membranständiges Glykoprotein mit einer bis zu zehnmal höheren Affinität zu IGF-I als zu IGF-II (Oh et al, 1993). Insulin bindet mit 500 - 1000-fach geringerer Affinität an der IGF-I-Rezeptoren (Grothey et al., 1999).

Der IGF-II-Rezeptor ist in seiner Struktur mit dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor identisch und wird daher auch IGF-II/ Mannose-6-Phosphat-Rezeptor genannt (Pohlmann et al., 1987; Oshima et al., 1988). Er besitzt mehrere Bindungsstellen, sowohl für IGF-II, als auch für Mannose-6-Phosphat (MacDonald et al., 1988). Die Affinität zu IGF-I ist um den Faktor 500 schwächer und für Insulin nicht nachweisbar (Nielsen et al., 1993). Der IGF-II/ Mannose-6-Phosphat-Rezeptor liegt auch in einer gelösten Form im Serum vor (Bobek et al., 1991, 1992), wobei die genaue Funktion der löslichen Variante noch nicht geklärt ist. Möglicherweise fungiert sie als IGF-II-spezifisches Bindungsprotein.

2.3.2.4 IGF-Bindungsproteine (IGFBP)

95% des zirkulierenden IGF-I und IGF-II sind gebunden an IGFBP, von denen bis heute sechs verschiedene identifiziert werden konnten (Shimasaki et al., 1991; Blum und Ranke, 1990). Alle sechs Bindungsproteine haben große strukturelle Ähnlichkeiten und besitzen sowohl eine hohe Affinität als auch eine hohe Spezifität gegenüber den IGFs. Während IGFBP-1, -3 und -4 eine ähnlich große Affinität zu IGF-I und IGF-II haben, bevorzugen die IGFBP-2, -5 und -6 die Bindung mit IGF-II (Drop et al., 1992; Rechler et al., 1992). Neben der Regulation der Verfügbarkeit der IGFs besitzen sie eigene spezifische Oberflächenrezeptoren, mit denen sie IGF-unabhängig mitogen auf Zellen wirken (Blum et al., 1989).

IGFBP-3 ist das wichtigste Transportprotein, da es mit 70-95% des zirkulierenden IGF-I einen 150 kDa schweren Komplex eingeht. Gebunden an IGF-I potenziert es dessen Wirkung, als freies Molekül dagegen hemmt es das Wachstum (Baxter et al., 1998). Es wird unter dem positiven Einfluss von Wachstumshormon und IGF in der Leber synthetisiert.

Das restliche zirkulierende IGF-I geht vor allem mit IGFBP-1 und -2 Komplexe ein, die mit einem Molekulargewicht von 30 – 40 kDa deutlich kleiner sind (Hardouin et al., 1989).

Das IGFBP-2 weist die zweithöchste Konzentration der IGFBP im Serum auf und besitzt dabei eine höhere Affinität zu IGF-II als zu IGF-I. Gebildet wird es hauptsächlich in Leber und Niere, hohe Spiegel an IGF und Wachstumshormon wirken sich hemmend auf die Synthese aus. Erhöhte Werte findet man bei vermehrt katabolen Prozessen, wie bei Nahrungskarenz, chronischem Nierenversagen und im Alter (Hirschberg und Kaysen, 1995).

IGFBP-1 wird vorwiegend in der Leber und Niere Insulin-abhängig produziert, so wird die Synthese durch hohe Insulin- und Wachstumshormonspiegel gehemmt (Suikkari et al., 1988). Aufgrund seiner geringen Größe ist es dem IGFBP-1, möglich IGF durch intaktes Gefäßendothel zu transportieren. Zudem besitzt es IGF-unabhängige mitogene Effekte (Jones et al., 1993).

2.4 Effekte des Wachstumshormons auf den Knochenstoffwechsel

2.4.1 Allgemein

Man kann zwei verschiedene Typen der Knochenbildung unterscheiden, die desmale Ossifikation und die chondrale Ossifikation.

Wird Knochen direkt aus mesenchymalen Bindegewebe ohne knorpelige Zwischenstufe gebildet, spricht man von der primären bzw. desmalen Knochenbildung. Sie ist verantwortlich für die Entstehung des Geflechtknochens.

Die chondrale Ossifikation (sekundäre Ossifikation) beschreibt Umbauvorgänge am Knochen, bei denen hyaliner Knorpel als Ausgangsmaterial und Platzhalter für das Längenwachstum dient. Man unterscheidet die perichondrale und die enchondrale Ossifikation. Wobei die perichondrale Ossifikation einer desmalen Ossifikation entspricht und für die Entstehung des Knochenmantels verantwortlich ist. Die enchondrale Ossifikation findet zwischen der Epiphyse und der Diaphyse in den Epiphysenfugen statt und hat ein Längenwachstum der Röhrenknochen zur Folge.

Die Knochenmasse eines Körpers wird sowohl durch das Knochenwachstum, als auch durch den ständigen Knochenumbau bestimmt. Während das Knochenwachstum, das hauptsächlich aus der Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten in den Wachstumsfugen resultiert, am Ende der Pubertät mit dem Schluss der Epiphysenfugen abgeschlossen ist, handelt es sich beim Knochenumbau um einen lebenslang dauernden Prozess.

Das Wachstumshormon hat direkte und indirekte Effekte auf die Chondrozyten und stimuliert sowohl das Knochenwachstum, als auch den Knochenumbau (Ohlsson et al., 1998).

2.4.2 Effekte von Wachstumshormon und IGF auf das Längenwachstum

Das Zielgewebe des postnatalen Längenwachstums sind die Wachstumsfugen (Epiphysenfugen) der langen Röhrenknochen. Die in den Epiphysenfugen liegenden Chondrozyten werden u.a. unter dem Einfluss von Wachstumshormon zur Proliferation und Differenzierung angeregt und ordnen sich anschließend säulenförmig an. Die verschiedenen Differenzierungsstufen der Chondrozyten spiegeln sich in den einzelnen Zonen der Epiphysenfugen wider.

2.4.2.1 Anatomie

Zu den langen Röhrenknochen werden Humerus, Radius und Ulna, Femur, Tibia und Fibula sowie die Ossa Metacarpalia und Metatarsalia gezählt.

Jeder dieser Röhrenknochen kann topographisch in fünf Abschnitte gegliedert werden: die gelenknahen Epiphysen sind über die Epiphysenfugen mit der Metaphyse und der Diaphyse verbunden. Die Epiphysenfuge kann in verschiedene horizontale Zonen, die sich aus den unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Chondrozyten zusammensetzen, unterteilt werden.

2.4.2.2 Enchondrale Ossifikation

In der Ruhezone der Epiphysenfuge liegen die Chondrozyten ruhend und in diffuser Anordnung und dienen so der Verankerung an der Epiphyse. Die an die Ruhezone angrenzenden Chondroblasten teilen sich in der Proliferationszone in hoher Geschwindigkeit in Richtung Markhöhle. Aufgrund der räumlichen Begrenzung durch die Knochenmanschette beginnen sich die proliferierenden Zellen säulenartig in

Längsrichtung anzuordnen (Zone des Säulenknorpels). In der benachbarten Blasenzone verlieren die Knorpelzellen langsam ihre Fähigkeit zur Teilung und nehmen durch Flüssigkeitsaufnahme stark an Größe zu, während ihre Interzellulärsubstanz zu verkalken beginnt. Die Kalzifizierung wird in der anschließenden Verknöcherungszone fortgesetzt und abgeschlossen. Einsprießende Blutgefäße ermöglichen es Chondroklasten, in die Eröffnungszone einzuwandern, um dort den Knorpel aufzulösen. Ebenso über die Blutgefäße eingewanderte Osteoblasten lagern sich an bereits verkalkte Knorpelreste an und scheiden Osteoid ab, das später ebenfalls verkalkt.

2.4.2.3 Schluss der Epiphysenfugen

Mit dem Abschluss des Längenwachstums nimmt die Teilungsgeschwindigkeit der Knorpelzellen langsam ab, während der von der Epiphyse und Metaphyse ausgehende Knorpelabbau durch Chondroklasten weiter fortschreitet. Sobald die in die Epiphyse einsprießenden Blutgefäße den Kern der Epiphyse erreicht haben, verschwindet der Epiphysenfugen-Knorpel unter knöcherner Verschmelzung von Epiphyse und Diaphyse.

2.4.2.4 Wachstumshormon und Längenwachstum

Verschiedene Hormone wie Schilddrüsenhormone, Glucocorticoide und Sexualhormone sind zusammen mit dem Wachstumshormon verantwortlich für das postnatale Längenwachstum, wobei das Wachstumshormon zu den wichtigsten Regulatoren gezählt wird. Es stimuliert das Wachstum des Epiphysenfugen-Knorpels durch Proliferation der Chondrozyten.

1985 wird die Somatomedin-Hypothese durch Green et al. zur sogenannten Dual-Effektor-Theorie ergänzt, indem sie an Adipozyten und deren Vorstufen eine unterschiedliche Wirkung von Wachstumshormon und IGF auf die verschiedenen Entwicklungsstadien der Zellen nachweisen konnten. Während das Wachstumshormon

die Vorstufe Präadipozyten stimulierte, beeinflusste IGF-I erst die spätere Entwicklung der Adipozyten (Green et al., 1985; Zezulak und Green, 1986).

Isakson et al. (1987) untersuchten die Erkenntnisse der Dual-Effektor-Theorie auch am Modell der Wachstumsfuge. Sie nahmen an, dass die proliferative Wirkung des Wachstumshormons auf die Chondrozyten des Stratum Germinativum vor allem durch die Induktion der lokalen IGF-II Synthese vermittelt wird. Gleichzeitig stimuliert das Wachstumshormon die lokale Produktion des IGF-I, das vor allem die Hypertrophie der Knorpelzellen in der Zone des Säulenknorpels bewirkt (Ohlsson und Vidal, 1998).

2.4.3 Effekte des Wachstumshormons auf den Knochenumbau und den Erhalt der Knochenmasse

Die Knochenmasse beschreibt die Menge an mineralisiertem Knochen, die ein Körper besitzt. Sie reichert sich im Laufe des Wachstums sehr schnell an, bleibt dann physiologischerweise konstant, wobei sie mit steigendem Alter langsam abnimmt.

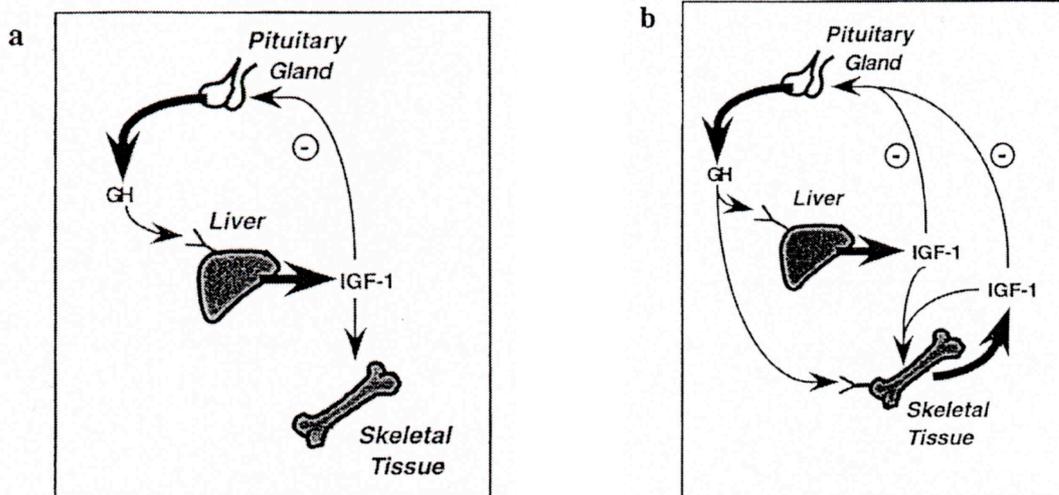
Knochenumbau ist ein kontinuierlicher, lebenslanger Prozess, der aus der Knochenformation durch Osteoblasten und der Knochenresorption durch Osteoklasten resultiert. Physiologischerweise sind diese Vorgänge ausbalanciert, so dass sich die Knochenmasse sowie ihr Mineralisierungsgrad kaum verändert. Verlust an Knochenmasse stellt sich ein, sobald diese Balance gestört ist, wie z.B. bei postmenopausaler Osteoporose, oder beim Wachstumshormonmangel.

2.4.4 In vitro Effekte des Wachstumshormons auf Osteoblasten und Osteoklasten

Eine Vielzahl von in vitro Studien wurden durchgeführt, um die genauen Interaktionen des Wachstumshormons am Knochen zu untersuchen.

Wachstumshormon stimuliert sowohl die Vorläuferzellen der Osteoblasten (Kassem et al., 1994), als auch die Proliferation der Osteoblasten.

Anhand von verschiedenen Zellkulturen konnte man das Vorhandensein von Growth-Hormon-Rezeptoren (GHR) auf Osteoblasten nachweisen (Slootweg et al., 1996). Da man durch die Inkubation der Zellkulturen mit Serum eine Reduktion der GHR-Anzahl beobachten konnte, suchte man die dafür verantwortlichen Faktoren und fand heraus, dass IGF-I und IGF-II die Anzahl der GHR abhängig von Dosis und Dauer reduzieren (Slootweg et al., 1995). Mit der Abnahme der GHRs, ging auch die proliferative Eigenschaft des Wachstumshormons auf die Osteoblasten stark zurück (Slootweg et al., 1996). Diese Wirkweisen von IGF und Wachstumshormon sind Teil eines negativen Feedbacks der GH / IGF-Achse. Leung et al. nahmen an, dass die Wirkung von Wachstumshormons und IGF auf verschiedene Gewebe durch drei unterschiedliche Feedback- Mechanismen gesteuert wird (Leung et al., 1996).

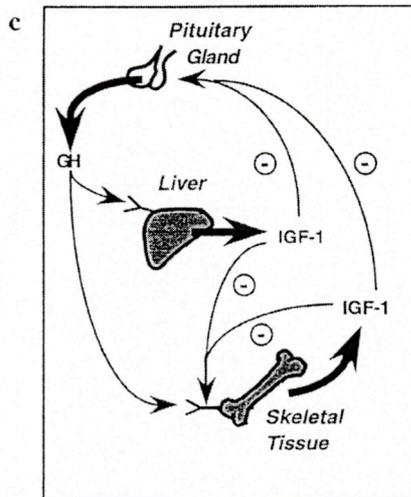


a. Der klassische negative Feedback-Mechanismus.

Entsprechend der Somatomedin-Hypothese führt das Wachstumshormon zum Knochenwachstum, indem es die IGF-I Synthese in der Leber stimuliert. Das in der Leber gebildete, zirkulierende IGF-I hemmt die Wachstumshormon-Sekretion in der Hypophyse.

b. Modifizierter klassischer negativer Feedback-Mechanismus.

Zusätzlich zu der IGF-I Synthese in der Leber stimuliert Wachstumshormon auch eine lokale IGF-I Synthese im Knochen. Sowohl das hepatische als auch das extrahepatische IGF-I hemmt die Wachstumshormon-Sekretion aus der Hypophyse.



c. Der periphere negative Feedback-Mechanismus.

Das durch den Einfluss des Wachstumshormons lokal im Knochen produzierte IGF-I hemmt die Wirkung des Wachstumshormons am Knochen, indem es zu einer Abnahme der Wachstumshormon-Rezeptoren führt.

Abbildung 4: Das Zusammenspiel von IGF-I und Wachstumshormon bei der Regulation des Knochenstoffwechsels wird durch drei verschiedene Feedback-Mechanismen kontrolliert (Leung et al., 1996)

Nishiyama et al. konnten sowohl direkt durch Wachstumshormon als auch indirekt über IGF-I eine vermehrte Proliferation der Osteoklasten nachweisen (1996). IGF stimuliert nicht nur die Formation der Osteoklasten, sondern steigert auch deren Aktivität (Mochizuki et al., 1992). Die Effekte von IGF-I werden auch durch die von den Osteoblasten produzierten IGFBP gesteuert. So hemmen IGFBP-3 und -4 die proliferative Wirkung, während IGFBP-5 sie unterstützt (Schneider et al., 2002; Jones und Clemmons, 1995).

Man geht davon aus, dass die lokale IGF-Produktion ein großer Bestandteil der Regulation des Knochenumbaus ist, da IGF sowohl den Knochenaufbau als auch den Knochenabbau beeinflusst, da das von den Osteoblasten gebildete IGF wiederum die Proliferation der Osteoklasten stimuliert (Hill et al., 1995).

Wachstumshormon beeinflusst somit auf direkten und indirekten Weg den Knochenumbau, indem es sowohl die Osteoblasten-, als auch die Osteoklasten-Aktivität erhöht.

2.5 Störungen des Wachstumshormonstoffwechsels

2.5.1 Hypersomatotropismus (Akromegalie)

1.5.1.1 Allgemein

Akromegalie entsteht fast immer durch einen gutartigen Tumor der Hypophyse (primäre Akromegalie), der vermehrt und unkontrolliert Wachstumshormon ausschüttet. In seltenen Fällen wird eine sekundäre Akromegalie beschrieben. Hier ist die Ursache für die vermehrte Wachstumshormon-Sekretion eine übermäßige Produktion von GHRH durch einen Tumor des Hypothalamus, wodurch es an der Hypophyse zur Hyperplasie der Wachstumshormon-produzierenden Zellen kommt. Tritt der GH-Überschuß während des Wachstums und somit vor dem Schluss der Epiphysenfugen auf, so entwickelt sich ein Hochwuchs (Gigantismus). Ohne eine frühzeitige Behandlung können beim

Menschen Größen bis zu 270 cm erreicht werden. Durch die gesteigerte GH-Produktion werden sowohl die anabolen, als auch katabolen Effekte des Wachstumshormons verstärkt. Charakteristisch für Akromegalie sind ein übermäßiges Wachstum der Phalangen, des Jochbeins, des Kinns und der Nase, sowie Organomegalien von Zunge, Herz, Leber, Darm und anderen inneren Organen. Aufgrund der zunächst diskreten äußerlichen Veränderungen kommt es meist erst mehrere Jahre nach Beginn der Erkrankung zur Diagnose. Je nach Größe des Hypophysenadenoms treten Beschwerden wie Sehstörungen, Kopfschmerzen und Störungen der Sensibilität aufgrund der Kompression benachbarter Strukturen auf. Werden zudem endokrin aktive Zellen der Hypophyse komprimiert, hat dies Regulationstörungen anderer Hypophysenachsen zur Folge. Folgeerkrankungen der Akromegalie sind Bluthochdruck, Herzerkrankungen, Niereninsuffizienz, Gelenkserkrankungen und insulin-resistenter Diabetes mellitus. In Folge reduziert sich die Lebenserwartung beim Menschen um circa 10 Jahre.

Akromegalie ist in der Veterinärmedizin eine seltene Erkrankung, die aber sowohl bei Hunden als auch bei Katzen beschrieben wird. Die Ätiologie des Wachstumshormon-Exzesses ist bei Katze und Hund allerdings sehr unterschiedlich, so dass beide Tierarten getrennt voneinander betrachtet werden.

2.5.1.2 Akromegalie der Katze

Die Akromegalie der Katze ist der des Menschen sehr ähnlich (Struble und Nelson, 1997). Ursache für die Akromegalie ist wie beim Menschen ein Hypophysen-Adenom, das Wachstumshormon unkontrolliert in hohen Mengen ausschüttet. Obwohl Akromegalie bei der Katze eine seltene Erkrankung ist, ist sie dennoch von großer Bedeutung, da alle erkrankten Katzen Störungen im Glukosestoffwechsel aufweisen und fast immer einen Insulin-resistenten Diabetes mellitus entwickeln (Eigenmann et al., 1984 a, b, Peterson et al., 1990, Goossens et al., 1998). Diabetes Mellitus gehört zusammen mit Hyperthyreose zu den beiden häufigsten endokrinen Erkrankungen bei der Katze.

Verursacht durch die anabolen Effekte des erhöhten GH-Spiegels kommt es zu einem übermäßigen Knochenwachstum an Extremitäten und Gesichtsschädel, sowie zu Organomegalien, vor allem von Leber, Herz, Darm und Zunge. Die katabole Wirkung des Wachstumshormons, verursacht durch die insulin-antagonistische Wirkung von IGF-I, führt aufgrund eines Postrezeptordefekts zu einem insulin-resistenten Diabetes mellitus (Rosenfeld et al., 1982). Hyperinsulinämie und Hyperglykämie bewirken eine Downregulation der Insulinrezeptoren und führen so zu einer Glukoseintoleranz (Feldmann und Nelson, 2000).

An Akromegalie erkranken vor allem männliche Katzen in einem Alter zwischen acht und 14 Jahren. Die häufigsten Gründe für das Vorstellen des Tieres beim Tierarzt sind Symptome des Diabetes mellitus wie Polydypsie, Polyurie, Polyphagie und im fortgeschrittenen Stadium ZNS Störungen wie Stupor, Somnolenz und Verhaltensänderungen aufgrund des Tumorwachstums. Zusätzlich zum Diabetes mellitus treten Veränderungen aufgrund der anabolen Wirkung des Wachstumshormons auf. Neben einer steigenden Körpergröße wird ein übermäßiges Wachstum von Kopf und Abdomen und ein steigendes Körpergewicht besonders deutlich. Das erhöhte Körpergewicht in Verbindung mit einem Diabetes mellitus, der normalerweise mit vermehrt katabolen Effekten einhergeht, ist ein wichtiges Indiz für Akromegalie. Im weiteren Krankheitsverlauf entwickeln die Tiere degenerative Arthropathien, Prognatia inferior und Organomegalien, vor allem von Herz, Niere, Leber und Zunge (Feldmann und Nelson, 2000).

Zu den wichtigsten Folgeerkrankungen der Wachstumshormon-Überproduktion zählen bei der Katze neben dem Insulin-resistenten Diabetes mellitus, die hypertrophe Kardiomyopathie und die Niereninsuffizienz, beides die häufigsten Todesursachen im Verlauf der Akromegalie.

1.5.1.3 Akromegalie des Hundes

Akromegalie ist auch beim Hund Folge einer exzessiven GH-Produktion (Rijnberk et al., 1980). Im Gegensatz zu Mensch und Katze, bei denen ein Hypophysen-Adenom für die hohen GH-Spiegel verantwortlich ist, wird beim Hund entweder durch endogenes Progesteron während der Lutealphase des Zyklus oder durch exogenes Progesteron zur Läufeigkeitsunterdrückung der GH-Exzess ausgelöst und wurde bisher nur bei weiblichen Tieren diagnostiziert (Eigenmann et al., 1983). Diese Progesteron-induzierte GH-Produktion hat ihren Ursprung nicht in der Hypophyse, sondern im hyperplastischen Duktusepithel der Brustdrüse (Selman et al., 1994; Van Garderen et al., 1997). Im Gegensatz zur physiologisch pulsatilen GH-Sekretion der Hypophyse ist die GH-Ausschüttung der Brustdrüse kontinuierlich (Watson et al., 1987).

Nach Absetzen des exogenen Progesterons bzw. nach einer Ovariohysterektomie kommt es sofort zum Absinken des Wachstumshormon-Spiegels. In diesem Zusammenhang fand man heraus, dass eine suprahypophysäre Stimulation mit GHRH oder mit dem α -adrenergen Agonisten Clonidin keinen Effekt auf den Wachstumshormon-Spiegel hat. Auch das inhibitorische Somatostatin hatte keinen Einfluss auf die erhöhten Wachstumshormon-Werte (Watson et al., 1987; Selman et al., 1991). Die Wachstumshormon-Sekretion erscheint autonom, wie bei einem Hypophysen-Adenom. Es konnte allerdings bei keinem an Akromegalie erkrankten Hunde ein Tumor gefunden werden (Selman et al., 1994).

Gegen das Vorhandensein eines Wachstumshormon-produzierenden Tumors spricht auch das Absinken des Wachstumshormon-Spiegels, sobald das exogene Progesteron abgesetzt wird. Die Beteiligung der Hypophyse konnte durch eine Hypophysektomie ausgeschlossen werden (Selman et al., 1994). Bei der Untersuchung verschiedener Gewebe auf den Wachstumshormon-Gehalt fanden Selman et al. heraus, dass die Brustdrüse des Hundes den höchsten Wachstumshormon-Spiegel aufweist.

Die Annahme, dass das überschüssige Wachstumshormon in der Brustdrüse produziert wird, wurde durch eine Blutuntersuchung bestätigt. Selman et al. entnahmen Blut

sowohl aus der Brustvene als auch aus der Brustarterie eines Hundes und verglichen die Wachstumshormon-Spiegel. Das Blut der Brustvene zeigte 3mal höhere Wachstumshormon-Werte auf als das der Arterie. Eine Mammektomie lässt den erhöhten Wachstumshormon-Spiegel beim Hund schnell auf Normwerte absinken (Selman et al., 1994).

Charakteristisch für den Zyklus der Hündin ist die lange Dauer der Lutealphase, die im Gegensatz zu den meisten anderen Säugetieren vergleichbar ist mit der Dauer der Trächtigkeit (Edqvist et al., 1975). Die lang anhaltend hohen Progesteron-Werte während der Gelbkörperphase können bei der Hündin für das Entstehen einer Akromegalie verantwortlich sein. Kooistra et al. (2000 a) haben die pulsatile GH-Ausschüttung während der Lutealphase gesunder Beagle Hündinnen untersucht und dabei festgestellt, dass sich sowohl Basalwerte als auch Amplitude während der Lutealphase änderten. Als Ursache dafür sahen Kooistra et al. die partielle Suppression des hypophysären Wachstumshormons durch das mammäre Wachstumshormon. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass das Wachstumshormon der Brustdrüse physiologischerweise während jedem Zyklus der Hündin gebildet wird.

Das mammäre Wachstumshormon stimuliert direkt sowie indirekt über die lokale Produktion von IGF-I die Proliferation und Differenzierung des Drüsengewebes und ist somit verantwortlich für Mammogenese und Lactogenese (Mol et al., 1997). Direkt nach der Geburt weist das Kolostrum 100-1000mal höhere Wachstumshormon-Spiegel auf als das maternale Plasma. Dieses Wachstumshormon wird aber wahrscheinlich vom Neugeborenen nicht ins Blut aufgenommen, sondern wirkt lokal stimulierend auf die Entwicklung des Darms (Schoenmarkers et al., 1997).

Die Produktion von mammärem Wachstumshormon wurde auch bei Katzen im Zusammenhang mit einer Progesteron-induzierten fibroadenomatösen Hypertrophie der Brustdrüse beobachtet (Mol et al., 1995). Da es allerdings nicht in den Blutkreislauf gelangt, ist das mammäre Wachstumshormon bei der Katze nicht verantwortlich für die Ausbildung einer Akromegalie (Peterson et al., 1987).

2.5.1.4 Diagnose der Akromegalie

Zur Diagnose der Akromegalie stehen verschiedene Laborparameter zur Verfügung.

Bestimmung der GH-Konzentration

Zwar ist die Erhöhung der GH-Konzentration die Ursache für die Akromegalie. Aufgrund der physiologischerweise pulsatischen Ausschüttung eignet sich eine Einzelbestimmung des GH-Gehaltes im Blut allerdings nur mäßig (Rijnberk und Mol, 1997). Da allerdings sowohl Frequenz, als auch Amplitude im Falle der Akromegalie erhöht sind (Barkan et al., 1989), wird in Verbindung mit Symptomen der Akromegalie auch die Erhöhung eines Einzelwertes als positiv angesehen (Peterson et al., 1990; Feldmann und Nelson, 2000).

GH-Suppressionstest (Glukosetoleranz-Test)

Besser geeignet als eine GH-Einzelbestimmung ist die Untersuchung des GH-Sekretionsverhaltens anhand eines Glukosetoleranz-Test (Rijnberk und Mol, 1997). Hier werden beim Tier intravenös, beim Menschen oral Glukose verabreicht und anschließend die GH-Konzentration im Blut kontrolliert. Physiologisch ist eine Suppression der GH-Sekretion zu erwarten, während ein Ausbleiben der Suppression für eine autonome Sekretion im Sinne einer Akromegalie spricht (Chang-DeMoranvill und Jackson, 1992). Die Aussagekraft dieses Tests wurde durch eine Studie in Frage gestellt, indem ein Ausbleiben der Suppression auch bei gesunden Katzen nachgewiesen wurde (Kokka et al., 1971).

Bestimmung der IGF-Konzentration

Die IGF-Konzentration im Blut spiegelt die GH-Sekretion der letzten 24 Stunden wider (Hartman et al., 1990) und ist somit sowohl bei Katzen, als auch bei Hunden deutlich besser zur Diagnose geeignet als eine Einzelbestimmung des GH-Spiegels (Eigenmann et al., 1984; Middleton et al., 1985; Abrams-Ogg, 1993).

Die Eignung von IGF zur Akromegalie-Diagnose bei der Katze wurde jedoch durch Lewitt et al. 2000 in Frage gestellt. In ihrer Studie wiesen sie bei an Diabetes mellitus erkrankten Katzen erhöhte IGF- und IGFBP-Konzentrationen nach, wobei keine der Katzen Anzeichen einer Akromegalie hatte. Daraufhin untersuchten Starkey et al. (2004) die IGF-Konzentrationen von 42 Katzen mit Diabetes mellitus, wobei sie entsprechend der Dauer der Insulin-Therapie in drei Gruppen eingeteilt wurden. Die IGF-Messungen ergaben bei der Gruppe 1 (Kurzzeit-Insulin-Therapie) signifikant niedrigere IGF-Werte und bei der Gruppe 2 (Langzeit-Insulin-Therapie) signifikant höhere Werte als bei der Kontrollgruppe. Aufgrund dieser Ergebnisse, scheint die Bestimmung der IGF-Konzentration bei der Katze mit Langzeit-Insulin-Therapie nicht sinnvoll zu sein (Lewitt et al., 2000; Starkey et al., 2004).

Bildgebende Verfahren

Die Kernspintomographie ist in der Humanmedizin die Methode der Wahl zur Diagnose eines Hypophysen-Adenoms. Mit der Kernspintomographie gelingt es, sowohl Mikroadenome (<10mm) nachzuweisen, als auch beim Vorliegen eines Makroadenoms (>10mm), die Beeinträchtigung der benachbarten Strukturen zu beurteilen.

Röntgenologisch kann man je nach Krankheitsstadium Organomegalien, degenerative Arthropathien sowie Spondylosen der Wirbelkörper nachweisen. Im fortgeschrittenen Stadium einer Kardiomyopathie liegt häufig ein Lungenödem vor.

Weiterführende Laboruntersuchung

Häufige Laborveränderungen sind Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, Hyperphosphatämie, Azotämie und Hypercholesterinämie. Bei der Urinuntersuchung liegt fast immer eine Glukosurie und sehr häufig eine Proteinurie vor.

2.5.1.5 Therapie der Akromegalie

Da in der Tiermedizin die symptomatische Therapie der Folgeerkrankungen, wie Niereninsuffizienz, Herzinsuffizienz und Diabetes mellitus im Vordergrund steht, wird im Folgenden nur kurz auf die Therapiemöglichkeiten der Humanmedizin eingegangen.

Das Ziel der Akromegalie-Therapie ist es den Tumor der Adenohypophyse chirurgisch zu entfernen, mittels Radiotherapie zu zerstören oder medikamentell unter Kontrolle zu bekommen. Als Therapie der ersten Wahl gilt in der Humanmedizin die mikrochirurgische transphenoidale Tumorentfernung. Bis zu einer Tumorgöße von 1 cm (Mikroadenom) können 61% aller Patienten durch diese Operation dauerhaft geheilt werden (Sheaves, 1999). Die Erfolgsrate ist allerdings mit steigender Tumorgöße rückläufig. Da es sich bei 70% der diagnostizierten Hypophysentumore um Makroadenome (>1 cm) handelt, ist die Adenomektomie oft ungeeignet (Gittoes et al., 1999). Zu den häufigsten postoperativen Komplikationen gehören die Insuffizienz der Adenohypophyse und der Diabetes insipidus.

Die Radiotherapie ist die Methode der Wahl bei Patienten, bei denen ein operativer Eingriff kontraindiziert ist und eine medikamentelle Behandlung ohne Erfolg war (Ferone et al., 2000). Die besten Erfolge werden bei einer Bestrahlung in den ersten beiden Jahren erzielt. Auftretende Komplikationen, wie Neuritis des Nervus opticus sowie großflächige Nekrosen des umliegenden Gewebes, konnten durch neuere Techniken stark reduziert werden. Allerdings hat die Bestrahlung der Hypophysen-Hypothalamus-Region in mehr als 50% der Fälle eine Insuffizienz der Hypophyse zur Folge (Wass, 1997). Nach einer Radiotherapie stellt sich der Erfolg erst langsam ein. So sinkt der GH-Spiegel jährlich um ca. 28% in den ersten fünf Jahren, danach jährlich um ca. 16% (Feek et al., 1984).

Zur medikamentellen Behandlung der Akromegalie stehen verschiedene Wirkstoffe zur Verfügung. Bisher wurden vor allem Dopamin-Agonisten wie Bromocriptin und Cabergolin und Somatostatin-Analoga zur Therapie der Akromegalie eingesetzt. Seit 2004 ist Pegvisomant, ein Wachstumshormon-Rezeptorblocker auf dem Markt.

2.5.2 Hyposomatotropismus (Wachstumshormonmangel)

2.5.2.1 Allgemein

Der Begriff Wachstumshormon-Mangel (growth-hormone-deficiency: GHD) bedeutet, dass die Hypophyse zu wenig oder kein Wachstumshormon produziert. Man unterscheidet einen angeborenen von einem erworbenen GH-Mangel. Klinisch auffällig werden Säuglinge mit einem angeborenen GH-Mangel im zweiten Lebensjahr durch ein deutliches Absinken der Wachstumsgeschwindigkeit (Dattani et al., 2004). Als Gründe für den Kleinwuchs in Folge von GH-Mangel gibt es neben der fehlenden bzw. verminderten GH-Sekretion noch die Möglichkeit der Synthese von biologisch inaktivem Wachstumshormon.

Die Ursachen für den Wachstumshormon-Mangel werden wie folgt eingeteilt:

- Genetisch bedingter Hyposomatotropismus: isolierter Wachstumshormon-Mangel, kombinierte HVL-Insuffizienz
- Idiopathischer Hyposomatotropismus: isolierter Wachstumshormon-Mangel, kombinierte HVL-Insuffizienz
- Neurosekretorische Dysfunktion: Fehlbildung/ Erkrankung des ZNS, biologisch inaktives Wachstumshormon

Die Bezeichnung „idiopathisch“ bedeutet, dass zwar ein GH-Mangel nachgewiesen werden konnte, allerdings weder eine genetische, noch eine organische Ursache dafür vorliegt. Diese Form des GH-Mangels ist die häufigste und wird in 30 - 60% als Folge von Schweregeburten beobachtet. Der häufigste Grund für einen erworbenen GH-Mangel stellt die Bestrahlung von Tumoren im Kopfbereich dar (Saggese et al., 1998). Das bei Kindern häufig vorkommende Kraniopharyngeom wird entweder operativ entfernt oder lokal bestrahlt. Die dabei entstehenden Läsionen der Hypothalamus-Hypophysen-Region haben nicht selten Störungen der GH-Sekretion zur Folge (Ranke et al., 2000).

Je nach Alter bzw. Entwicklungsstadium hat der GH-Mangel verschiedene Auswirkungen. Das klinische Bild des angeborenen bzw. in der Kindheit erworbenen GH-Mangels ist geprägt durch das verlangsamte und reduzierte Längenwachstum. Ohne Therapie erreichen die Kinder nur 70% ihres Wachstumspotentials (Dattani et al., 2004).

Tritt der GH-Mangel erst im Erwachsenenalter auf, bleibt dies oft lange aufgrund der unscheinbaren Symptome wie reduzierte Muskelmasse, Müdigkeit, Fettansammlung am Rumpf, unerkant (Salomon et al., 1994). Eine retrospektive Studie mit GHD-Patienten zeigte ein erhöhtes Aufkommen von kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung mit einer signifikant erhöhten Sterblichkeitsrate (Rosén et al., 1998). Eine darauffolgende Untersuchung ergab ein erhöhtes Vorkommen von Arteriosklerose bei ansonsten symptomfreien GHD-Patienten (Markussis et al., 1992).

Verschiedene Studien mit GHD-Patienten zeigten einen erniedrigten Mineralisierungsgrad (bone mineral content: BMC) des Knochens (Johansson et al., 1992; Rosén et al., 1993). Rosén und Wuster konnten entsprechend bei GHD-Patienten ein deutlich erhöhtes Frakturrisiko nachweisen (Rosén et al., 1997; Wuster, 2000).

Die Diagnose des Wachstumshormon-Mangel wird aufgrund fehlender bzw. ungenügender Antwort auf Provokationstests gestellt (Hindmarsh et al., 1995).

Bei der GH-Therapie von GHD-Patienten wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt: in Kurzzeitstudien (6-18 Monate) konnte man entweder keine Änderung (Beshyah et al., 1995) bzw. sogar eine Reduktion der bone mineral density (BMD) feststellen (Holmes et al., 1995; Degerblad et al., 1995). Da sowohl die Marker für die Knochenformation als auch die für die Resorption erhöht in Serum und Urin nachgewiesen werden konnten, ging man davon aus, dass der Knochenstoffwechsel insgesamt durch das Wachstumshormon erhöht ist.

Johansson et al. zeigten 1996 während einer Langzeitstudie mit GHD-Patienten, dass während einer Dauer von sechs Monaten die BMD zwar deutlich abnimmt, er bei einer anhaltenden GH-Therapie aber anschließend signifikant ansteigt (Clanget et al., 2001).

Wuster gelang 2000 der Nachweis, dass mit dem Ansteigen der BMD auch das Frakturrisiko deutlich abnimmt.

In der Tiermedizin wird ein Wachstumshormonmangel ausschließlich beim Hund beobachtet. Unterschieden werden der angeborene (hypophysärer Zwergwuchs) und der erworbene Wachstumshormonmangel des adulten Hundes.

2.5.2.2 Angeborener Wachstumshormonmangel des Hundes (Hypophysärer Zwergwuchs)

Der angeborene GH-Mangel beim Hund ist sehr selten und kommt hauptsächlich beim Deutschen Schäferhund als autosomal rezessive Erbkrankheit vor (Andresen et al., 1974). Früher wurde als Ursache für den GH-Mangel die Druckatrophie des hormonproduzierenden Drüsengewebes durch hypophysäre Zysten angesehen (Müller-Peddinghaus et al., 1980). In neueren Untersuchungen von zwergwüchsigen Welpen konnten zwar Zysten der Hypophyse nachgewiesen werden, allerdings waren diese so klein, dass sie nicht für die Atrophie der Hypophyse verantwortlich sein konnten (Willeberg et al., 1975; Kooistra et al., 1998; Hamann et al., 1999). Man geht daher davon aus, dass als Ursache für den Zwergwuchs eine Differenzierungsstörung während der Embryonalentwicklung der Adenohypophyse vorliegt. Da von dieser Entwicklungsstörung nicht nur die somatotropen Zellen der Adenohypophyse betroffen sind, handelt es sich meist um einen kombinierten Hormonmangel, der neben der Wachstumsretardierung auch noch Störungen der Schilddrüse, der Nebennieren und der Gonaden aufweist (Ramsey et al., 1997).

Klinisch auffällig werden die Welpen mit einem Alter von drei Monaten durch den Wachstumsrückstand gegenüber den Wurfgeschwistern. Mit steigendem Alter wird ein Stagnieren der Fellentwicklung deutlich. Das sogenannte Babyfell, das durch ein Fehlen des Deckhaares gekennzeichnet ist, bleibt bestehen. Im weiteren Verlauf entwickelt sich eine bilateral symmetrische Alopezie, vor allem an Hals und Oberschenkeln sowie eine Hyperpigmentierung und Atrophie der Haut. Die weiteren Symptome sind abhängig von

den zusätzlich betroffenen Hormonachsen. Während das Allgemeinbefinden zunächst ungestört ist, zeigen die betroffenen Hunde nach ein bis zwei Jahren zunehmende Apathie und haben eine durchschnittliche Lebenserwartung von nur zwei bis sieben Jahren.

Die Diagnose des GH-Mangels wird zum einen über das klinische Bild im Vergleich zu den Wurfgeschwistern gestellt. Zum anderen stehen mehrere Laborparameter zur Verfügung, wie z.B. die Bestimmung des GH-, bzw. IGF-I-Spiegels sowie verschiedene Stimulationstests. Kooistra et al. (2000 b) untersuchten die Funktion der Hypophyse an acht Deutschen Schäferhunden mit hypophysärem Zwergenwuchs im Vergleich zu gesunden Beagles anhand eines four-Releasing-Hormon-Tests. Die Hunde erhielten über Venenverweilkatheter vier verschiedene Releasing-Hormone (CRH, GHRH, GnRH sowie TRH). Anschließend wurde in Abständen von fünf bis zehn Minuten Blut genommen, um den Verlauf von ACTH, FSH, LH, Prolaktin, GH und TSH zu verfolgen.

Neben dem Wachstumshormon waren auch die basalen Hormonwerte von TSH und Prolaktin signifikant niedriger als bei den gesunden Beagles und reagierten nicht auf die Stimulation. Bei FSH stellten Kooistra et al. zwar geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der basalen Werte fest, auf die Releasing-Hormone reagierten aber weder die weiblichen noch die männlichen Tiere. LH wies ebenso niedrige Basalwerte auf, reagierte aber auf die suprahypophysäre Stimulation mit einer leichten Erhöhung, während sich ACTH weder in den Basalwerten noch im Stimulationsverhalten von der Kontrollgruppe unterschied (Kooistra et al., 2000 b).

Therapie und Prognose

Eine Therapie mit porzinem, bovinem oder humanem Wachstumshormon führt zur Normalisierung des Fells und Besserung des Allgemeinbefindens, ein Größenwachstum ist nicht zu erwarten. Neuere Untersuchungen zeigen gute Erfolge mit exogenen Progesterongaben, die zu einer vermehrten GH-Produktion in der Mamma führen (Knottenbelt und Herrtage, 2002).

2.5.2.3 Erworbener Hyposomatotropismus des Hundes

Eine Rasseprädisposition für den erworbenen GH-Mangel liegt beim Chow Chow, Eurasier, Zwergspitz, Pudel sowie beim Samojeden vor. Die betroffenen Tiere zeigen ausschließlich dermatologische Veränderungen. Klinisch auffällig werden die vorwiegend männlichen Tiere häufig vor dem dritten Lebensjahr durch Verlust des Deckhaares und Zurückbleiben der Sekundärhaare (Babyfell). Im weiteren Verlauf zeigen die Hunde zunehmende Alopezie vor allem an Hals, Ohren, Rumpf und Innenseite der Oberschenkel, sowie Hyperpigmentierung und Atrophie der Haut (Schmeitzel, 1990; Schmeitzel und Lothrop, 1990).

Rijnberk et al. untersuchten die GH- und IGF-I-Konzentrationen im Blut von zwei Schäferhunden mit angeborenem GH-Mangel im Vergleich zu zwei Pudeln mit erworbenem GH-Mangel. Alle Hunde zeigten niedrige GH-Spiegel, wobei die der Schäferhunde sogar unter der Nachweisgrenze lagen. Während die IGF-Konzentrationen der beiden Pudel den physiologischen Werten gesunder Pudel entsprachen, waren sie bei den beiden Schäferhunden stark erniedrigt. Rijnberk et al. kamen zu dem Schluss, dass die GH-Werte der Hunde mit erworbenen Hyposomatotropismus zwar unter den Normwerten liegen, der GH-Spiegel aber dennoch ausreichend für die Stimulation der IGF-Synthese ist (Rijnberk et al., 1993).

Die Diagnose des erworbenen GH-Mangels beim Hund erfolgt über das klinische Bild der Hautveränderungen und der Bestimmung der Blutspiegel von Wachstumshormon und IGF. Zur Therapie eignet sich wie beim angeborenem GH-Mangel die Verabreichung von Wachstumshormon bzw. exogenem Progesteron.

2.6 Bedeutung des Wachstumshormons im Tiermodell Maus

2.6.1 Allgemein

Verschiedene Tiermodelle wurden im Laufe der Zeit entwickelt, um die Auswirkungen einer supraphysiologischen GH-Serumkonzentration auf verschiedene Organsysteme des Körpers *in vivo* zu untersuchen. Zunächst erreichte man die erhöhten GH-Spiegel, indem man hypophysektomierten bzw. intakten Tieren in hohen Mengen exogenes Wachstumshormon injizierte (Bates et al., 1964). Anschließend entwickelte man durch die Transplantation von Hypophysentumoren ein Tiermodell mit höherer Spezifität und besserer Verträglichkeit. Die transplantierten Tumoren sezernierten hohe Mengen an Wachstumshormon unabhängig von der nativen GH-Sekretion (Tashjian et al., 1968). Heute stehen verschiedene transgene Tiermodelle zur Verfügung, die vermehrt ovines, bovines oder humanes Wachstumshormon synthetisieren und dabei die gleichen Veränderungen aufweisen wie GHRH-transgene Tiere mit einer übermäßigen endogenen GH-Synthese (Mayo et al., 1988). Im Gegensatz dazu sind die Auswirkungen bei humanGH (hGH)-transgenen Tieren nicht vergleichbar mit einer endogenen GH-Erhöhung, da hGH sowohl an GHR, als auch an Prolaktin-Rezeptoren bindet. Der Phänotyp der hGH-transgenen Tiere entspricht somit einem Hypersomatotropismus in Kombination mit einer Hyperprolaktinämie (Bartke et al., 1994 a).

Die GH-Überexpression führt zu einem Anstieg des IGF-I Spiegels und stimuliert so auf direktem und indirektem Weg das Körperwachstum. GH-transgene Mäuse besitzen gegenüber Kontrolltieren eine Erhöhung der adulten Körpergröße um 30 - 100%, entwickeln multiple Organomegalien und weisen eine deutliche Reduktion des Körperfettes auf (Palmiter et al., 1982; Bartke et al., 1994 b). Die Veränderungen der transgenen Mäuse, z.B. hinsichtlich Körpergröße und Organomegalien, sind vergleichbar mit dem klinischen Erscheinungsbild der Akromegalie (Ulshen et al., 1993).

Rollo et al. (1996, 1997) sahen als Ursache für die verschiedenen Auswirkungen des GH-Exzesses eine Beeinflussung des Energie-Haushaltes. Sie zeigten anhand einer

Studie, dass GH-transgene Mäuse deutlich schneller an Gewicht zunahmten als die Kontrolltiere, obwohl sie gleiche bzw. geringere Mengen Futter pro Gramm Körpergewicht zu sich nahmen. Die GH-transgenen Tiere wiesen eine deutlich bessere Futtermittelverwertung auf und reduzierten zusätzlich ihren Energieverbrauch durch verlängerte Schlafphasen und durch weniger Bewegung während der Wachphasen (Rollo et al., 1997). Da weiterführende Untersuchungen ergaben, dass die Mäuse eine unproportional hohe Menge an Energie für das Wachstum benötigen, gingen Rollo et al. (1997) davon aus, dass Störungen in der Reproduktion und eine reduzierte Lebenserwartung GH-transgener Tiere Folgen eines Energiedefizites sind. Diese Annahme konnte durch eine Erhöhung der Energieaufnahme mit einhergehender Verbesserung der Reproduktion und Verlängerung der Lebenserwartung bestätigt werden (Rollo et al., 1996, 1997).

Die Lebenserwartung der GH-transgenen Tiere scheint umgekehrt proportional zu den GH-Serum Spiegeln zu sein (Bartke et al., 1998; Wolf et al., 1993).

Eine weitere Möglichkeit, die physiologische Rolle des Wachstumshormons in vivo zu untersuchen, bietet die Zucht von Knockout Mäusen, bei denen gezielt z.B. die Expression von GH-Rezeptoren ausgeschaltet wird (Zhou et al., 1997). Homozygote GHR-Knockout Mäuse weisen ein physiologisches Geburtsgewicht auf, entwickeln postnatal jedoch sehr schnell einen deutlichen Wachstumsrückstand gegenüber Kontrolltieren und erreichen nur etwa 50% des Adultgewichtes. Entsprechend den physiologischen Wirkweisen von IGF-I und Wachstumshormon besitzen die Knockout Mäuse zusätzlich einen erhöhten Fettgehalt sowie einen reduzierten Knochenstoffwechsel (Zhou et al., 1997).

2.6.2 Die Effekte des Wachstumshormons auf den Knochenstoffwechsel

Knochenmasse, Knochengröße sowie Knochendichte sind bei GHD-Mäusen verringert und steigen erst im Laufe einer GH-Therapie langsam an. Entsprechend besitzen GH-transgene Mäuse eine erhöhte Knochenmasse und –größe. Wolf et al. (1991) stellten bei adulten GH-transgenen Mäusen einen disproportionalen Gigantismus fest, indem der Femur nur eine mäßige Zunahme der Knochenlänge und –breite zeigte, während die Zunahme am Radius überproportional groß zum Körpergewicht und zur Körpergröße war. Sandstedt et al. (1996) entdeckten eine Abhängigkeit der GH-Wirkung von den weiblichen Geschlechtshormonen, indem sie einen Anstieg des BMC bei GH-transgenen Mäusen, nicht jedoch bei ovariectomierten transgenen Mäusen feststellen konnten. Supraphysiologische GH-Spiegel scheinen an verschiedenen Regionen (Diaphyse/Metaphyse) und Kompartimenten (kortikal/trabekulär) eines Knochens abhängig vom Geschlecht unterschiedliche Wirkungen aufzuweisen. So zeigten transgene Mäuse an der Femurdiaphyse einen Anstieg des kortikalen Mineralgehaltes um mehr als 30%, wobei der Zuwachs bei den männlichen Tieren stärker ausgeprägt war, als bei den weiblichen. Insgesamt besaßen die transgenen Tiere gegenüber den Kontrolltieren einen 50% höheren Knochenmineralgehalt. Der Zuwachs der Querschnittsfläche war bei den männlichen Tieren verglichen mit den weiblichen deutlich stärker ausgeprägt, während die weiblichen Tiere eine signifikant höhere trabekuläre Knochendichte aufwiesen (Cindik et al., 2000).

2.6.3 Die Effekte des Wachstumshormons auf das Herzkreislaufsystem

Herzkreislauf-Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache im Verlauf einer Akromegalie dar (Alexander et al., 1980; Bengtsson et al., 1988). Im Anfangsstadium der Akromegalie kommt es durch den GH-Überschuss am Herzen zu einer kurzfristigen Leistungssteigerung, (Sacca et al., 1994), die allerdings im weiteren Verlauf zu einer

fortschreitende Fibrose des Myokards und so zu einer schnellen Abnahme der Herzleistung führt (Lie, 1980). Bohlooly-Y et al. (2001) untersuchten bovine GH-transgene Mäuse hinsichtlich der GH-Wirkung auf das Herzkreislaufsystem und stellten fest, dass sowohl bei den männlichen, als auch bei den weiblichen Tieren der mean arterial blood pressure (MAP) im Vergleich zu Kontrolltieren erhöht war. Die Zunahme des MAP führt schließlich zu einem steigenden peripheren Gefäßwiderstand (Bohlooly-Y et al., 2001).

2.6.4 Die Effekte des Wachstumshormons auf die Reproduktion

Sowohl bei den weiblichen, als auch bei den männlichen Tieren wird die Funktion der Gonaden hauptsächlich durch die zwei hypophysären Hormone FSH und LH gesteuert. Bei einigen Spezies spielt zusätzlich Prolaktin bei Entwicklung des Corpus Luteum eine wichtige Rolle (Bartke, 1999). Die Funktion des Ovars wird außerdem direkt über Wachstumshormon bzw. indirekt über IGF, die des Hodens über Wachstumshormon, IGF und Prolaktin beeinflusst (Bartke, 1999). Wachstumshormon beschleunigt die Entwicklung des Fortpflanzungssystems, erhöht die Anzahl der Ovulationen (Kirkwood et al., 1989) und potenziert die Wirkung der Gonadotropine auf Ovar und Hoden (Bartke et al., 1994 a, b; Gnessi et al., 1997).

Durch die Zucht von GH-transgenen Mäusen ergibt sich die Möglichkeit, die Auswirkungen eines GH-Exzesses auf die Fortpflanzung genau zu untersuchen. Sowohl die männlichen, als auch die weiblichen transgenen Mäuse weisen abhängig von der GH-Dosis eine reduzierte Fertilität, Störungen in der neuroendokrinen Steuerung der Reproduktion, sowie eine verkürzte Dauer der Fortpflanzungsfähigkeit auf (Bartke et al., 1999). Cecim et al. (1995 a, b, c) wiesen nach, dass die Fruchtbarkeit der weiblichen Tiere aufgrund ungenügend hoher Prolaktin-Spiegel reduziert ist. Die mangelhaften Prolaktin-Spiegel führen zu einer reduzierten Progesteron-Synthese des Corpus Luteum und verhindern so die Implantation und ein Fortbestehen der Gravidität. Durch exogene Progesteron-Gaben gelang es die Gravidität der transgenen Mäuse zu erhalten (Cecim et al., 1995 a, b, c).

Eine weitere auftretende Störung im GH-transgenen Tiermodell ist die Unmöglichkeit, im postpartalen Östrus gravide zu werden. Die etwa doppelt so großen Abstände zwischen zwei Würfen in Verbindung mit einer verkürzten fortpflanzungsfähigen Lebenszeit führen zu einer deutlich reduzierten Wurfanzahl während eines Mäuselebens (Bartke et al., 1999).

Cecim et al. (1995 a, b, c) konnten zusätzlich zu den hemmenden Einflüssen des GH-Exzesses auch eine positive Wirkung auf die Reproduktion feststellen, indem Wachstumshormon die Wirkung der Gonadotropine auf die Granulosazellen und das Follikelwachstum potenziert. Dies hat eine erhöhte Anzahl an Corpora Lutea auf dem Ovar zur Folge und führt so zu vermehrten Ovulationen. Zusätzlich konnten Bartke et al. (1999) bei bGH-transgenen Mäusen eine Reduktion der Apoptose- und Atresie-Rate der Follikel im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren beobachten.

Untersuchungen an GHR-Knockout-Mäusen weisen bei den weiblichen Tieren ein spätes Einsetzen der Geschlechtsreife, eine reduzierte Wurfgröße, sowie eine geringe Überlebensrate der Neugeborenen auf. Die hohe Mortalität ist auf Störungen der Mammogenese und Galactopoese aufgrund der niedrigen Wachstumshormon- und IGF-Spiegel zurückzuführen, so dass es post partum zu einer Unterversorgung der Neugeborenen kommt (Zhou et al., 1997).

Die männlichen GHR-Knockout-Mäuse sind zwar überwiegend fruchtbar, die Häufigkeit der Infertilität ist jedoch gegenüber gesunden Kontrolltieren signifikant erhöht. Außerdem zeigen diese Tiere Störungen im Begattungsverhalten sowie ein reduziertes Gewicht der primären und sekundären Geschlechtsorgane (Bartke 1999).

2.6.5 Die Effekte des Wachstumshormons auf Tumorentstehung und Tumorwachstum

Tornell et al. (1992) beobachteten in einem Versuch mit hGH-transgenen Mäusen eine erhöhte Inzidenz von Mammatumoren. In einer nachfolgenden Studie mit bGH-transgenen und Prolaktin-transgenen Tieren konnten Wennbo et al. (1997 a, b) nachweisen, dass Prolaktin für die Entstehung der Mammatumore verantwortlich ist. Da humanes Wachstumshormon nicht nur an GH-Rezeptoren, sondern auch an Prolaktinrezeptoren bindet, hat die Überexpression des hGHs ähnliche Auswirkungen wie eine Hyperprolaktinämie.

Verwendet man Tiermodelle, die bereits Tumoren aufweisen und verändert ihre GH/IGF-Achse, erkennt man eine GH/IGF-Abhängigkeit des Tumorwachstums. So besitzt ein Tumor einer GHD-Maus, verglichen mit Kontrolltieren, eine deutlich geringere Wachstumsgeschwindigkeit. Unterschiedliche Ergebnisse wurden nach einer IGF-Infusion berichtet. So berichten Butler et al. (1998) von einem vermehrten Tumorwachstum nach einer IGF-Infusion, während Gidding et al. (2000) keine Änderung der Wachstumsgeschwindigkeit feststellen konnte. Eine weitere Studie berichtet, dass sich eine IGF-Behandlung sogar positiv auf Tiere mit Tumoren auswirkt, da IGF durch anabole Eigenschaften einer Tumorkachexie entgegenwirkt (Ng et al., 1992).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Wachstumshormon zwar nicht für ein erhöhtes Risiko der Karzinogenese verantwortlich ist, aber das Wachstum vorhandener Tumoren fördert. Daher ist eine GH-Therapie bei einem bestehenden Tumor kontraindiziert (Cohen et al., 2000).

2.7 Der medizinische Einsatz des Wachstumshormons

2.7.1 Allgemein

Im Jahre 1958 gelang erstmals die erfolgreiche Therapie eines an Wachstumshormon-Mangel erkrankten Kindes mit Wachstumshormon (Raben, 1958). Damals wurde Wachstumshormon aus den Hypophysen Verstorbener isoliert. Aufgrund des hohen Infektionsrisikos wurde Wachstumshormon dieses Ursprungs zu therapeutischen Zwecken verboten. Heute wird Wachstumshormon in großen Mengen gentechnisch hergestellt und in verschiedenen Bereichen erfolgreich eingesetzt. Neben der Behandlung des Hyposomatotropismus findet Wachstumshormon aufgrund seiner anabolen Wirkweise z.B. Anwendung in der Therapie von Patienten mit schweren Brandverletzungen und Krebspatienten mit Tumorkachexie (Wilmore, 1991). Aufgrund der positiven Wirkung auf den Knochenstoffwechsel wird Wachstumshormon bzw. IGF-I auch zur Osteoporose-Therapie eingesetzt (Rosén et al., 2001).

In der Tiermedizin erfolgt vor allem in den USA der Einsatz des Wachstumshormons als Leistungsförderer zur Steigerung der Milch- und Mastleistung bei lebensmittelliefernden Tieren (Boyd et al., 1989; Bauman et al., 1985). In Europa dagegen ist der Einsatz von Hormonen als Leistungsförderer verboten.

2.7.2 Wachstumshormon zur Therapie des Hyposomatotropismus

Rekombinantes Wachstumshormon wird erfolgreich zur Therapie des Wachstumshormon-Mangels eingesetzt. Die frühzeitige Therapie von GHD-Kindern verzeichnet sehr gute Erfolge, so dass 70% der physiologischen Körpergröße erreicht werden können. Generell kann ein Größenzuwachs von 30 cm erwartet werden, wobei der Erfolg abhängig von mehreren Faktoren ist, wie z.B. Zeitpunkt des Therapiebeginns, Therapiedauer, sowie Regelmäßigkeit der Injektionen (Ranke et al., 1999; Tanaka,

2003). Zusätzlich zum Körperwachstum führt die GH-Substitution zum Ansteigen der Knochendichte und Reduktion des Körperfettes (Rosen et al., 1993). Früher wurde nach Abschluss des Körperwachstums die Therapie beendet, heute ist jedoch bekannt, dass eine GH-Therapie bei Adulten GHD-Patienten zu einer Abnahme der Herz-Kreislauf-erkrankungen, Knochenbrüche und zur reduzierten Mortalität führt (Bengtsson et al., 2000).

2.7.3 Wachstumshormon zur Therapie der Osteoporose

Das Ziel der Osteoporose-Therapie ist die Knochenresorption durch Substanzen, wie z.B. Östrogene oder Calcitonin, zu mindern und so einen Anstieg der Knochendichte sowie eine Senkung des Frakturrisikos zu erreichen. Neben der antiresorptiven Therapie besteht die Möglichkeit einer direkten Stimulation der Knochenformation durch anabol wirksame Stoffe, wie z.B. Wachstumshormon, IGF-I und Parathormon (Rosén et al., 2001).

Wachstumshormon und IGF-I spielen beide eine wichtige Rolle im Aufbau und Erhalt des Knochens. Verschiedene Untersuchungen haben ergeben, dass systemische und lokale IGF-I-Spiegel im direkten Verhältnis mit dem Mineralgehalt des Knochens stehen (Langlois et al., 1998). Die Annahme, dass Patienten mit Osteoporose ähnlich wie GHD-Patienten auf die GH-Therapie reagieren, konnte allerdings in mehreren Studien nicht bestätigt werden (Rudman et al., 1990). Als Grund für das Ausbleiben des Therapieerfolges wird die Tatsache angesehen, dass Wachstumshormon nicht nur die Knochenformation, sondern auch die Knochenresorption stimuliert. Entsprechend beobachteten auch Rosén et al. bei der GH-Therapie von über 100 Osteoporose-Patienten, dass sowohl die Knochenformationsmarker, als auch die Resorptionsmarker in Urin und Serum anstiegen. Ein weiterer Grund für einen fehlenden Therapieerfolg könnte die zu kurze Therapiedauer sein, da die Therapie häufig aufgrund starker Nebenwirkungen abgesetzt werden musste (Rosén et al., 2001). Besser in Verträglichkeit und Wirkung ist die Therapie der Osteoporose mit IGF-I. Ghiron et al. (1995) beobachteten in ihrer Studie, dass die IGF-I-Wirkung auf den

Knochenstoffwechsel stark von der Dosis abhängig ist. Die Studienteilnehmer wurden abhängig von der IGF-I-Dosis in zwei Gruppen unterteilt. Während man in der Gruppe mit hohen IGF-I-Dosen ein Ansteigen der Knochenformationsmarker und Resorptionsmarker beobachten konnte, erhöhten sich in der niedrig dosierten Gruppe nur die Formationsmarker. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass eine niedrige IGF-Dosierung (bis zu 30 mg pro Kilogramm Körpergewicht am Tag), gezielt die Knochenformation durch Stimulation der Osteoblasten fördert (Ghiron et al., 1995).

2.7.4 Wachstumshormon als Leistungsförderer

Leistungsförderer sind im Sinne des § 2 des Futtermittelgesetzes Futtermittelzusatzstoffe ohne Nährstoffcharakter.

Leistungsförderer sind Stoffe, die zu einer Minderung des Futteraufwandes bzw. der Steigerung der Leistung führen.

Da der Einsatz von Hormonen zur Steigerung der Mast- und Milchleistung in der EU nicht zugelassen ist, wird im Folgenden nur kurz auf die Rolle des Wachstumshormons als Leistungsförderer eingegangen.

Die ständige Verbesserung der Wirtschaftlichkeit ist ein wichtiges Ziel in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung. Die Wirtschaftlichkeit einer Milchkuh ist abhängig von ihrer Milchleistung und Milchzusammensetzung sowie von den Unterhaltskosten (Bauman et al., 1985). Der Einsatz von Wachstumshormon als Leistungsförderer hat eine deutliche Verbesserung der Wirtschaftlichkeit durch gesteigerte Milchleistung bei unveränderter Milchzusammensetzung und gleichzeitiger Minderung des Futtermittelfressens zur Folge. Wachstumshormon fördert die Laktogenese, indem es die Verfügbarkeit der Inhaltsstoffe in der Brustdrüse erhöht und indem es indirekt über IGF-I die Aktivität des Drüsengewebes steigert (Bauman, 1992).

Die Milchleistung steigt gleich zu Beginn der GH-Substitution deutlich an und erreicht etwa nach einer Woche ihr Maximum, wobei das Ausmaß der Leistungssteigerung abhängig von der GH-Dosis ist. In der Literatur wird berichtet, dass eine maximale

Steigerung der Milchleistung mit einer GH-Dosis von 30 - 40 mg am Tag erreicht wird (Bauman et al., 1992). Um die hohen GH-Spiegel und in Folge die gesteigerte Milchleistung aufrecht zu erhalten, ist eine tägliche Injektion nötig (Chilliard, 1988). Mittlerweile stehen auch Langzeitpräparate zur Verfügung, die subcutan verabreicht, langsam Wachstumshormon abgeben und so bei vierzehntägigen Gaben einen konstant hohen GH-Spiegel ermöglichen (Chilliard, 1988).

In der Schweinemast profitiert man von der gleichzeitig anabolen GH-Wirkung auf den Proteinstoffwechsel und den katabolen Effekten auf das Fettgewebe. Die exogene Substitution von Wachstumshormon hat erhöhte Tageszunahmen (um 13%) bei sinkender Futtermittelaufnahme (um 20%) zur Folge, wobei das Fettgewebe am Rücken um 50% abnimmt, während die Muskelmasse um 6 - 16% ansteigt (Brenner, 1990).

3. Material und Methoden

3.1 Versuchsdurchführung

Die vorliegende Arbeit besteht aus zwei verschiedenen Versuchen, die im Rahmen einer interdisziplinären Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe des Muskuloskelettalen Systems der Anatomischen Anstalt, dem Institut für Molekulare Tierzucht und Haustiergenetik und dem Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München, sowie dem Institut für Anatomie der Privaten Medizinischen Paracelsus Universität in Salzburg und der Abteilung für Molekulare Genetik des J. L. Pettis Veterans Administration Medical Center, Loma Linda, California, USA, durchgeführt wurden. Die Urinproben wurden mir tiefgefroren bei -20°C von der Anatomischen Anstalt überlassen.

Im Versuch 1 wurde mit nichtinvasiven Methoden die Auswirkung von supraphysiologischen Wachstumshormon-Spiegeln auf den Knochenmineralgehalt (DXA: Hochauflösende Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie), die Knochendichte und Knochenstruktur (pQCT: Hochauflösende periphere Computertomographie) sowie den Knochenstoffwechsel, d.h. Formation und Resorption (Knochenmarker) über verschiedene Entwicklungs- und Altersstufen bei weiblichen und männlichen Mäusen untersucht. Die Analyse der Knochenresorptionsmarker Pyridinolin und Desoxypyridinolin erfolgte am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Als Knochenformationsmarker wurde Osteocalcin im Serum bestimmt und in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. S. Mohan (J. L. Pettis Veterans Administration Hospital Medical Center, Loma Linda, USA) analysiert. Die Messungen der Knochenparameter mittels DXA und pQCT wurden an der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität in München durchgeführt.

Im Versuch 2 wurden die Auswirkungen supraphysiologischer IGFBP-2-Spiegel auf den Knochenstoffwechsel in Abwesenheit bzw. Anwesenheit einer GH-Überexpression anhand der Knochenmarker bestimmt.

3.2 Versuchstiere

Versuch 1

Im Versuch 1 wurden insgesamt 72 Mt-(Metallothionein)-bGH-transgene Mäuse im Alter von 3, 6, 9, 12, 18, 26 und 38 Wochen untersucht. Da es nicht möglich war innerhalb einer Narkose beide Messungen, DXA und pQCT, parallel durchzuführen, wurden die Tiere in zwei Gruppen aufgeteilt. Gruppe eins bestand aus insgesamt 38 Tieren, 20 weiblichen, davon 10 GH-transgene (tg F) und 10 Kontroll-Mäuse (con F) und 18 männlichen, davon 11 GH-transgene (tg M) und 7 Kontroll-Mäuse (con M).

Die zweite Gruppe setzte sich aus insgesamt 34 Tieren zusammen, bestehend aus 17 weiblichen und 17 männlichen Tieren, davon jeweils 8 GH-transgene (tg F und tg M) und 9 Kontroll-Mäuse (con F und con M).

An den Mäusen der Gruppe eins wurden die Messungen der Knochenmarker und der DXA durchgeführt, in der Gruppe zwei wurde mittels pQCT die Knochendichte bestimmt.

Versuch 2

Das Ziel des zweiten Versuchs war die Untersuchung skelettaler Veränderungen einer IGFBP-2-Überexpression im transgenen Mausmodell, sowohl in der Ab- als auch Anwesenheit einer GH-Überexpression.

Im Versuch 2 wurden insgesamt 61 Tiere im Alter von 18 Wochen untersucht, die je nach Genotyp in vier verschiedene Gruppen aufgeteilt wurden. Um die vier Gruppen zu erlangen, wurden hemizygote CMV-(Cytomegalie-Virus)-IGFBP-2-transgene Mäuse mit hemizygoten PEPCK-(Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase)-bGH-transgenen Mäusen gekreuzt (McGrane et al., 1988; Höflich et al., 2001). Die so gezüchteten Mäuse trugen entweder das IGFBP-2-Transgen (9 Weibchen und 5 Männchen), das GH-Transgen (11 Weibchen und 3 Männchen) oder beide Transgene gleichzeitig (doppeltransgen: 10 Weibchen und 8 Männchen). Die Kontrollgruppe bestand aus 8 weiblichen und 7 männlichen Tieren.

3.3 Bestimmung biochemischer Marker des Knochenstoffwechsels: Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Deoxypyridinolin

3.3.1 Prinzip

Nach saurer Hydrolyse und Vorreinigung über Cellulosechromatographiesäulen erfolgt die Detektion mittels Eigenfluoreszenz in einer Ionenpaar-Reversed-Phase-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie-Anlage (HPLC-Anlage).

Dieses Verfahren zur Bestimmung der Einzelkonzentrationen von Pyridinolin und Desoxypyridinolin basiert auf einem Verfahren nach Colwell et al. (1993) und Black et al. (1988) und wird an unserem Lehrstuhl seit Jahren erfolgreich eingesetzt (Wehr 1998).

3.3.2 Bestimmung

3.3.2.1 Aufschluss der Proben

25 µl Urin und 225 µl Reinstwasser werden mit 250 µl 37% Salzsäure versetzt und 16 Stunden im Trockenschrank bei 105°C sauer hydrolysiert. Im Anschluss daran gibt man zu den abgekühlten Proben 2,5 ml Waschlösung. Die Waschlösung besteht aus vier Teilen Acetonitril, einem Teil Eisessig 100% und einem Teil Reinstwasser.

Zur Vorreinigung der Urinproben wurden Chromabond Crosslinks Säulen verwendet, die bereits mit 300 mg Cellulose befüllt sind.

Der verwendete Vakuumkasten besitzt 20 Steckplätze, von denen jeder einen separaten Verschlussahn besitzt, so dass man den Durchfluss der Waschlösung und der Probe bei jeder Säule einzeln regulieren kann. Die bereits befüllten Cellulose-Säulen werden auf die verschiedenen Steckplätze des Vakuumkastens verteilt. Sobald die Säulen mit 5

ml Waschlösung konditioniert sind, gibt man die Proben auf die Säulen und verwirft den Durchlauf. Anschließend werden die Säulen mit 15-25 ml Waschlösung durchgespült, wobei die Mehrzahl der für die HPLC-Anlage störenden Salze, Aminosäuren und Chromogene entfernt werden. Die Elution von Pyridinolin und Deoxypyridinolin erfolgt mit 3-5 ml Reinstwasser. Das Eluat wird anschließend in einer Vakuumzentrifuge bei 60°C eingetrocknet. Sobald die Proben nach zirka sechs Stunden vollständig trocken sind, werden sie mit 100 µl 1%iger HFBA (Heptafluorobutyricacid) versetzt und in die für die HPLC-Anlage vorgesehenen Gefäße pipetiert.

3.3.2.2 Detektion von Pyridinolin und Desoxypyridinolin mittels HPLC

20 µl des HFBA-Probengemisches werden auf die HPLC-Trennsäule aufgetragen. Bei gleichbleibenden Betriebsbedingungen zeigen die Proben die gleiche Retentionszeit wie die externen Standards (Abbildung 5). Während des gesamten Messvorgangs werden die Proben konstant auf einer Temperatur von 8°C gehalten.

Die mobile Phase besteht aus 85% Reinstwasser, 15% Acetonitril und 0,01 mol HFBA. Der pH-Wert von 2,0 wird mit 0,1 n NaOH bzw. 1% HFBA-Lösung eingestellt. Die externen Standards eluieren reproduzierbar nach einer Retentionszeit von etwa 9 Minuten (Pyridinolin) und 11 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 Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms EZ Chrom Elite (VWR, Darmstadt).

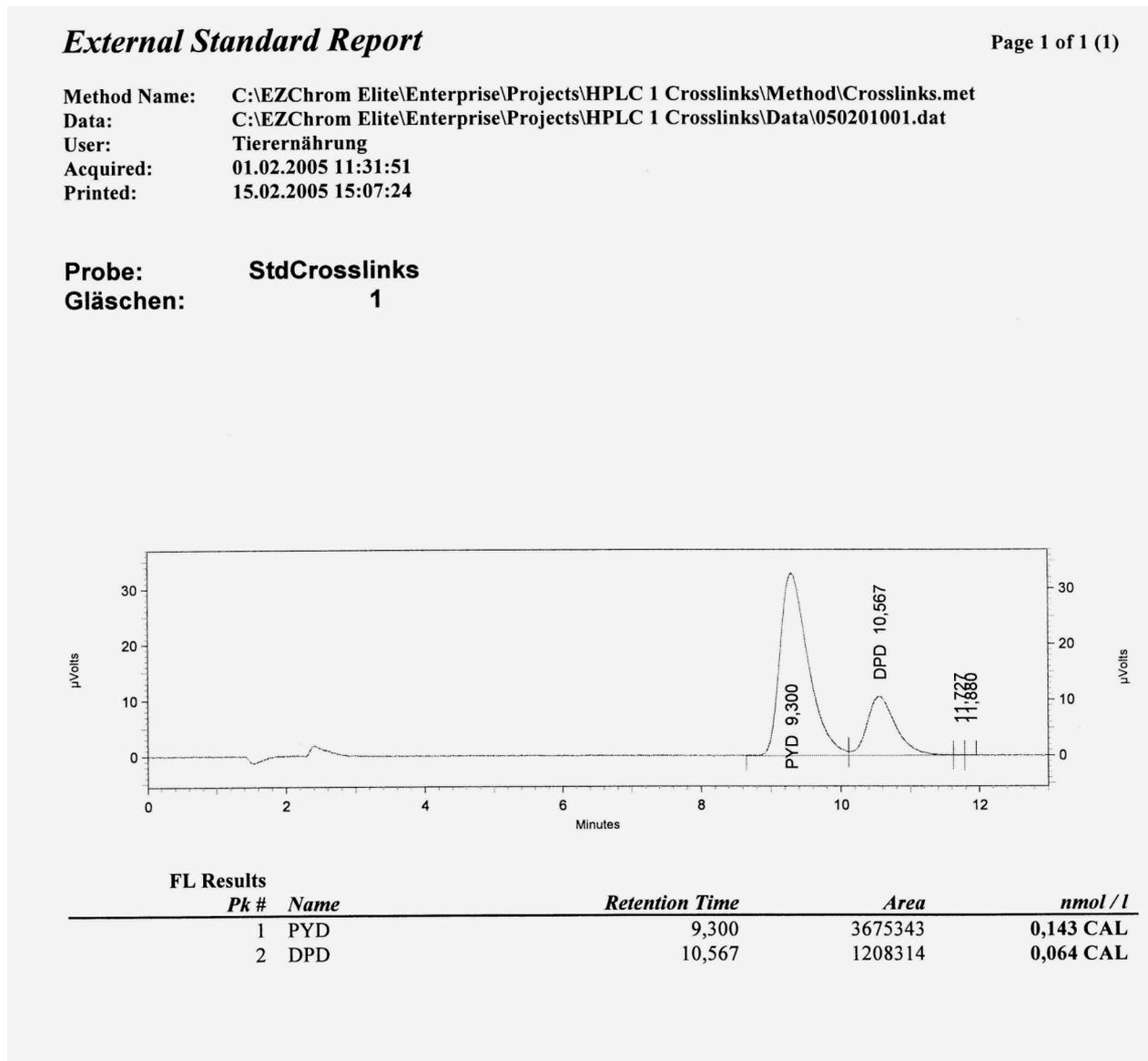


Abbildung 5: Chromatogramm: HPLC Detektion von Pyridinolin und Deoxypyridinolin

3.3.3 Kreatinin

Die Bestimmung der Kreatininkonzentration im Urin basiert auf einer modifizierten Methode nach Jaffé (1986). Hierbei bildet die alkalische Pikrinsäure zusammen mit Kreatinin einen gelben Farbkomplex. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Kreatininkonzentration im Urin und kann bei einer Wellenlänge von 490 nm photometrisch gemessen werden.

Zur Probenanalyse wurde ein Kreatinin Assay Kit der Firma Quidel®, Katalog Nr. 8009 verwendet. Die Mikrotiterplatte wird mit 190 µl Reinstwasser und 10 µl Urin belegt. Mit Hilfe von zwei weiteren Mikrotiterplatten wird eine Verdünnungsreihe erstellt, so dass in der letzten Platte der Urin in einer Verdünnung von 1:40 vorliegt. Nach Zugabe der 0,14% Pikrinsäure und einer 30-minütigen Inkubationszeit wird die Kreatininkonzentration in einem Essay Reader (Sunrise Remote, Tecan, Crailsheim) gemessen. Anschließend wurden die Ergebnisse der Collagen-Crosslinks auf die jeweiligen Kreatinin-Werte normiert.

3.3.4 Reagenzien und Material

- Salzsäure rauchend, 37 % reinst (Merck-Nr. 100314)
- Essigsäure 100 %, pro analysi (Merck-Nr. 100063)
- Millipor-Reinstwasser für Chromatographie, hauseigene Herstellung (Anlage Ultra Clear Direct, Firma SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel)
- Chromabond® Crosslinks 3 ml, 300mg, Art.-Nr. 730458
- Heptafluorobutyricacid (HBFA) (Sigma Chemical Co., Katalog-Nr. 46H3498)
- Acetonitril (Merck-Nr. 100030)

3.3.5 Apparate

- HPLC-Anlage VWR-Hitachi (Firma VWR-Hitachi, Darmstadt), Geräte der Linie Elite LaChrom
 - Chromatographiesäule, Spherisorb ODS-2-C18-2 (5 µ) 125 x 4 mit Vorsäule, Latek Labortechnik-Geräte GmbH, Eppelheim
 - Säulenofen, Jetstream 2 Plus, VWR-Hitachi (VWR-Hitachi, Darmstadt)
 - Fluoreszenzdetektor, L 2480, VWR-Hitachi (VWR-Hitachi, Darmstadt)

- Probengeber, Autosampler L2200 mit Probenkühlung, VWR-Hitachi (VWR-Hitachi, Darmstadt)
- Pumpe und Organiser L-2130 HTA-Pumpe, VWR-Hitachi (VWR, Darmstadt)

- Vakuum-Zentrifuge, Eppendorf Konzentrador 5301, Firma Eppendorf, Hamburg
- Trockenschrank Heraeus Funktion Line, Firma Kendro, Langenselbold

3.5 Statistische Auswertung

Die Darstellung in den Tabellen erfolgt als Mittelwert \pm Standardabweichung.

Im Versuch 1 wurden mit Hilfe des Student's t-Test (SPSS für Windows, Version 11.5) drei paarweise Vergleiche für jeden Messzeitpunkt durchgeführt (1: con M vs. con F; 2: tg F vs. con F; 3: tg M vs. con M). Im 2. Versuch wurde ein Wilcoxon Rangsumme Test (SPSS für Windows, Version 11.5) durchgeführt (die einzelnen Gruppen vs. Kontrolle sowie die Männchen vs. Weibchen).

4. Ergebnisse

4.1 Versuch 1

Die Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin wurden als Resorptionsmarker im Urin gemessen und zwischen der 3. und 38. Lebenswoche an sieben verschiedenen Messzeitpunkten bestimmt.

Da in den ersten neun Lebenswochen die Urinmengen der Mäuse so gering waren, dass eine individuelle Analyse nicht möglich war, wurden Sammelproben mehrerer Tiere der einzelnen genetischen Gruppen erstellt. Aus diesem Grund erfolgte von der dritten bis zur neunten Lebenswoche keine statistische Auswertung der Messergebnisse der Resorptionsmarker. Gerade in dieser Zeitspanne erscheinen die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sowohl bei Pyridinolin als auch bei Desoxypyridinolin jedoch besonders deutlich.

In allen vier Gruppen konnte ein deutliches Absinken der Pyridinolin-Ausscheidung über den Urin im Verlauf des gesamten Versuchs beobachtet werden.

Tabelle 4 zeigt bei den weiblichen Tieren von der dritten bis zur neunten Lebenswoche eine deutliche Reduktion der Pyridinolin-Exkretion. Der gemessene Pyridinolin-Wert der neunten Woche ist verglichen mit den Ausgangswerten der dritten Woche um 61% (Kontrolle) und 65% (Transgen) gesunken. Anschließend pendelten sich die Pyridinolin-Spiegel im Urin der weiblichen Mäuse langsam auf ein relativ konstantes Niveau ein. Vergleicht man die Ergebnisse des letzten Messzeitpunktes mit denen der dritten Woche, so beträgt die Pyridinolin-Ausscheidung am Ende des Versuchszeitraumes bei den weiblichen Tieren nur noch 23% (Kontrolle) und 26% (Transgen) des Ausgangswertes.

Die Ergebnisse der Tabelle 5 zeigen einen ähnlichen Verlauf der Pyridinolin-Exkretion bei den männlichen Mäusen. Wie bei den weiblichen Tieren ist auch hier die größte

Reduktion der Pyridinolin-Ausscheidung zwischen der dritten und neunten Woche zu beobachten. So sind die Pyridinolin-Werte der männlichen Mäuse in der neunten Woche gegenüber den Ausgangswerten um 56% (Kontrolle) und 64% (Transgen) gesunken. Im weiteren Verlauf fallen die Pyridinolin-Spiegel weiterhin leicht ab, erreichen zwischen der 18. und 26. Woche einen Tiefpunkt und sinken danach nicht weiter. Vergleicht man die Werte der 38. Woche mit denen der dritten Woche, so sind die Spiegel während des gesamten Versuchszeitraumes auf 26% (Kontrolle) und 33% (Transgen) der Ausgangswerte gesunken.

Tabelle 4: Mittlere Konzentrationen von Pyridinolin [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der weiblichen Mäuse

| Woche | Weibliche Tiere | |
|-----------|-------------------------|------------------------|
| | Kontrolle | Transgen |
| 3 | 1888 ± 140 ¹ | 1601 ± 55 ¹ |
| 6 | 1265 ± 131 ¹ | 880 ± 159 ¹ |
| 9 | 741 ± 92 ¹ | 558 ± 134 ¹ |
| 12 | 597 ± 105 | 502 ± 102 |
| 18 | 512 ± 90 | 477 ± 107 |
| 26 | 473 ± 76 | 440 ± 90 |
| 38 | 432 ± 100 | 424 ± 71 |

¹ Keine statistische Auswertung, da es sich um Sammelproben mehrerer Tiere handelt

Tabelle 5: Mittlere Konzentrationen von Pyridinolin [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der männlichen Mäuse

| Woche | Männliche Tiere | |
|-----------|-------------------------|-------------------------|
| | Kontrolle | Transgen |
| 3 | 1457 ± 351 ¹ | 1166 ± 224 ¹ |
| 6 | 872 ± 179 ¹ | 710 ± 72 ¹ |
| 9 | 636 ± 99 ¹ | 416 ± 111 ¹ |
| 12 | 424 ± 61 ** | 390 ± 57 |
| 18 | 425 ± 69 | 356 ± 55 |
| 26 | 399 ± 69 | 366 ± 64 |
| 38 | 407 ± 39 | 388 ± 50 |

¹ Keine statistische Auswertung, da es sich um Sammelproben mehrerer Tiere handelt

** Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$)

Desoxypyridinolin zeigte einen ähnlichen Verlauf wie Pyridinolin. Zwischen der dritten und neunten Woche kam es bei allen vier genetischen Gruppen zu einem deutlichen Absinken der Desoxypyridinolin-Exkretion.

Bei den weiblichen Tieren (Tabelle 6) sank die Ausscheidung bis zur neunten Woche um 59% (Kontrolle) und 63% (Transgen). Anschließend pendelten sich die Werte bis zur 38. Woche wie auch bei Pyridinolin auf ein relativ konstantes Niveau ein. Am letzten Messzeitpunkt erreichten die weiblichen Tiere einen Spiegel von 24% (Kontrolle) und 28% (Transgen).

Das deutliche Absinken der Desoxypyridinolin-Spiegel während der ersten neun Wochen beträgt bei den männlichen Tieren 57% (Kontrolle) und 65% (Transgen). Wie auch bei den weiblichen Tieren sank die Desoxypyridinolin-Exkretion in den folgenden Wochen nur noch langsam ab, bis sie am letzten Messzeitpunkt einen Spiegel von 28% (Kontrolle) und 34% (Transgen) verglichen mit den Werten der dritten Woche erreichte (Tabelle 7).

Tabelle 6: Mittlere Konzentrationen von Desoxypyridinolin [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der weiblichen Mäuse

| Woche | Female | |
|-----------|-----------------------|-----------------------|
| | Kontrolle | Transgen |
| 3 | 885 ± 41 ¹ | 752 ± 66 ¹ |
| 6 | 579 ± 71 ¹ | 429 ± 48 ¹ |
| 9 | 367 ± 59 ¹ | 278 ± 66 ¹ |
| 12 | 296 ± 44 | 253 ± 51 |
| 18 | 243 ± 47 | 232 ± 55 |
| 26 | 232 ± 37 | 221 ± 35 |
| 38 | 215 ± 47 | 212 ± 34 |

¹ Keine statistische Auswertung, da es sich um Sammelproben mehrerer Tiere handelt

Tabelle 7: Mittlere Konzentrationen von Desoxypyridinolin [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der männlichen Mäuse

| Woche | Männliche Tiere | |
|-----------|-----------------------|-----------------------|
| | Kontrolle | Transgen |
| 3 | 738 ± 86 ¹ | 583 ± 12 ¹ |
| 6 | 451 ± 98 ¹ | 352 ± 53 ¹ |
| 9 | 318 ± 63 ¹ | 204 ± 50 ¹ |
| 12 | 213 ± 29 ** | 194 ± 28 |
| 18 | 206 ± 38 | 169 ± 23 |
| 26 | 199 ± 35 | 178 ± 32 |
| 38 | 204 ± 29 | 196 ± 30 |

¹ Keine statistische Auswertung, da es sich um Sammelproben mehrerer Tiere handelt

** Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$)

Vergleicht man die transgenen Tiere mit den Kontrolltieren zu den jeweiligen Messzeitpunkten miteinander (Tabelle 4-7), scheint es, dass sowohl die Pyridinolin- als auch Desoxypyridinolin-Ausscheidung bei den transgenen Mäusen gegenüber der Kontrolle reduziert ist. Bei der statistischen Auswertung konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Gruppen nachgewiesen werden.

4.2 Versuch 2

Im Versuch 2 erfolgte die Bestimmung der Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin im Urin in der 18. Lebenswoche der Mäuse.

Tabelle 8 und 9 zeigen eine ähnlich hohe Pyridinolin-Ausscheidung bei den Kontrolltieren verglichen mit den IGFBP-2-transgenen Tieren sowie bei den GH-transgenen verglichen mit den doppeltransgenen Tieren.

Tabelle 8: Mittlere Konzentrationen von Pyridinolin [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der männlichen Mäuse

| | männlich |
|-------------------------|-----------------|
| Kontrolle | 76 ± 32 |
| IGFBP-2-transgen | 62 ± 8 |
| GH-transgen | 125 ± 18 |
| Doppeltransgen | 116 ± 26 |

Tabelle 9: Mittlere Konzentrationen von Pyridinolin [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der weiblichen Mäuse

| | weiblich |
|-------------------------|-------------------------|
| Kontrolle | 157 ± 37 ^a |
| IGFBP-2-transgen | 154 ± 22 ^a |
| GH-transgen | 243 ± 61 * ^b |
| Doppeltransgen | 243 ± 72 * ^a |

* Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe bei $p < 0,05$

^a Signifikanz gegenüber den entsprechenden Männchen bei $p < 0,001$

^b Signifikanz gegenüber den entsprechenden Männchen bei $p < 0,007$

Vergleicht man die Pyridinolin-Exkretion der Kontrollgruppe mit den GH-transgenen Mäusen, so scheiden die transgenen Weibchen 55% ($p < 0,05$) und die transgenen Männchen 65% mehr Pyridinolin als die entsprechenden Kontrolltiere über den Urin aus. Die Pyridinolin-Werte der doppeltransgenen Mäuse verglichen mit der Kontrollgruppe sind bei den weiblichen Tiere um 55% ($p < 0,05$) und bei den männlichen Tieren um 53% ($p < 0,05$) erhöht.

Außerdem wird in den Tabelle 8 und 9 deutlich, dass in allen vier genetischen Gruppen die Pyridinolin-Ausscheidung der weiblichen Mäuse die der männlichen übersteigt. So weisen die weiblichen Kontrolltiere gegenüber den männlichen Kontrolltieren um 107% ($p < 0,001$) höhere Pyridinolin-Werte im Urin auf. Bei den IGFBP-2-transgenen Tieren ist die Ausscheidung bei den weiblichen Tieren um 149% ($p < 0,001$), bei den GH-transgenen um 95% ($p < 0,007$) und bei den doppeltransgenen Mäusen um 110% ($p < 0,001$) gegenüber den männlichen Tieren erhöht.

Wie auch bei Pyridinolin weisen die Kontrolltiere und die IGFBP-2-transgenen Tieren sowie die GH-transgenen und doppeltransgenen Tiere eine vergleichbar hohe Desoxypyridinolin-Ausscheidung auf (Tabelle 10 und 11).

Tabelle 10: Mittlere Konzentrationen von Desoxypyridinolin [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der männlichen Mäuse

| | männlich |
|-------------------------|-----------------|
| Kontrolle | 8 ± 3 |
| IGFBP-2-transgen | 8 ± 2 |
| GH-transgen | 17 ± 3 * |
| Doppeltransgen | 21 ± 5 * |

* Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe bei $p < 0,05$

Tabelle 11: Mittlere Konzentrationen von Desoxypyridinolin [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der weiblichen Mäuse

| | weiblich |
|-------------------------|---------------------|
| Kontrolle | 14 ± 4 ^c |
| IGFBP-2-transgen | 13 ± 2 ^a |
| GH-transgen | 21 ± 5 * |
| Doppeltransgen | 22 ± 5 * |

* Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe bei $p < 0,05$

^c Signifikanz gegenüber den entsprechenden Männchen bei $p < 0,009$

^a Signifikanz gegenüber den entsprechenden Männchen bei $p < 0,001$

Vergleicht man die Werte der GH-transgenen Mäuse mit denen der Kontrollgruppe, so weisen die weiblichen transgenen Mäuse (Tabelle 11) eine Erhöhung der Desoxypyridinolin-Exkretion um 55% ($p < 0,05$), die männlichen Mäuse um 101% ($p < 0,05$) auf. Bei den IGFBP-2-transgenen Mäusen beträgt der Unterschied zur Kontrollgruppe bei den Weibchen 58% ($p < 0,05$), bei den Männchen 149% ($p < 0,05$).

Vergleichbar mit der Pyridinolin-Exkretion sind auch die Desoxypyridinolin-Werte in allen vier genetischen Gruppen bei den Weibchen höher als bei den Männchen. In der Kontrollgruppe ist die Desoxypyridinolin-Ausscheidung bei den weiblichen Mäusen verglichen mit den männlichen um 68% erhöht ($p < 0,009$). Bei den IGFBP-2-transgenen Tieren beträgt der Unterschied ebenso 68% ($p < 0,001$). Vergleicht man die Werte der GH-transgenen Tiere, so scheiden die Weibchen 27% mehr Desoxypyridinolin über den Urin aus als die Männchen. Bei den doppeltransgenen Tieren ist der Messwert der Weibchen um 6,6% gegenüber dem der Männchen erhöht.

5. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden die Effekte einer systemischen Wachstumshormon-Überexpression auf den Knochen während der ersten neun Lebensmonate anhand eines Tiermodells im Rahmen eines Lebendversuches untersucht (Versuch 1). Im 2. Versuch wurden die Auswirkungen einer IGFBP-2-Überexpression auf die Knochenresorption in An- und Abwesenheit einer GH-Überexpression an transgenen Mäusen untersucht.

5.1 Kritik der Methoden

5.1.1 Das transgene Maus-Modell

Mit Hilfe von transgenen Tiermodellen lassen sich die Effekte verschiedener Gene und ihrer Produkte auf den Knochenstoffwechsel in vivo untersuchen. Durch pronukleäre Mikroinjektion können gewünschte Gene (z.B. GH, IGF, IGFBP) fremder Spezies in die befruchtete Eizelle integriert und der Kontrolle eines unabhängigen Promotors unterstellt werden. GH-transgene Tiere zeigen eine sehr hohe endogene Produktion des Wachstumshormons, ohne dass sich hieraus immunologische Probleme wie bei der externen Gabe des Proteins ergeben.

Die bGH-transgenen Mäuse im Versuch 1 wurden mit Hilfe des Metallothionein-I-Promotors generiert und erreichten so GH-Spiegel von 100-200 ng/ml Serum, während die Kontrolltiere GH-Werte von 10 ng/ml aufwiesen. Die transgenen Mäuse wiesen zusätzlich zu den stark erhöhten GH-Spiegeln auch 1,5mal höhere IGF-I-Werte gegenüber den Kontrolltieren auf. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den GH- und IGF-I-Spiegeln zwischen den beiden Geschlechtern festgestellt werden.

Die PEPCK-bGH-transgenen Tiere im Versuch 2 wiesen GH-Serum-Spiegel von über 2000 ng/ml und gegenüber den Kontrolltieren 2-3fach erhöhte IGF-I-Serumspiegel im

Serum auf (Höflich et al., 2001). Die IGFBP-2-transgenen Mäuse wiesen sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit einer GH-Überexpression 3-9fach erhöhte IGFBP-2-Spiegel im Serum auf (Höflich et al., 1999), während die IGF-Spiegel unverändert blieben.

Da die mittlere Lebenserwartung der Mt-bGH-transgenen Mäuse mit 11 Monaten gegenüber den Kontrolltieren mit 20 Monaten deutlich reduziert ist, wurde die Langzeitstudie des Versuchs 1 nach neun Monaten abgeschlossen. Hauptursache für die verkürzte Lebensdauer sind GH-abhängige Veränderungen an den Nieren, wie z.B. die progressive Sklerosierung der Glomerula (Wolf et al., 1993; Brehm et al., 1989).

5.1.2 Bestimmung der Collagen-Crosslinks im Urin

Da Knochen ein zeitlebens dynamisches Gewebe ist, finden ständig Auf- und Abbauprozesse statt, welche durch verschiedene endogene und exogene Faktoren gesteuert werden. Da mit der Abnahme des Knochenmineralgehaltes ein Verlust der Stabilität des Knochens einhergeht, kommt diesem Zustand eine besondere Bedeutung zu. Invasive wie auch nichtinvasive Verfahren ermöglichen es, einen Überblick über den aktuellen Knochenstoffwechsel zu erhalten. Bei den nichtinvasiven Verfahren kommen bildgebende Verfahren, wie die hier verwendeten Methoden der DXA und pQCT, und die Analyse biochemischer Knochenstoffwechsel-Parameter zum Einsatz.

Da es sich im Versuch 1 um einen Lebendversuch handelte, an dem der Einfluss einer systemischen GH-Überexpression während der verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht werden sollte, wurden ausschließlich nichtinvasive Verfahren zur Untersuchung der skelettalen Veränderungen angewandt.

Dazu wurden als Knochenresorptionsmarker die beiden Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin und als Knochenformationsmarker Osteocalcin bestimmt.

Während der Kollagenreifung werden Pyridinolin und Desoxypyridinolin als Querverbindungen (Crosslinks) gebildet, wobei sie für die Stabilität und Elastizität der

Kollagenstruktur sorgen. Da diese Verbindungen fast ausschließlich im Knochen vorkommen und weder im Körper verstoffwechselt, noch über die Nahrung aufgenommen werden, gelten sie derzeit als spezifischste Parameter der Knochenresorption (Garneo und Delmas, 1999; Seibel et al., 1993). Bei der Knochenresorption werden die Kollagenmoleküle proteolytisch gespalten, so dass im Zuge der Abbauvorgänge die Quervernetzungen in die Zirkulation freigesetzt und über die Niere ausgeschieden werden. Der Nachweis im Urin erfolgt mittels einer HPLC (Eyre et al., 1984) oder mit Hilfe von Immunoassays, wobei diese nicht zwischen den beiden Crosslinks unterscheiden können (Seyedin et al., 1993).

Die Bestimmung der Collagen-Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin erfolgte in einer speziesunabhängigen Methode anhand einer HPLC und basiert auf einem Verfahren nach Colwell et al. (1993) und Black et al. (1988). Diese Methode wird am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München seit Jahren erfolgreich eingesetzt (Wehr, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine neue Methode zur Vorreinigung der Urinproben verwendet. Im Gegensatz zu bisherigen Arbeiten (Kern, 2002) wurde hier mit bereits vorgefertigten Chromatographie-Säulen gearbeitet, die mit 300 mg sehr feiner Cellulose dicht befüllt waren. Durch die relativ feste Konsistenz wurde im Gegensatz zu selbst befüllten Säulen beim Auftragen der Proben und Waschlösungen die Cellulose weder aufgewirbelt, noch kam es zum Abreißen der Cellulose. Außerdem konnte durch die Verwendung der vorgefertigten Säulen eine erhöhte Reinheit der Fraktionen erreicht werden, so dass störende Peaks reduziert und dem zufolge die Peaks der Crosslinks eindeutig identifiziert werden konnten.

5.2 Ergebnisdiskussion

5.2.1 Versuch 1

In der vorliegenden Arbeit konnte in allen vier untersuchten Gruppen des 1. Versuches ein deutliches Absinken der Konzentrationen der Knochenmarker im Urin zwischen der 3. und 38. Woche beobachtet werden. Wie in den Abbildungen 6 und 7 ersichtlich, kam es vor allem zwischen der dritten und neunten Woche zu einer dramatischen Reduktion der Pyridinolin- (Abbildung 6) und Desoxypyridinolin-Ausscheidung (Abbildung 7).

Dieser Verlauf der Knochenmarker entspricht früheren Untersuchungen, bei denen nachgewiesen wurde, dass die Exkretion der Crosslinks altersabhängig ist (Blumsohn et al., 1994). Lapillone et al. (1996) zeigten anhand ihrer Studie, dass neugeborene Kinder sehr hohe Spiegel an Crosslinks mit dem Urin ausscheiden. Im weiteren Verlauf steigert sich diese Ausscheidung der Knochenmarker, bis sie im zweiten Lebensmonat ein Peak erreicht. Anschließend sinkt die Ausscheidung der beiden Resorptionsmarker bis zum dritten Lebensjahr langsam ab (Lieuw-A-Fa et al., 1995). Während der Kindheit ist die Ausscheidung der Knochenmarker zwar verglichen mit dem Säuglingsalter relativ gering, weist aber trotzdem deutlich erhöhte Werte gegenüber dem Erwachsenenalter auf (Ranch et al., 1994).

Da in der vorliegenden Arbeit die erste Messung drei Wochen nach der Geburt durchgeführt wurde, kann daher keine Aussage über den Verlauf der Crosslink-Ausscheidung während der ersten drei Lebenswochen gemacht werden.

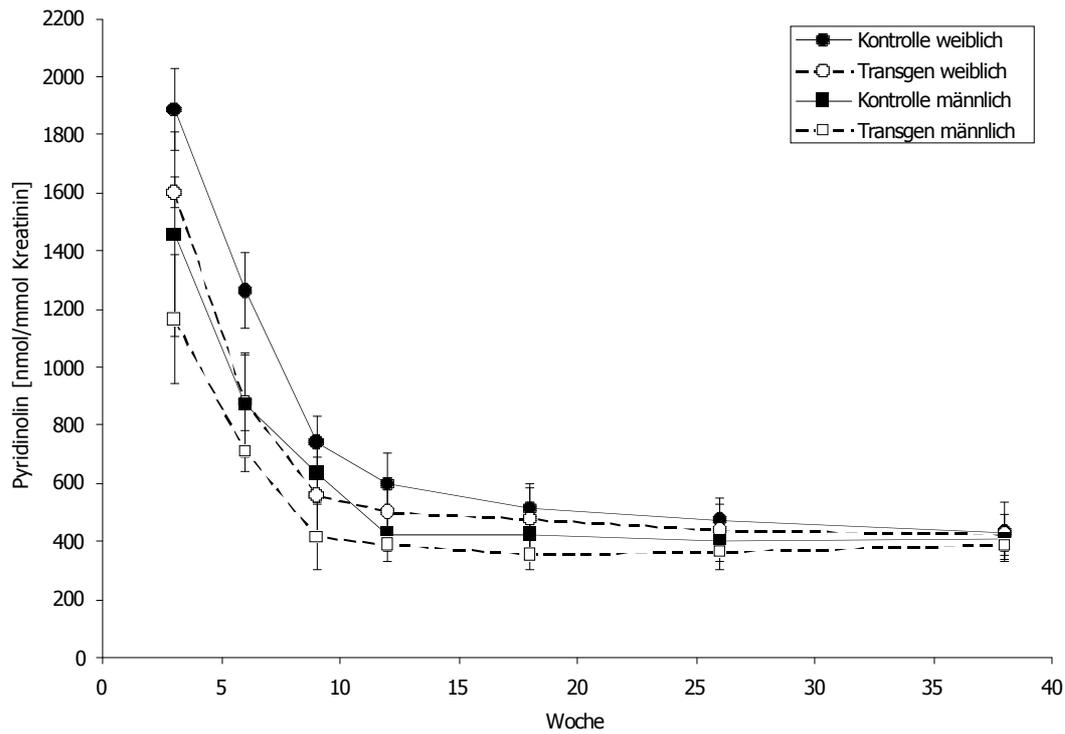


Abbildung 6: Der Verlauf der Pyridinolin-Ausscheidung [nmol/mmol Kreatinin] zwischen der 3. und 38. Lebenswoche bei allen vier Gruppen

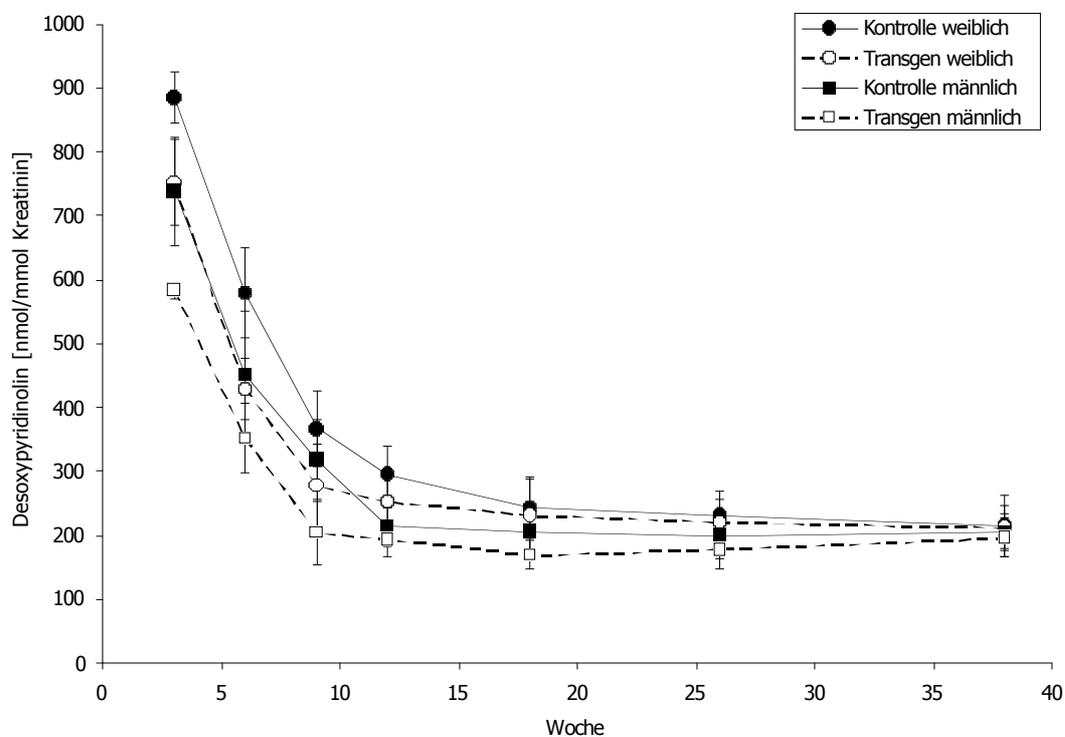


Abbildung 7: Der Verlauf der Desoxyypyridinolin-Ausscheidung [nmol/mmol Kreatinin] zwischen der 3. und 38. Lebenswoche bei allen vier Gruppen

Anhand der Abbildungen 8 und 9 lässt sich erkennen, dass während des gesamten Versuchzeitraumes sowohl bei Pyridinolin, als auch bei Desoxyypyridinolin jeweils die weiblichen Kontrolltiere die höchsten Werte im Urin aufweisen. Vergleicht man die transgenen Tiere und die Kontrolltiere untereinander, wird deutlich, dass zu jedem Messzeitpunkt die Ausscheidung der Resorptionsmarker bei den weiblichen Tieren die der männlichen übersteigt.

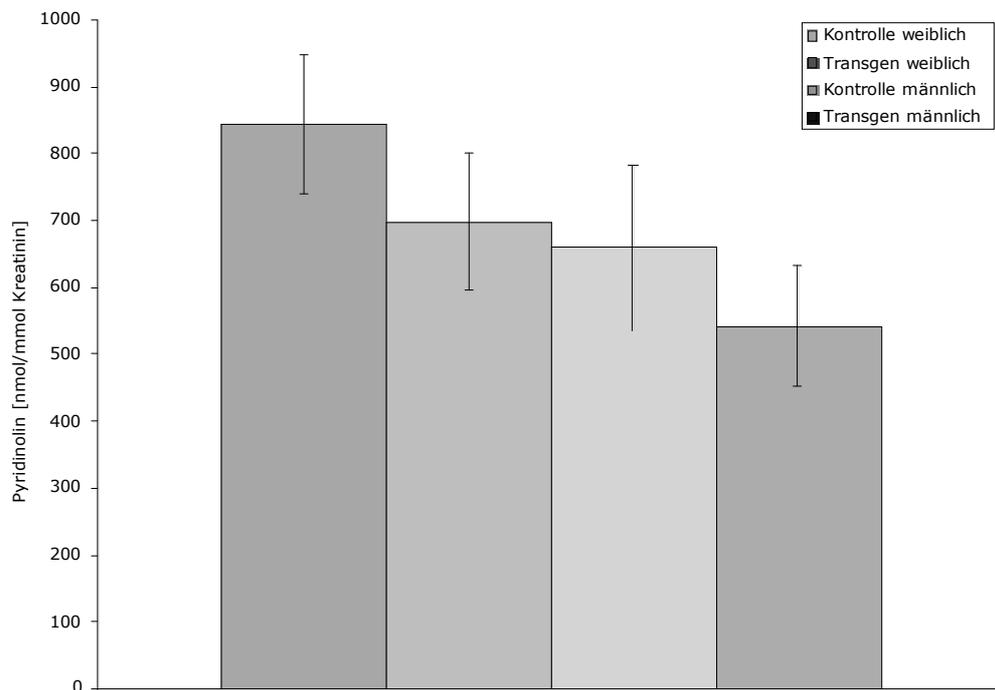


Abbildung 8: Die mittlere Pyridinolin-Ausscheidung [nmol/mmol Kreatinin] der weiblichen Tiere (Transgen und Kontrolle) im Vergleich zu den männlichen Tieren (Transgen und Kontrolle) während der ersten neun Lebensmonate

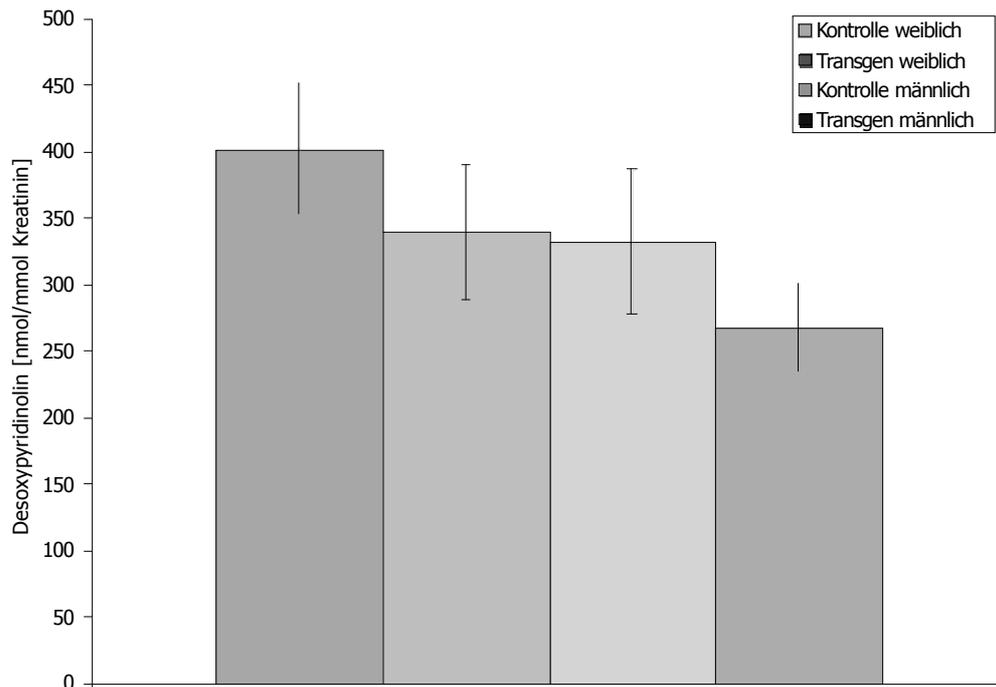


Abbildung 9: Die mittlere Desoxypyridinolin-Ausscheidung [nmol/mmol Kreatinin] der weiblichen Tiere (Transgen und Kontrolle) im Vergleich zu den männlichen Tieren (Transgen und Kontrolle) der ersten neun Lebensmonate

Die hohe Ausscheidung der Resorptionsmarker während der frühen Kindheit spiegelt den gesteigerten Knochenstoffwechsel während des Wachstums wider (Fujimoto et al., 1995).

Mora et al. (1998) konnten in einer Studie nachweisen, dass in der frühen Pubertät Mädchen eine höhere Ausscheidung der Collagen-Crosslinks aufweisen, während in der späten Pubertät Jungen höhere Spiegel besitzen. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei den Mäusen in der vorliegenden Arbeit gemacht werden. Im Unterschied zu den Ergebnissen der Studie von Mora et al., zeigten die weiblichen Mäuse über den gesamten Versuchszeitraum hinweg konstant höhere Werte in der Crosslink-Ausscheidung als die männlichen Tiere.

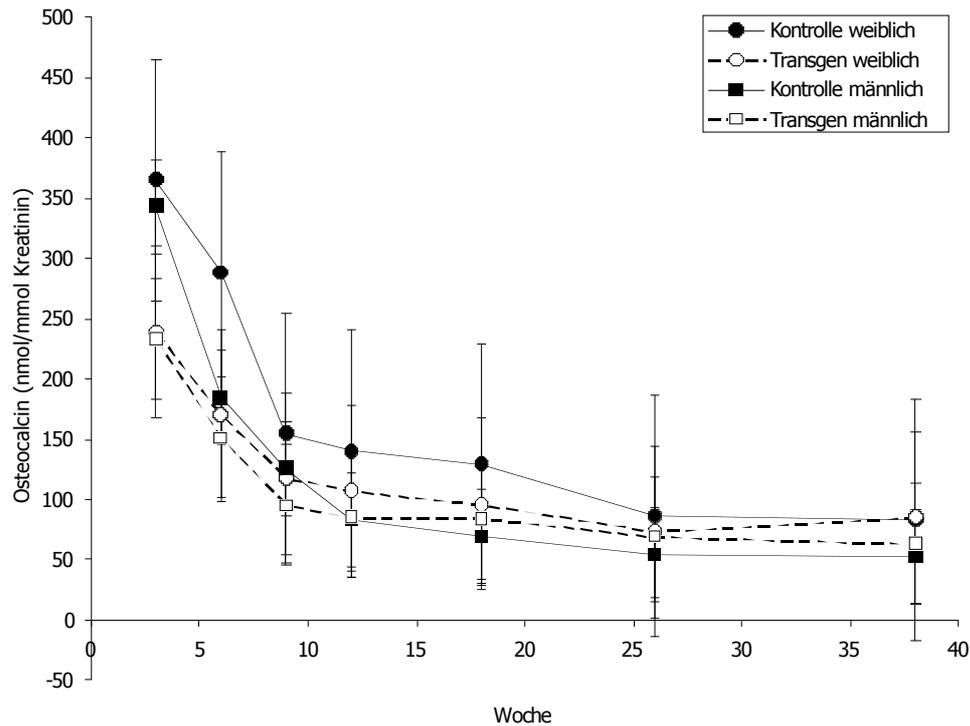


Abbildung 10: Der Verlauf der Osteocalcin-Ausscheidung [nmol/mmol Kreatinin] der transgenen Männchen und Weibchen sowie der Kontrolltiere zwischen der 3. und 38. Lebenswoche

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten außerdem eine deutliche, aber nicht signifikante Reduktion der Knochenresorptionsmarker im Urin (Abbildung 8 und 9) sowie des Formationsmarkers Osteocalcin im Serum (Abbildung 10) der GH-transgenen Tiere verglichen mit den Kontrolltieren. Dies deutet darauf hin, dass die GH-Überexpression zu einer Abnahme des Knochenstoffwechsels führt. Da allerdings nicht nur die Resorptionsmarker, sondern auch die Osteocalcin-Spiegel gegenüber den Kontrolltieren erniedrigt sind, scheinen die supraphysiologischen GH-Spiegel in diesem Versuch einen hemmenden Einfluss auf den Knochenstoffwechsel zu haben, wobei die Knochenformation gleichermaßen wie die Resorption von dieser Wirkung betroffen sind, so dass der Stoffwechsel zwar beeinträchtigt wird, jedoch nicht entgleist.

Diese Ergebnisse widersprechen somit bisher durchgeführten Untersuchungen. So konnte man in verschiedenen früheren Studien eine deutliche Steigerung des Knochenstoffwechsels als Antwort auf eine GH-Therapie bzw. GH-Überexpression beobachten. Entsprechend weisen Patienten mit Akromegalie einen erhöhten Knochenstoffwechsel aufgrund der hohen GH-Spiegel auf (Ezzat et al., 1993; Kotzmann

et al., 1993), der mit einer deutlichen Erhöhung der Formations- und Resorptionsmarker einhergeht (Kotzmann et al., 1993; Marazuela et al., 1993). Eine histomorphometrische Analyse des Knochengewebes bei Akromegalie-Patienten ergab einen signifikanten Anstieg des trabekulären und kortikalen Knochenvolumens am Beckenkamm (Halse und Gordeladze, 1981). Während eine Erhöhung der kortikalen Knochenmasse bei Akromegalie-Patienten fast immer nachgewiesen werden kann, gibt es bezüglich der trabekulären Knochenmasse häufig unterschiedliche Ergebnisse (Kotzmann et al., 1993; Sloopweg et al., 1993; Wuster, 1993).

Dagegen weisen Patienten mit einem Wachstumshormon-Mangel eine Reduktion des Knochenstoffwechsels mit einhergehender Wachstumsretardierung, Abnahme der Knochendichte und verminderte Knochenmasse auf (Ohlsson et al., 1998; Sartorio et al., 1993). Bezüglich der Knochenmarker liegen unterschiedliche Untersuchungsergebnisse vor. So wird in Verbindung mit einem GH-Mangel sowohl von einer Reduktion der Knochenmarker (Sartorio et al., 1993) als auch von erhöhten bzw. unveränderten Urin- und Serumspiegel berichtet (Balducci et al., 1995).

Im Laufe einer GHD-Therapie kommt es zu einer Erhöhung des Knochenstoffwechsels, die sich in einem deutlichen Anstieg der Knochenmarker widerspiegelt. So erreichen die Resorptions- und Formationsmarker abhängig von der GH-Dosis etwa drei bis sechs Monate nach Therapiebeginn ihr Maximum (Johannsson et al., 1996; Wollmann et al., 1995).

Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu früheren Untersuchungen könnten zum einen Unterschiede in der Ausscheidung der Knochenmarker bei Mensch und Maus sein. Zum anderen könnte die unterschiedliche Wirkung des Wachstumshormons auf den Knochenstoffwechsel je nach Entwicklungsstadium für die Ergebnisse verantwortlich sein, so dass sich im vorliegenden Versuch an wachsenden Mäusen daher die GH-Effekte von denen erwachsener Menschen unterscheiden.

Da die Knochenresorption und -formation anhand der Knochenmarker nur indirekt bestimmt werden kann, können keine endgültigen Aussagen über die tatsächliche Knochenformations- und Resorptionsrate gemacht werden. In dieser Studie wurde auf

eine histomorphometrische Analyse der Knochen verzichtet, da man die GH-abhängigen Knochenveränderungen während unterschiedlicher Entwicklungsstadien untersuchen wollte und diese Analyse nur ex vivo durchgeführt werden kann. Um den Knochenstoffwechsel der vier untersuchten Gruppen mittels Histomorphometrie zu bestimmen, hätte eine große Anzahl an Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Versuchs getötet werden müssen.

In zukünftigen Studien sollte dennoch die histomorphometrische Analyse GH-transgener Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Wachstums durchgeführt werden, um zu erfahren, ob die erniedrigten Knochenmarker tatsächlich mit einer Reduktion des Knochenstoffwechsels einhergehen.

Als weitere nichtinvasive Methoden wurden zur Beurteilung der GH-abhängigen Veränderungen der Knochendichte in dieser Studie die beiden bildgebenden Verfahren der DXA und pQCT angewandt. Während die subkortikale Knochendichte keine signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen Tieren und den Kontrollgruppen widerspiegelte, wiesen die weiblichen transgenen Mäuse zwischen der sechsten und zwölften Woche eine signifikante Erhöhung der trabekulären Knochendichte gegenüber der weiblichen Kontrollgruppe auf (Abbildung 11). Dieser Unterschied in der trabekulären Knochendichte konnte bei den männlichen Tieren nur in der sechsten Woche nachgewiesen werden.

Die unveränderte bzw. sogar erhöhte Knochendichte der transgenen Tiere gegenüber den Kontrollgruppen spricht gegen eine Reduktion des Knochenstoffwechsels als Folge der supraphysiologischen Wachstumshormon-Spiegel. Die anhand der reduzierten Knochenmarker-Ausscheidung der transgenen Mäuse angenommene Reduktion des Knochenstoffwechsels, konnte durch die Dichtebestimmung am Knochen nicht bestätigt werden. Die erhöhte bzw. unveränderte Knochendichte der transgenen Mäuse gegenüber den Kontrolltieren, lässt darauf schließen, dass der Knochenstoffwechsel nicht durch die supraphysiologischen GH-Spiegel negativ beeinflusst wird.

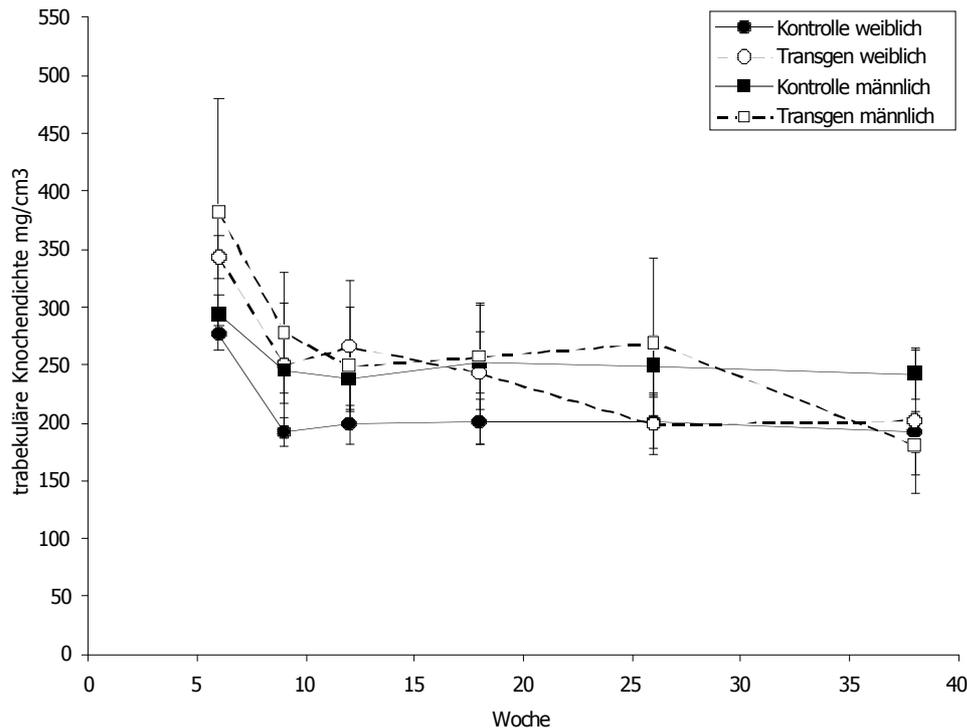


Abbildung 11: Der Verlauf der trabekulären Knochendichte der transgenen Weibchen und Männchen sowie der Kontrolltiere zwischen der 3. und 38. Lebenswoche

Die geschlechtsspezifischen Unterschiede der GH-abhängigen Veränderungen am Knochen sind auf unterschiedliche Interaktionen der Androgene und Östrogene mit dem Wachstumshormon zurückzuführen. In diesem Zusammenhang verdeutlichten Yeh et al. (1997) anhand einer Studie mit ovariectomierten und hypophysectomierten Ratten das Zusammenspiel der Geschlechtshormone mit dem Wachstumshormon, indem sie die Auswirkungen der Substitution von Wachstumshormon oder Östrogen, bzw. beiden in Kombination untersuchten. Beide Hormone einzeln verabreicht verursachten einen deutlichen Anstieg im Knochenstoffwechsel, der durch die additiven Effekte von Wachstumshormon und Östrogen bei der kombinierten Gabe noch weiter gesteigert werden konnte. Yeh et al. (1997) führten diese additive Wirkweise auf die anabole Wirkung des Wachstumshormons in Verbindung mit der antiresorptiven Wirkung des Östrogens zurück.

5.2.2 Versuch 2

Zusätzlich zu der in Versuch 1 untersuchten Wachstumshormon-Wirkung auf den Knochenstoffwechsel wurde in Versuch 2 die wachstumshemmende Wirkung des IGFBP-2 auf das Skelettsystem anhand IGFBP-2-transgener Mäuse in An- und Abwesenheit einer GH-Überexpression mit Hilfe von Knochenmarkern analysiert.

In den Abbildungen 12 und 13 wird deutlich, dass ein Zusammenhang in der Pyridinolin- und Desoxypyridinolin-Ausscheidung zwischen der Kontrollgruppe und den IGFBP-2-transgenen Tieren sowie zwischen den GH-transgenen und doppeltransgenen Tieren besteht.

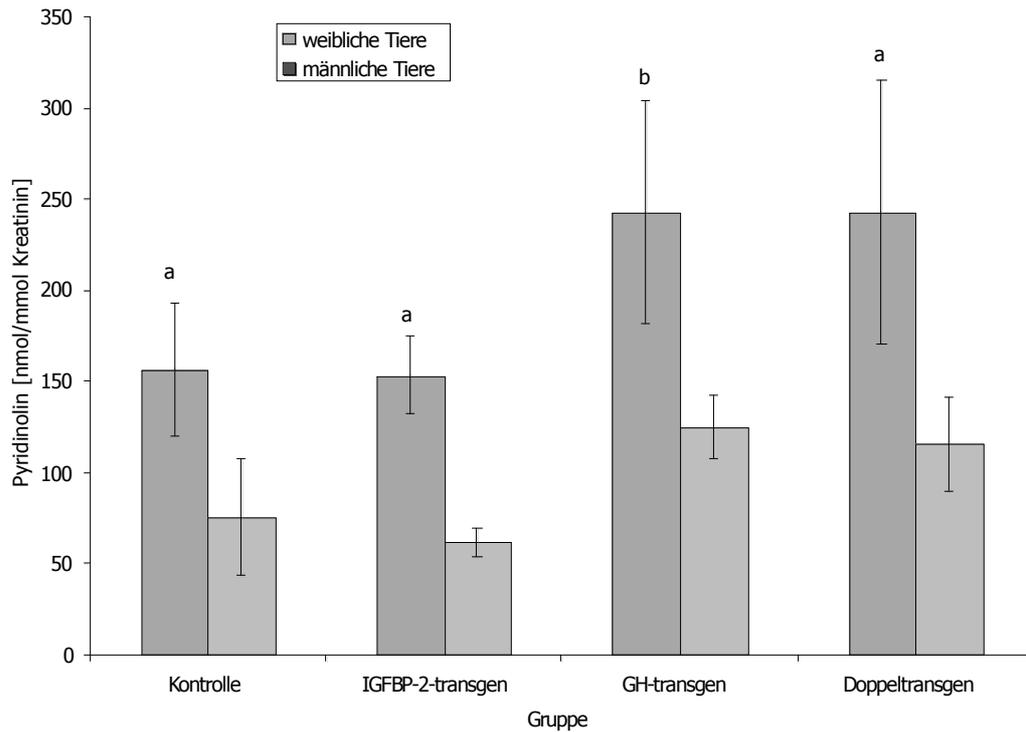
In einer Voruntersuchung zu der vorliegenden Arbeit bestimmten Eckstein et al. (2002) bei IGFBP-2-transgenen Mäusen in An- und Abwesenheit einer GH-Überexpression Parameter wie Körpergewicht sowie Knochenlänge, Knochenvolumen und Knochendichte an Tibia, Femur und Humerus im Vergleich zu Kontrolltieren. Bei den IGFBP-2-transgenen Mäusen konnten Eckstein et al. eine signifikante Reduktion des Körpergewichtes, der Knochenlänge sowie des Knochenvolumens an Femur, Tibia und Humerus nachweisen. An der Femurmetaphyse konnte außerdem eine signifikante Abnahme der Querschnittsfläche und ein signifikanter Anstieg der trabekulären Knochendichte festgestellt werden. Wie beim Wachstumshormon beobachtet, scheint auch die Wirkung der supraphysiologischen IGFBP-2-Spiegel abhängig vom Skelettabschnitt und Knochenkompartiment zu sein (Wolf et al., 1991; Eckstein et al., 2002).

Nach den Ergebnissen der jetzigen Untersuchungen, bei denen die mittlere Pyridinolin- und Desoxypyridinolin-Ausscheidung weder bei den weiblichen, noch bei den männlichen IGFBP-2-transgenen Tieren gegenüber den jeweiligen Kontrolltieren verändert ist, würde man nicht auf diese hemmenden Eigenschaften des IGFBP-2 auf das Skelettsystems schließen, da anhand der Crosslinks kein Einfluss der supraphysiologischen IGFBP-2-Spiegel auf die Knochenresorption zu beobachten ist.

Weitere Effekte einer IGFBP-2 Überexpression wurden in zahlreichen früheren in vivo und in vitro Studien untersucht. So zeigte sich die hemmende Wirkung einer IGFBP-2-Überexpression auf das Körpergewicht sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit einer GH-Überexpression (Höflich et al., 1999, 2001). Weitere Untersuchungen an einem doppeltransgenen Mausmodell haben ergeben, dass IGFBP-2 in Anwesenheit einer GH-Überexpression einen größeren Einfluss auf die Reduktion des Körpergewichtes ausübt, als bei einer physiologischen Wachstumshormon-Konzentration im Serum (Höflich et al., 2001).

Der hemmende Effekt des IGFBP-2 auf den Knochen scheint auch eine wichtige Rolle in der Entstehung einer Osteoporose zu spielen. So fanden Kim und Lee (1996) heraus, dass 14 an Osteoporose erkrankte Frauen im Verhältnis zur Gesamtkonzentration der IGFBP einen erhöhten IGFBP-2 Anteil aufweisen. Außerdem stellten Kim und Lee (1996) sowie Sugimoto et al. (1997) eine negative Korrelation der Knochendichte und des IGFBP-2-Spiegels bei Osteoporose-Patienten fest. In der Literatur werden allerdings auch widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Beteiligung des IGFBP-2 an der Entstehung einer Osteoporose genannt. So fanden Kim et al. (1999) und Johansson et al. (1997) bei an Osteoporose erkrankten Männern und Frauen keine signifikanten Unterschiede der IGFBP-2-Spiegel im Serum im Vergleich zu Gesunden.

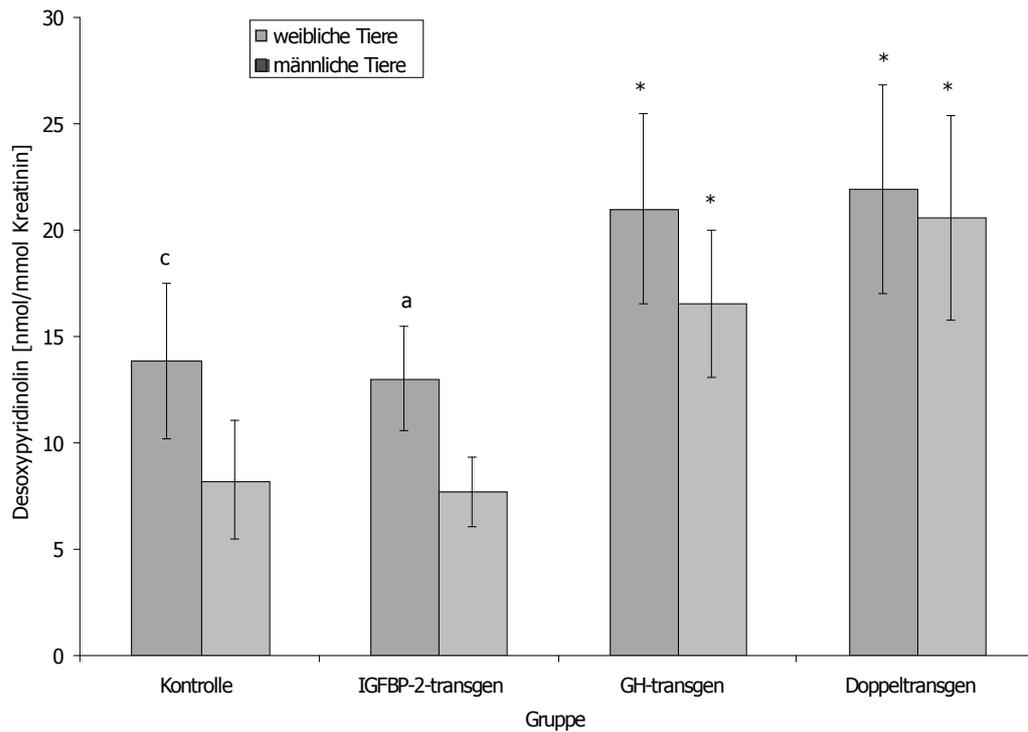
Da bei der Entstehung einer Osteoporose normalerweise ein sogenannter „high turnover“ im Knochenstoffwechsel zu beobachten ist, müsste man davon ausgehen, dass bei einer Beteiligung von IGFBP-2 am Krankheitsgeschehen der Osteoporose eine IGFBP-2-Überexpression zu einer erhöhten Crosslinks-Exkretion im Urin führt. Da in der vorliegenden Untersuchung allerdings keine erhöhte Crosslinks-Ausscheidung zu verzeichnen ist, muss man davon ausgehen, dass die supraphysiologischen IGFBP-2-Spiegel in diesem Tiermodell zu keinem „high turnover“ führen. Es ist anzunehmen, dass IGFBP-2 zu einer Hemmung der Knochenformation führt, denn nur so ist die Abnahme der Knochenmasse zu erklären (Eckstein et al., 2002), die das Ergebnis aus Knochenformation und Resorption widerspiegelt. Somit kann ein IGFBP-2-transgenes Tiermodell als Modell für Krankheiten dienen, bei denen die Knochenformation gehemmt wird.



^a Signifikanz gegenüber den entsprechenden Männchen bei $p < 0,001$

^b Signifikanz gegenüber den entsprechenden Männchen bei $p < 0,007$

Abbildung 12: Die mittleren Pyridinolin-Konzentrationen [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der Mäuse der vier verschiedenen Gruppen



* Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe bei $p < 0,05$

^c Signifikanz gegenüber den entsprechenden Männchen bei $p < 0,009$

^a Signifikanz gegenüber den entsprechenden Männchen bei $p < 0,001$

Abbildung 13: Die mittleren Desoxyypyridinolin-Konzentrationen [nmol/mmol Kreatinin] im Urin der Mäuse der vier verschiedenen Gruppen

Die Pyridinolin- und Desoxypyridinolin-Exkretion der GH-transgenen Mäuse ist gegenüber den Kontrolltieren signifikant erhöht (Abbildung 12 und 13). Die gesteigerte Ausscheidung der Resorptionsmarker spiegelt die stimulierende Eigenschaft des Wachstumshormons auf die Knochenresorption wider, die bei physiologischer Stoffwechselsituation eine erhöhte Formation nach sich zieht und so zu einem gesteigerten Knochenstoffwechsel führt (Ohlsson et al., 1998). Entsprechend dieser Beobachtungen weisen Patienten mit einem Wachstumshormonmangel während einer GH-Therapie nach drei bis sechs Monaten erhöhte Spiegel sowohl der Formationsmarker als auch der Resorptionsmarker im Serum und Urin auf (Nielsen et al., 1991; Wollmann et al., 1995). Patienten, die aufgrund einer Akromegalie erhöhte GH-Spiegel besitzen, zeigen ebenso eine gesteigerte Ausscheidung der Knochenformations- und Resorptionsmarker (Kotzmann et al., 1993). Im Rahmen des Vorversuches konnten Eckstein et al. (2002) GH-abhängige Veränderungen wie ein erhöhtes Körpergewicht, ein gesteigertes Knochenvolumen sowie eine vergrößerte Knochenlänge im Vergleich zu den Kontrolltieren feststellen.

Die doppeltransgenen Mäuse besitzen gegenüber den Kontrolltieren eine signifikant höhere Pyridinolin- und Desoxypyridinolin-Ausscheidung (Abbildung 12 und 13). Vergleicht man die Crosslink-Werte im Urin der doppeltransgenen Tiere mit denen der GH-transgenen Tiere, wird dagegen kein Unterschied deutlich. Dies deutet daraufhin, dass für die Erhöhung der Knochenresorption bei den doppeltransgenen Tieren vor allem die supraphysiologischen GH-Spiegel verantwortlich sind. Eckstein et al. (2002) konnten bei den doppeltransgenen Tieren verglichen mit der Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme des Körpergewichtes, der Knochenlänge sowie des Knochenvolumens an Femur, Tibia und Humerus feststellen. Gegenüber den GH-transgenen Tieren dagegen wiesen die doppeltransgenen Mäuse eine signifikante Reduktion des Körpergewichtes, der Körpergröße sowie der Knochenlänge auf. Außerdem konnte eine signifikante Volumenabnahme am Femur, jedoch nicht an Humerus und Tibia festgestellt werden. Bezüglich der Knochendichte konnten Eckstein et al. keine signifikanten Unterschiede zu den GH-transgenen Tiere nachweisen.

Dies deutet darauf hin, dass entgegen der Untersuchungen bezüglich der Beteiligung von IGFBP-2 an der Entstehung einer Osteoporose (Kim et al., 1996; Sugimoto et al., 1997), die IGFBP-2-Überexpression keinen negativen Effekt auf die Knochendichte hat.

Da weder zwischen der Kontrollgruppe und den IGFBP-2-transgenen Mäusen, noch zwischen den GH-transgenen und doppeltransgenen Mäusen ein Unterschied der Knochenmarker zu verzeichnen ist, lässt dies darauf schließen, dass die Knochenresorption durch die in der Literatur beschriebene wachstumshemmende Wirkung des IGFBP-2 nicht beeinflusst wird und es so zu keiner Entgleisung des Knochenstoffwechsels führt.

Wie schon im Versuch 1 beobachtet werden konnte, liegt auch im 2. Versuch die Pyridinolin- und Desoxypyridinolin-Exkretion der Weibchen in allen untersuchten Gruppen über den Messwerten der Männchen (siehe oben).

5.3 Abschließende Interpretationen

Vergleicht man die Ausscheidung der Crosslinks der GH-transgenen Mäuse aus Versuch 1 und 2, so fällt auf, dass in Versuch 1 die Ausscheidung der Crosslinks gegenüber der Kontrollgruppe reduziert ist, während im 2. Versuch die GH-transgenen Mäuse signifikant höhere Pyridinolin- und Desoxypyridinolin-Werte als die Kontrolltiere aufweisen. Verantwortlich für die scheinbar unterschiedliche Wirkung der supraphysiologischen GH-Spiegel auf den Knochenstoffwechsel bzw. auf die Knochenmarker-Ausscheidung der Mäuse ist wahrscheinlich die Verwendung zweier unterschiedlicher Mäusestämme. So wurde in Versuch 1 die Auswirkung von Wachstumshormon auf den Knochenstoffwechsel anhand von Mt-bGH-transgenen Mäusen untersucht. Im Versuch 2 dagegen wurden die Untersuchungen an PEPCK-GH-transgenen Mäusen durchgeführt, die GH-Spiegel über 2000 ng/ml Serum zeigten (McGrane et al., 1988; Höflich et al., 2001).

Zusammenfassend ist zu den Ergebnissen der beiden Versuche zu sagen, dass eine GH-Überexpression in Abhängigkeit vom verwendeten Tierstamm einen Einfluss auf die Knochenresorption ausübt, während bei IGFBP-2 keine Effekte auf die Knochenresorption nachgewiesen werden konnten. Daher ist für Untersuchungen bei

denen eine gesteigerte Knochenresorption erwünscht ist, ein GH-transgenes Tiermodell dem IGFBP-2-transgenen Tiermodell vorzuziehen.

6. Zusammenfassung

Tina Seibel

Die Bestimmung der Knochenmarker Pyridinolin und Desoxypyridinolin im Urin zur Beurteilung der Knochenresorption am transgenen Tiermodell

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Auswirkung von Wachstumshormon (Versuch 1) sowie des Insulin-ähnlichen-Bindungsprotein-2 (IGFBP-2) (Versuch 2) auf den Knochenstoffwechsel. Hierzu wurden im transgenen Mausmodell die Knochenresorptionsmarker Pyridinolin und Desoxypyridinolin im Urin bestimmt.

Im Versuch 1 wurde die Ausscheidung der Resorptionsmarker von Mt-bGH-transgenen Mäusen während der ersten neun Lebensmonate in regelmäßigen Abständen bestimmt, um so Rückschlüsse auf den Knochenstoffwechsel während der unterschiedlichen Entwicklungsstadien machen zu können.

Im Versuch 2 wurde die Auswirkung einer IGFBP-2-Überexpression auf die Knochenresorption in Ab- und Anwesenheit einer GH-Überexpression im PEPCK-bGH-transgenen Mausmodell untersucht.

Die bGH-transgenen Mäuse im Versuch 1 zeigten zu allen Messzeitpunkten eine deutliche, aber nicht signifikante Reduktion der Pyridinolin- und Desoxypyridinolin-Exkretion gegenüber den Kontrolltieren. Die verminderte Ausscheidung der Knochenresorptionsmarker über den Urin lässt auf eine Reduktion des Knochenstoffwechsels schließen.

Im Gegensatz dazu zeigten die PEPCK-bGH-transgenen Mäuse im 2. Versuch eine signifikant höhere Exkretion von Pyridinolin sowie Desoxypyridinolin, was auf eine gesteigerte Knochenresorption bei den transgenen Tieren gegenüber den Kontrolltieren hinweist.

Zusammenfassend ist zu den Ergebnissen der beiden Versuche zu sagen, dass eine GH-Überexpression in Abhängigkeit zum verwendeten Tierstamm einen Einfluss auf die Knochenresorption ausübt, während bei IGFBP-2 keine Effekte auf die Knochenresorption nachgewiesen werden konnten. Aus diesem Grund scheint für Untersuchungen bei denen eine gesteigerte Knochenresorption erwünscht ist, ein GH-transgenes Tiermodell geeigneter zu sein als ein IGFBP-2-transgenen Tiermodell.

7. Summary

Tina Seibel

Determination of the urinary bone markers pyridinoline and deoxypyridinoline for the evaluation of bone resorption in transgenic mice

Subject of the present study was to find out whether both, the growth hormone (test no. 1) as well as the insuline-like-binding-proteine-2 (IGFBP-2) (test no. 2) have any influence on bone metabolism. For this purpose, in a transgenic mouse model the bone resorption markers pyridinoline and deoxypyridinoline have been determined in the urine.

In test no. 1, the excretion of the resorption markers in the Mt-bGH-transgenic mice was determined in regular intervals during the first nine months after birth, in order to look into the bone metabolism during the different developmental stages.

In test no. 2, the effects from a IGFBP-2-overexpression on bone resorption were examined in the PEPCK-bGH-transgenic mouse model both with and without an existing GH overexpression.

In comparison to the control animals in test no. 2, the bHG-transgenic mice showed a distinct, but not significant reduction of pyridinoline and deoxypyridinoline excretion at all times. The reduced urinary excretion of the bone resorption markers indicates a reduction of bone metabolism.

Contrary to this, the PEPCK-bGH transgenic mice showed in the test no. 2 a significantly higher excretion of pyridinoline as well as of deoxypyridinoline, indicating an increased bone resorption of the transgenic mice as compared to the control animals.

In summary, the results of both tests show that depending on the examined animals a GH-overexpression has an influence on bone resorption, while in case of IGFBP-2 no

effects on bone resorption have been found. For this reason a GH transgenic animal model seems to be more appropriate than an IGFBP-2 transgenic model for studying increased bone resorption.

8. Literaturverzeichnis

Abrams-Ogg A (1993)

Acromegaly in a cat: diagnosis by magnetic resonance imaging and treatment by cryohypophysectomy.

Canadian Veterinary Journal 34, 682-685

Aschner B (1912)

Über die Funktion der Hypophyse.

Pflüger's Arch Ges Physiol, 1-146

Alexander L, Appleton D, Hall R, Ross WM und Wilkinson R (1980)

Epidemiology of acromegaly in the Newcastle region.

Clin Endocrinol 12, 71-79

Andresen E, Willeberg P und Rasmussen PG (1974)

Pituitary dwarfism in German shepherd dogs: genetic investigations.

Nord Vet Med 26, 692-701

Balducci R, Toscano V, Pasquino AM, Mangiantini A, Municchi G, Armenise P, Terracina S, Prossomariti G und Boscherini B (1995)

Bone turnover and bone mineral density in young adult patients with panhypopituitarism before and after long-term growth hormone therapy.

Eur J Endocrinol 132, 42-46

Barkan AL, Stred SE, Reno K, Markovs M, Hopwood NJ, Kelch RP und Beitins IZ (1989)

Increased growth hormone pulse frequency in acromegaly.

J Clin Endocrinol Metab 69, 1225-1233

Bartke A (1999)

Role of growth hormone and prolactin in the control of reproduction: what are we learning from transgenic and knock-out animals?

Steroids 64, 598-604

Bartke A, Brown-Borg HM, Bode AM, Carlson J, Hunter WS und Bronson RT (1998)

Does growth hormone prevent or accelerate aging?

Exp Gerontol 33, 675-687

Bartke A, Cecim M, Tang K, Steger RW, Chandrashekar V und Turyn D, (1994a)
Neuroendocrine and reproductive consequences of overexpression of growth hormone in transgenic mice.

Proc Soc Exp Biol Med 206, 345-359

Bartke A, Chandrashekar V, Turyn D, Steger RW, Debeljuk L, Winters TA, Mattison JA, Danilovich NA, Croson W, Wernsing DR und Kopchick JJ (1999)
Effects of growth hormone overexpression and growth hormone resistance on neuroendocrine and reproductive functions in transgenic and knock-out mice.
Proc Soc Exp Biol Med 222, 113-123

Bartke A, Turyn D, Aguilar CC, Sotelo AI, Steger RW, Chen XZ und Kopchick JJ (1994b)
Growth hormone (GH) binding and effects of GH analogs in transgenic mice.
Proc Soc Exp Biol Med 206, 190-194

Bates RW, Milkovic S und Garrison MM (1964)
Effects Of Prolactin, Growth Hormone And Acth, Alone And In Combination, Upon Organ Weights And Adrenal Function In Normal Rats.
Endocrinology 74, 714-723

Bauman DE (1992)
Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology.
J Dairy Sci 75, 3432-3451

Bauman DE (1999)
Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application.
Domest Anim Endocrinol 17, 101-116

Bauman DE, Eppard PJ, DeGeeter MJ und Lanza GM (1985)
Responses of high-producing dairy cows to long-term treatment with pituitary somatotropin and recombinant somatotropin.
J Dairy Sci 68, 1352-1362

Baumann G, Shaw MA und Amburn K (1989)
Regulation of plasma growth hormone-binding proteins in health and disease.
Metabolism 38, 683-689

Baxter RC, Binoux M, Clemmons DR, Conover C, Drop SL, Holly JM, Mohan S, Oh Y und Rosenfeld RG (1998)
Recommendations for nomenclature of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) superfamily.
Growth Horm IGF Res 8, 273-274

Bengtsson BA, Eden S, Ernest I, Oden A und Sjogren B (1988)
Epidemiology and long-term survival in acromegaly. A study of 166 cases diagnosed between 1955 and 1984.
Acta Med Scand 223, 327-335

Bengtsson BA, Johannsson G, Shalet SM, Simpson H und Sonken PH (2000)
Treatment of growth hormone deficiency in adults.
J Clin Endocrinol Metab 85, 933-942

Beshyah SA, Freemantle C, Thomas E, Rutherford O, Page B, Murphy M und Johnston DG (1995)

Abnormal body composition and reduced bone mass in growth hormone deficient hypopituitary adults.

Clin Endocrinol 42, 179-189

Biedl A (1897)

Wiener Klin. Wschr. 195

Black D, Duncan A und 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

Blum WF, Jenne EW, Reppin F, Kietzmann K, Ranke MB und Bierich JR (1989)

Insulin-like growth factor I (IGF-I)-binding protein complex is a better mitogen than free IGF-I.

Endocrinology 125, 766-772

Blum WF und Ranke MB (1990)

Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) with special reference to IGFBP-3.

Acta Paediatr Scand Suppl 367, 55-62

Blumsohn A, Hannon RA, Wrate R, Barton J, al-Dehaimi AW, Colwell A und Eastell R (1994)

Biochemical markers of bone turnover in girls during puberty.

Clin Endocrinol 40, 663-670

Bobek G, Scott CD und Baxter RC (1991)

Secretion of soluble insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor by rat tissues in culture.

Endocrinology 128, 2204-2206

Bobek G, Scott CD und Baxter RC (1992)

Radioimmunoassay of soluble insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor: developmental regulation of receptor release by rat tissues in culture.

Endocrinology 130, 3387-3394

Bohlooly YM, Carlson L, Olsson B, Gustafsson H, Andersson IJ, Tornell J und Bergstrom G (2001)

Vascular function and blood pressure in GH transgenic mice.

Endocrinology 142, 3317-3323.

Boyd RS und Wallis M (1989)

Effects of pretreatment with tetradecanoyl phorbol acetate on regulation of growth hormone and prolactin secretion from ovine anterior pituitary cells.

FEBS Lett 251, 99-103

- Brehm G, Wanke R, Buchmuller T, Muller M, Brenig B und Hermanns W (1991)
Multiple consequences of human growth hormone expression in transgenic mice.
Mol Biol Med 6, 531-547
- Brenner KV (1990)
Mechanism of action and effects of repartitioning substances for swine fattening.
Dtsch Tierarztl Wochenschr 97, 196-202
- Butler AA, Blakesley VA, Poulaki V, Tsokos M, Wood TL und LeRoith D (1998)
Stimulation of tumor growth by recombinant human insulin-like growth factor-I (IGF-I)
is dependent on the dose and the level of IGF-I receptor expression.
Cancer Res 58, 3021-3027
- Camina JP, Carreira MC, Micic D, Pombo M, Kelestimur F, Dieguez C und Casanueva FF
(2003)
Regulation of ghrelin secretion and action.
Endocrine 22, 5-12
- Cecim M, Fadden C, Kerr J, Steger RW und Bartke A (1995a)
Infertility in transgenic mice overexpressing the bovine growth hormone gene:
disruption of the neuroendocrine control of prolactin secretion during pregnancy.
Biol Reprod 52, 1187-1192
- Cecim M, Kerr J und Bartke A (1995b)
Effects of bovine growth hormone (bGH) transgene expression or bGH treatment on
reproductive functions in female mice.
Biol Reprod 52, 1144-1148
- Cecim M, Kerr J und Bartke A (1995c)
Infertility in transgenic mice overexpressing the bovine growth hormone gene: luteal
failure secondary to prolactin deficiency.
Biol Reprod 52, 1162-1166
- Chang-DeMoranville BM und Jackson IM (1992)
Diagnosis and endocrine testing in acromegaly.
Endocrinol Metab Clin North Am 21, 649-668
- Chilliard Y (1988)
Roles and mechanisms of action of somatotropin (growth hormone) in lactating
ruminants.
Reprod Nutr Dev 28, 39-59
- Cindik ED, Maurer M, Hannan MK, Muller R, Hayes WC, Hovy L und Kurth AA (2000)
Phenotypical characterization of c-kit receptor deficient mouse femora using non-
destructive high-resolution imaging techniques and biomechanical testing.
Technol Health Care 8, 267-275

- Clanget C, Seck T, Hinke V, Wuster C, Ziegler R und Pfeilschifter J (2001)
Effects of 6 years of growth hormone (GH) treatment on bone mineral density in GH-deficient adults.
Clin Endocrinol 55, 93-99
- Cohen P, Clemmons DR und Rosenfeld RG (2000)
Does the GH-IGF axis play a role in cancer pathogenesis?
Growth Horm IGF Res 10, 297-305
- Collip JB (1999)
The William Henry Welch Lectures: Some recent advances in the physiology of the anterior pituitary.
Mount Sinai J Med 66, 343-364
- Colwell A, Russell RG und 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
- Consensus development conference (1993)
Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis.
Am J Med 94: 646-650
- Cushing H (1909)
Partial hypophysectomy for acromegaly.
Ann. Surg. 50, 1002-1017
- Dattani M und Preece M (2004)
Growth hormone deficiency and related disorders: insights into causation, diagnosis, and treatment.
Lancet 363, 1977-1987
- Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD, Jr van den Brande JL und van Wyk JJ (1972)
Somatomedin: proposed designation for sulphation factor.
Nature 235, 107
- Daughaday WH und Rotwein P (1989)
Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations.
Endocr Rev 10, 68-91
- DeChiara TM, Robertson EJ und Efstratiadis A (1991)
Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene.
Cell 64, 849-859

Degerblad M, Bengtsson BA, Bramnert M, Johnell O, Manhem P, Rosen T und Thoren M (1995)

Reduced bone mineral density in adults with growth hormone (GH) deficiency: increased bone turnover during 12 months of GH substitution therapy.

Eur J Endocrinol 133, 180-188

Denko CW und Bergenstal DM (1955)

The effect of hypophysectomy and growth hormone on S35 fixation in cartilage.

Endocrinology 57, 76-86

Drop SL, Schuller AG, Lindenbergh-Kortleve DJ, Groffen C, Brinkman A und Zwarthoff EC (1992)

Structural aspects of the IGFBP family.

Growth Regul 2, 69-79

Eckstein F, Pavicic T, Nedbal S, Schmidt C, Wehr U, Rambeck W, Wolf E und Hoeflich A (2002)

Insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) overexpression negatively regulates bone size and mass, but not density, in the absence and presence of growth hormone/IGF-I excess in transgenic mice.

Anat Embryol 206, 139-148

Edqvist LE, Johansson ED, Kasstrom H, Olsson SE und Richkind M (1975)

Blood plasma levels of progesterone and oestradiol in the dog during the oestrous cycle and pregnancy.

Acta Endocrinol 78, 554-564

Eigenmann JE (1984a)

Acromegaly in the dog.

Vet Clin North Am Small Anim Pract 14, 827-836

Eigenmann JE (1984b)

Acromegaly in the female dog. Pathogenesis and clinical aspects.

Tierarztl Prax 12, 59-63

Eigenmann JE, Eigenmann RY, Rijnber, A, van der Gaag I, Zapf J und Froesch ER (1983)

Progesterone-controlled growth hormone overproduction and naturally occurring canine diabetes and acromegaly.

Acta Endocrinol 104, 167-176

Evans H und Long J (1921)

The effect of anterior lobe administered intraperitoneally upon growth, maturity and olfactory cycles of rat.

Anat. Rec. 21, 62-63

- Eyre DR, Koob TJ und Van Ness KP (1984)
Quantitation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high-performance liquid chromatography.
Anal Biochem 137, 380-388
- Ezzat S, Melmed S, Endres D, Eyre DR und Singer FR (1993)
Biochemical assessment of bone formation and resorption in acromegaly.
J Clin Endocrinol Metab 76, 1452-1457
- Feek CM, McLelland J, Seth J, Toft AD, Irvine WJ, Padfield PL und Edwards CR (1984)
How effective is external pituitary irradiation for growth hormone-secreting pituitary tumors?
Clin Endocrinol 20, 401-408
- Feldman EC und Nelson RW (2000)
Acromegaly and hyperadrenocorticism in cats: a clinical perspective.
J Feline Med Surg 2, 153-158
- Ferone D, Colao A, van der Lely AJ und Lamberts SW (2000)
Pharmacotherapy or surgery as primary treatment for acromegaly?
Drugs Aging 17, 81-92
- Fujimoto S, Kubo T, Tanaka H, Miura M und Seino Y (1995)
Urinary pyridinoline and deoxypyridinoline in healthy children and in children with growth hormone deficiency.
J Clin Endocrinol Metab 80, 1922-1928
- Garnero P und Delmas PD (1999)
Biochemical markers of bone turnover: clinical usefulness in osteoporosis.
Ann Biol Clin 57, 137-148
- Ghiron LJ, Thompson JL, Holloway L, Hintz RL, Butterfield GE, Hoffman AR und Marcus R (1995)
Effects of recombinant insulin-like growth factor-I and growth hormone on bone turnover in elderly women.
J Bone Miner Res 10, 1844-1852
- Gidding CE, Germain GS, Dilling MB, Meeuwse-de Boer TG, Ashmun RA, de Graaf SS, Veverka KA, Kamps WA und Houghton PJ (2000)
The influence of recombinant human insulin-like growth factor-I (rhIGF-I) on cell growth and cytotoxicity of drugs in childhood rhabdomyosarcoma cell lines and xenograft models.
Cancer Chemother Pharmacol 45, 21-30
- Gittoes NJ, Sheppard MC, Johnson AP und Stewart PM (1999)
Outcome of surgery for acromegaly-the experience of a dedicated pituitary surgeon.
Qjm 92, 741-745

Gnessi L, Fabbri A und Spera G (1997)

Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment.

Endocr Rev 18, 541-609

Goossens MM, Feldman EC, Nelson RW, Theon AP, Koblik PD, Elliott DA und Rutteman GR (1998)

Cobalt 60 irradiation of pituitary gland tumors in three cats with acromegaly.

J Am Vet Med Assoc 213, 374-376

Green H, Morikawa M und Nixon T (1985)

A dual effector theory of growth-hormone action.

Differentiation 29, 195-198

Grothey A, Voigt W, Schober C, Muller T, Dempke W und Schmoll HJ (1999)

The role of insulin-like growth factor I and its receptor in cell growth, transformation, apoptosis, and chemoresistance in solid tumors.

J Cancer Res Clin Oncol 125, 166-173

Halse J und Gordeladze JO (1981)

Total and non-dialyzable urinary hydroxyproline in acromegalics and control subjects.

Acta Endocrinol 96, 451-457

Hamann F, Kooistra HS, Mol JA, Gottschalk S, Bartels T und Rijnberk A (1999)

Pituitary function and morphology in two German shepherd dogs with congenital dwarfism.

Vet Rec 144, 644-646

Hardouin S, Gourmelen M, Noguez P, Seurin D, Roghani M, Le Bouc Y, Pova G, Merimee TJ, Hossenlopp P und Binoux M (1989)

Molecular forms of serum insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins in man: relationships with growth hormone and IGFs and physiological significance.

J Clin Endocrinol Metab 69, 1291-1301

Hartman ML, Veldhuis JD, Vance ML, Faria AC, Furlanetto RW und Thorner MO (1990)

Somatotropin pulse frequency and basal concentrations are increased in acromegaly and are reduced by successful therapy.

J Clin Endocrinol Metab 70, 1375-1384

Hill PA, Reynolds JJ und Meikle MC (1995)

Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and -II stimulation of osteoclast formation and function.

Endocrinology 136, 124-131

Hindmarsh PC und Brook CG (1995)

Short stature and growth hormone deficiency.

Clin Endocrinol 43, 133-142

Hirschberg R und Kaysen GA (1995)

Insulin-like growth factor I and its binding proteins in the experimental nephrotic syndrome.

Endocrinology 136, 1565-1571

Hoeflich A, Reisinger R, Lahm H, Kiess W, Blum WF, Kolb HJ, Weber MM und Wolf E (2001)

Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter? Cancer Res 61, 8601-8610

Hoeflich A, Wu M, Mohan S, Foll J, Wanke R, Froehlich T, Arnold GJ, Lahm H, Kolb HJ und Wolf E (1999)

Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in transgenic mice reduces postnatal body weight gain.

Endocrinology 140, 5488-5496

Holmes SJ, Whitehouse RW, Swindell R, Economou G, Adams JE und Shalet S (1995)

Effect of growth hormone replacement on bone mass in adults with adult onset growth hormone deficiency.

Clin Endocrinol 42, 627-633

Horsley V (1896)

Lancet 1, 5

Isaksson OG, Lindahl A, Nilsson A und Isgaard J (1987)

Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth.

Endocr Rev 8, 426-438

Johannsson G, Rosen T, Bosaeus I, Sjostrom L und Bengtsson BA (1996)

Two years of growth hormone (GH) treatment increases bone mineral content and density in hypopituitary patients with adult-onset GH deficiency.

J Clin Endocrinol Metab 81, 2865-2873

Johannsson AG, Burman P, Westermark K und Ljunghall S (1992)

The bone mineral density in acquired growth hormone deficiency correlates with circulating levels of insulin-like growth factor I.

J Intern Med 232, 447-452

Johannsson AG, Eriksen EF, Lindh E, Langdahl B, Blum WF, Lindahl A, Ljunggren O und Ljunghall S (1997)

Reduced serum levels of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein and a negative bone balance at the level of individual remodeling units in idiopathic osteoporosis in men.

J Clin Endocrinol Metab 82, 2795-2798

Jones JI und Clemmons DR (1995)

Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions.

Endocr Rev 16, 3-34

Jones JI, Gockerman A, Busby WH, Jr Wright G und Clemmons DR (1993)
Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence.
Proc Natl Acad Sci U S A 90, 10553-10557

Kassem M, Mosekilde L und Eriksen EF (1994)
Growth hormone stimulates proliferation of normal human bone marrow stromal osteoblast precursor cells in vitro.
Growth Regul 4, 131-135

Kern S (2004)
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.
Vet Med Diss, München

Kim JG und Lee JY (1996)
Serum insulin-like growth factor binding protein profiles in postmenopausal women: their correlation with bone mineral density.
Am J Obstet Gynecol 174, 1511-1517

Kim JG, Shin CS, Choi YM, Moon SY, Kim SY und Lee JY (1999)
The relationship among circulating insulin-like growth factor components, biochemical markers of bone turnover and bone mineral density in postmenopausal women under the age of 60.
Clin Endocrinol 51, 301-307

Kirkwood RN, Thacker PA und Laarveld B (1989)
The influence of growth hormone injections on the endocrine and metabolic status of gilts.
Domest Anim Endocrinol 6, 167-176

Knobil E, Kostyo JL, Greep RO (1959)
Production of ovulation in the hypophysectomized rhesus monkey.
Endocrinology 65, 487-93

Knottenbelt CM und Herrtage ME (2002)
Use of proligestone in the management of three German shepherd dogs with pituitary dwarfism.
J Small Anim Pract 43, 164-170.

Kokka N, Garcia JF, Morgan M und George R (1971)
Immunoassay of plasma growth hormone in cats following fasting and administration of insulin, arginine, 2-deoxyglucose and hypothalamic extract.
Endocrinology 88, 359-366

- Kooistra HS, den Hertog E, Okkens AC, Mol JA und Rijnberk A (2000a)
Pulsatile secretion pattern of growth hormone during the luteal phase and mid-anoestrus in beagle bitches.
J Reprod Fertil 119, 217-222
- Kooistra HS, Voorhout G, Mol JA und Rijnberk A (2000b)
Combined pituitary hormone deficiency in german shepherd dogs with dwarfism.
Domest Anim Endocrinol 19, 177-190
- Kooistra HS, Voorhout G, Selman PJ und Rijnberk A (1998)
Progestin-induced growth hormone (GH) production in the treatment of dogs with congenital GH deficiency.
Domest Anim Endocrinol 15, 93-102
- Kotzmann H, Bernecker P, Hubsch P, Pietschmann P, Woloszczuk W, Svoboda T, Geyer G und Luger A (1993)
Bone mineral density and parameters of bone metabolism in patients with acromegaly.
J Bone Miner Res 8, 459-465
- Lane und Law (2001)
History of Acromegaly.
Bristol, UK, 1-16 pp.
- Langlois JA, Rosen CJ, Visser M, Hannan MT, Harris T, Wilson PW und Kiel DP (1998)
Association between insulin-like growth factor I and bone mineral density in older women and men: the Framingham Heart Study.
J Clin Endocrinol Metab 83, 4257-4262
- Lapillone A TR, Dimaio M, Salle BL und Glorieux FH (1996)
Bone remodeling assessed by urinary excretion of cross-linked N-telopeptides of type I collagen (NTx) in infants from birth to age of one year.
J Bone Miner Res 11(Suppl 1), 194
- Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, Hammonds RG, Collins C, Henzel WJ, Barnard R, Waters MJ und Wood WI (1987)
Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression.
Nature 330, 537-543
- Leung K, Rajkovic IA, Peters E, Markus I, Van Wyk JJ und Ho KK (1996)
Insulin-like growth factor I and insulin down-regulate growth hormone (GH) receptors in rat osteoblasts: evidence for a peripheral feedback loop regulating GH action.
Endocrinology 137, 2694-2702
- Lewitt MS, Hazel SJ, Church DB, Watson AD, Powell SE und Tan K (2000)
Regulation of insulin-like growth factor-binding protein-3 ternary complex in feline diabetes mellitus.
J Endocrinol 166, 21-27

Li CH und Graf L (1974)

Human pituitary growth hormone: isolation and properties of two biologically active fragments from plasmin digests.

Proc Natl Acad Sci U S A 71, 1197-1201

Lie JT (1980)

Pathology of the heart in acromegaly: anatomic findings in 27 autopsied patients.

Am Heart J 100, 41-52

Lieuw-A-Fa M SR und Specker BL (1995)

Carboxy-terminal propeptide of human type I collagen and pyridinium crosslinks as markers of bone growth in infants 1 to 18 month of age.

J Bone Miner Res 10, 849-853

MacDonald RG, Pfeffer SR, Coussens L, Tepper MA, Brocklebank CM, Mole JE, Anderson JK, Chen E, Czech MP und Ullrich A (1988)

A single receptor binds both insulin-like growth factor II and mannose-6-phosphate. Science 239, 1134-1137

MacGorman LR, Rizza RA und Gerich JE (1981)

Physiological concentrations of growth hormone exert insulin-like and insulin antagonistic effects on both hepatic and extrahepatic tissues in man.

J Clin Endocrinol Metab 53, 556-559

Marazuela M, Astigarraga B, Tabuenca MJ, Estrada J, Marin F und Lucas T (1993)

Serum bone Gla protein as a marker of bone turnover in acromegaly.

Calcif Tissue Int 52, 419-421

Marie P (1886)

Sur deux cas d'acromegalie.

Rev. Med. 6, 297-299

Markussis V, Beshyah SA, Fisher C, Sharp P, Nicolaidis AN und Johnston DG (1992)

Detection of premature atherosclerosis by high-resolution ultrasonography in symptom-free hypopituitary adults.

Lancet 340, 1188-1192

Mayo KE, Hammer RE, Swanson LW, Brinster RL, Rosenfeld MG. und Evans RM (1988)

Dramatic pituitary hyperplasia in transgenic mice expressing a human growth hormone-releasing factor gene.

Mol Endocrinol 2, 606-612

McGrane MM, de Vente J, Yun J, Bloom J, Park E, Wynshaw-Boris A, Wagner T, Rottman FM und Hanson RW (1988)

Tissue-specific expression and dietary regulation of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase/bovine growth hormone gene in transgenic mice.

J Biol Chem 263, 11443-11451

Middleton DJ (1985)

Growth hormone-producing pituitary adenoma, elevated serum somatomedin C concentration and diabetes mellitus in a cat.

Canadian Veterinary Journal 26, 169-171

Mochizuki H, Hakeda Y, Wakatsuki N, Usui N, Akashi S, Sato T, Tanaka K und Kumegawa M (1992)

Insulin-like growth factor-I supports formation and activation of osteoclasts. Endocrinology 131, 1075-1080

Mol JA, Selman PJ, Sprang EP, van Neck JW und Oosterlaken-Dijksterhuis MA (1997)

The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review.

J Reprod Fertil Suppl 51, 339-344

Mora S, Prinster C, Proverbio MC, Bellini A, de Poli SC, Weber G, Abbiati G und Chiumello G (1998)

Urinary markers of bone turnover in healthy children and adolescents: age-related changes and effect of puberty.

Calcif Tissue Int 63, 369-37

Müller-Peddinghaus R, El Etreby MF, Siefert J und Ranke M (1980)

Pituitary dwarfism in a German shepherd dog (author's transl).

Vet Pathol 17, 406-421

Murphy WR, Daughaday WH und Hartnett C (1956)

The effect of hypophysectomy and growth hormone on the incorporation of labeled sulfate into tibial epiphyseal and nasal cartilage of the rat.

J Lab Clin Med 47, 715-722

Ng EH, Rock CS, Lazarus DD, Stiaino-Coico L, Moldawer LL und Lowry SF (1992)

Insulin-like growth factor I preserves host lean tissue mass in cancer cachexia.

Am J Physiol 262, R426-431

Nielsen FC, Haselbacher G, Christiansen J, Lake M, Gronborg M und Gammeltoft S (1993) Biosynthesis of 10 kDa and 7.5 kDa insulin-like growth factor II in a human rhabdomyosarcoma cell line.

Mol Cell Endocrinol 93, 87-95

Nielsen HK, Jorgense, JO, Brixen K und Christiansen JS (1991)

Serum osteocalcin and bone isoenzyme alkaline phosphatase in growth hormone-deficient patients: dose-response studies with biosynthetic human GH.

Calcif Tissue Int 48, 82-87

Nishiyama K, Sugimoto T, Kaji H, Kanatani M, Kobayashi T und Chihara K (1996)

Stimulatory effect of growth hormone on bone resorption and osteoclast differentiation.

Endocrinology 137, 35-41

- Oh Y, Muller HL, Lamson G und Rosenfeld RG (1993)
Insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. Cell surface binding and growth inhibition.
J Biol Chem 268, 14964-14971
- Ohlsson C, Bengtsson BA, Isaksson OG, Andreassen TT und Słotweg MC (1998)
Growth hormone and bone.
Endocr Rev. 19(1),55-79
- Ohlsson C und Vidal O (1998)
Effects of growth hormone and insulin-like growth factors on human osteoblasts.
Eur J Clin Invest 28, 184-186
- Oshima A, Nolan CM, Kyle JW, Grubb JH und Sly WS (1988)
The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Cloning and sequence of the full-length cDNA and expression of functional receptor in COS cells.
J Biol Chem 263, 2553-2562
- Palmiter RD, Chen HY und Brinster RL (1982)
Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring.
Cell 29, 701-710
- Parker DC, Sassin JF, Mace JW, Gotlin RW und Rossman LG (1969)
Human growth hormone release during sleep: electroencephalographic correlation.
J Clin Endocrinol Metab 29, 871-874
- Peterson ME, Taylor RS, Greco DS, Nelson RW, Randolph JF, Foodman MS, Moroff SD, Morrison SA und Lothrop CD (1990)
Acromegaly in 14 cats.
J Vet Intern Med 4, 192-201
- Pohlmann R, Nagel G, Schmidt B, Stein M, Lorkowski G, Krentler C, Cully J, Meyer HE, Grzeschik KH und Mersmann G (1987)
Cloning of a cDNA encoding the human cation-dependent mannose 6-phosphate-specific receptor.
Proc Natl Acad Sci U S A 84, 5575-5579
- Powell-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts-Meek S, Dalton D, Gillett N und Stewart TA (1993)
IGF-I is required for normal embryonic growth in mice.
Genes Dev 7, 2609-2617
- Raben M (1958)
Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone.
J Clin Endocrinol 18, 901-903

- Raben MS und Westermeyer V.W (1951)
Recovery of growth hormone in purification of corticotropin.
Proc Soc Exp Biol Med 78, 550-551
- Ramsey IK, Evans H und Herrtage ME (1997)
Thyroid-stimulating hormone and total thyroxine concentrations in euthyroid, sick euthyroid and hypothyroid dogs.
J Small Anim Pract 38, 540-545
- Ranch F SE, Woitge H und Remer T (1994)
Urinary excretion of hydroxy-pyridinium crosslinks of collagen reflects skeletal growth velocity in normal children.
Exp Clin Endocrinol 102, 94-97
- Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP und Wollmann HA (2000)
Significance of basal IGF-I, IGFBP-3 and IGFBP-2 measurements in the diagnostics of short stature in children.
Horm Res 54, 60-68
- Ranke MB, Schweizer R, Wollmann HA und Schwarze P (1999)
Dosing of growth hormone in growth hormone deficiency.
Horm Res 51 Suppl 3, 70-74
- Rechler MM, Brown AL, Ooi GT, Orlowski CC, Tseng LY und Yang YW (1991)
Regulation of gene expression of rat insulin-like growth factor binding proteins 1 and 2.
Adv Exp Med Biol 293, 137-148
- Reichlin S (1983)
Somatostatin.
N Engl J Med 309, 1495-1501
- Rijnberk A, Eigenmann JE, Belshaw BE, Hampshire J und Altszuler N (1980)
Acromegaly associated with transient overproduction of growth hormone in a dog.
J Am Vet Med Assoc 177, 534-537
- Rijnberk A und Mol JA (1997)
Progesterin-induced hypersecretion of growth hormone: an introductory review.
J Reprod Fertil Suppl 51, 335-338
- Rijnberk A, van Herpen H, Mol JA und Rutteman GR (1993)
Disturbed release of growth hormone in mature dogs: a comparison with congenital growth hormone deficiency.
Vet Rec 133, 542-545
- Rinderknecht E und Humbel RE (1978)
Primary structure of human insulin-like growth factor II.
FEBS Lett 89, 283-286

Rollo CD (1996)

Accelerated aging of giant transgenic mice is associated with elevated free radical processes.

Can J Zool 747, 606-620

Rollo CD (1997)

Behavioural rhythmicity in transgenic growth hormone mice: trade-offs, energetics, and sleep-wake cycles.

Can J Zool 75, 1020-1034

Rosen CJ und Bilezikian JP (2001)

Clinical review 123: Anabolic therapy for osteoporosis.

J Clin Endocrinol Metab 86, 957-964

Rosen T, Hansson T, Granhed H, Szucs J und Bengtsson BA (1993)

Reduced bone mineral content in adult patients with growth hormone deficiency.

Acta Endocrinol 129, 201-206

Rosen T, Wilhelmsen L und Bengtsson BA (1998)

Altered lipid pattern explains increased cardiovascular mortality in hypopituitary patients with growth hormone deficiency.

Clin Endocrinol 48, 525-526

Rosen T, Wilhelmsen L, Landin-Wilhelmsen K, Lappas G und Bengtsson BA (1997)

Increased fracture frequency in adult patients with hypopituitarism and GH deficiency.

Eur J Endocrinol 137, 240-245

Rosenfeld RG., Wilson DM, Dollar LA, Bennett A und Hintz RL (1982)

Both human pituitary growth hormone and recombinant DNA-derived human growth hormone cause insulin resistance at a postreceptor site.

J Clin Endocrinol Metab 54, 1033-1038.

Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, Gergans GA, Lalitha PY, Goldberg AF, Schlenker RA, Cohn L, Rudman IW und Mattson DE (1990)

Effects of human growth hormone in men over 60 years old.

N Engl J Med 323, 1-6

Sacca L, Cittadini A und Fazio S (1994)

Growth hormone and the heart.

Endocr Rev 15, 555-573

Saggese G, Ranke MB, Saenger P, Rosenfeld RG, Tanaka T, Chaussain JL und Savage MO (1998)

Diagnosis and treatment of growth hormone deficiency in children and adolescents: towards a consensus. Ten years after the Availability of Recombinant Human Growth Hormone Workshop held in Pisa, Italy, 27-28 March 1998.

Horm Res 50, 320-340

- Salmon WD Jr und Daughaday WH (1957)
A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro.
J Lab Clin Med 49, 825-836
- Salomon F, Cuneo RC, Umpleby AM und Sonksen PH (1994)
Glucose and fat metabolism in adults with growth hormone deficiency.
Clin Endocrinol 41, 315-322
- Sandstedt J, Tornell J, Norjavaara E, Isaksson OG und Ohlsson C (1996)
Elevated levels of growth hormone increase bone mineral content in normal young mice, but not in ovariectomized mice.
Endocrinology 137, 3368-3374
- Sartorio A, Conti A und Monzani M (1993)
New markers of bone and collagen turnover in children and adults with growth hormone deficiency.
Postgrad Med J 69, 846-850
- Schmeitzel LP (1990)
Sex hormone-related and growth hormone-related alopecias.
Vet Clin North Am Small Anim Pract 20, 1579-1601
- Schmeitzel LP und Lothrop CD Jr (1990)
Hormonal abnormalities in Pomeranians with normal coat and in Pomeranians with growth hormone-responsive dermatosis.
J Am Vet Med Assoc 197, 1333-1341
- Schneider MR, Wolf E, Hoeflich A und Lahm H (2002)
IGF-binding protein-5: flexible player in the IGF system and effector on its own.
J Endocrinol 172, 423-440
- Schoenmakers I, Kooistra HS, Okkens AC, Hazewinkel HA, Bevers MM und Mol JA (1997)
Growth hormone concentrations in mammary secretions and plasma of the periparturient bitch and in plasma of the neonate.
J Reprod Fertil Suppl 51, 363-367
- Seibel MJ, Cosman F, Shen V, Gordon S, Dempster DW, Ratcliffe A und 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
- Selman PJ, Mol JA, Rutteman GR und Rijnberk A (1991)
Progestins and growth hormone excess in the dog.
Acta Endocrinol 125 Suppl 1, 42-47

- Selman PJ, Mol JA, Rutteman GR, van Garderen E und Rijnberk A (1994)
Progestin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland.
Endocrinology 134, 287-292
- Seyedin SM, Kung VT, Daniloff YN, Hesley RP, Gomez B, Nielsen LA, Rosen HN und Zuk RF (1993)
Immunoassay for urinary pyridinoline: the new marker of bone resorption.
J Bone Miner Res 8, 635-641
- Sheaves R (1999)
A history of acromegaly.
Pituitary 2, 7-28
- Shimasaki S, Shimonaka M, Zhang HP und Ling N (1991)
Identification of five different insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) from adult rat serum and molecular cloning of a novel IGFBP-5 in rat and human.
J Biol Chem 266, 10646-10653
- Slootweg MC (1993)
Growth hormone and bone.
Horm Metab Res 25, 335-343
- Slootweg MC, Ohlsson C, Salles JP, de Vries CP und Netelenbos JC (1995)
Insulin-like growth factor binding proteins-2 and -3 stimulate growth hormone receptor binding and mitogenesis in rat osteosarcoma cells.
Endocrinology 136, 4210-4217
- Slootweg MC, Ohlsson C, van Elk EJ, Netelenbos JC und Andress DL (1996)
Growth hormone receptor activity is stimulated by insulin-like growth factor binding protein 5 in rat osteosarcoma cells.
Growth Regul 6, 238-246
- Starkey SR, Tan K und Church DB (2004)
Investigation of serum IGF-I levels amongst diabetic and non-diabetic cats.
J Feline Med Surg 6, 149-155
- Struble AI und Nelson RW (1997)
Non insulin-dependent diabetes mellitus in cats and humans.
Comp Cont Educ Pract Vet 19, 935-946
- Sugimoto T, Nishiyama K, Kuribayashi F und Chihara K (1997)
Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) I, IGF-binding protein (IGFBP)-2, and IGFBP-3 in osteoporotic patients with and without spinal fractures.
J Bone Miner Res 12, 1272-1279
- Suikkari AM, Koivisto VA, Rutanen EM, Yki-Jarvinen H, Karonen SL und Seppala M (1988)
Insulin regulates the serum levels of low molecular weight insulin-like growth factor-binding protein.
J Clin Endocrinol Metab 66, 266-272

Tanaka T (2003)

Growth Hormone (GH) treatment in GH deficient children.
Clin Calcium 13, 1587-1590

Tashjian AH Jr, Levine L und Wilhelmi AE (1968)

Studies of growth hormone by micro-complement fixation.
Ann N Y Acad Sci 148, 352-371

Tornell J, Carlsson B, Pohjanen P, Wennbo H, Rymo L und Isaksson O (1992)

High frequency of mammary adenocarcinomas in metallothionein promoter-human growth hormone transgenic mice created from two different strains of mice.
J Steroid Biochem Mol Biol 43, 237-242

Ulshen MH, Dowling RH, Fuller CR, Zimmermann EM und Lund PK (1993)

Enhanced growth of small bowel in transgenic mice overexpressing bovine growth hormone.
Gastroenterology 104, 973-980

van Garderen E, de Wit M, Voorhout WF, Rutteman GR, Mol JA, Nederbragt H und Misdorp W (1997)

Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors. Evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop.
Am J Pathol 150, 1037-1047

Verga (1864)

A singular case of prosopectasia
Rendic 1 sr di Combardia 1, 110-117 pp.

Wass JA (1997)

Evidence for the effectiveness of radiotherapy in the treatment of acromegaly.
J Endocrinol 155 Suppl 1, 57-58; 67-71

Watson RG, Rijnberk A und Mol JA (1987)

Effect of somatostatin analogue SMS 201-995 and antiprogestin agent RU 486 in canine acromegaly.
Front Horm Res 17, 193-198

Wehr U (1998)

Diagnose, Prävention und Therapie von Knochenstoffwechselerkrankungen in der Humanmedizin: Möglichkeiten und Grenzen von biochemischen Knochenmarkern.
Vet Med Diss, München.

Wennbo H, Gebre-Medhin M, Gritli-Linde A, Ohlsson C, Isaksson OG und Tornell J (1997a) Activation of the prolactin receptor but not the growth hormone receptor is important for induction of mammary tumors in transgenic mice.
J Clin Invest 100, 2744-2751

Wennbo H, Kindblom J, Isaksson OG und Tornell J (1997b)
Transgenic mice overexpressing the prolactin gene develop dramatic enlargement of the prostate gland.
Endocrinology 138, 4410-4415

Wilhelmi AE (1959)
The comparative biochemistry of pituitary growth hormone.
Henry Ford Hosp Med Bull 7, 2-9

Willeberg P, Kastrup KW und Andresen E (1975)
Pituitary dwarfism in german shepherd dogs: studies on somatomedin activity.
Nord Vet Med 27, 448-454

Wilmore DW (1991)
Catabolic illness. Strategies for enhancing recovery.
N Engl J Med 325, 695-702

Wolf E, Kant E, Ehrlein J, Hermanns W, Brem G und Wanke R (1993)
Effects of long-term elevated serum levels of growth hormone on life expectancy of mice: Lessons from transgenic animal models.
Mech Ageing Dev 68, 71-87

Wolf E, Rapp K und Brem G (1991)
Expression of metallothionein-human growth hormone fusion genes in transgenic mice results in disproportionate skeletal gigantism.
Growth Dev Aging 55, 117-127

Wollmann HA, Schonau E, Blum WF, Meyer F, Kruse K und Ranke MB (1995)
Dose-dependent responses in insulin-like growth factors, insulin-like growth factor-binding protein-3 and parameters of bone metabolism to growth hormone therapy in young adults with growth hormone deficiency.
Horm Res 43, 249-256

Woods K, Camacho-Hubner C, Savage M und Clark A (1996)
Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor gene.
N Engl J Med 335, 1363-1367

Wuster C (1993)
Growth hormone and bone metabolism.
Acta Endocrinol 128 Suppl 2, 14-18

Wuster C (2000)
Fracture rates in patients with growth hormone deficiency.
Horm Res 54 Suppl 1, 31-35

Yeh JK, Chen MM und Aloia JF (1997)

Effects of estrogen and growth hormone on skeleton in the ovariectomized rat with hypophysectomy.

Am J Physiol 273, 734-742

Zezulak KM und Green H (1986)

The generation of insulin-like growth factor-1--sensitive cells by growth hormone action.

Science 233, 551-553.

Zhou Y, Xu BC, Maheshwari H.G, He L, Reed M, Lozykowski M, Okada S, Cataldo L, Coschigamo K, Wagner TE, Baumann G und Kopchick JJ (1997)

A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse).

Proc Natl Acad Sci U S A 94, 13215-13220

9. Lebenslauf

| | |
|-------------|----------------------------|
| Name | Seibel |
| Vorname | Tina |
| Geboren am | 10.12.1977 |
| Geburtsort | Würzburg |
| Eltern | Christine und Bernd Seibel |
| Geschwister | Philipp Seibel |

Schulbildung

| | |
|---------------|--|
| 1984 - 1988 | Besuch der Grundschule in Höchberg |
| 1988 - 1997 | Besuch des Wirsberg Gymnasiums in Würzburg |
| 27. Juni 1997 | Allgemeine Hochschulreife |

Hochschulausbildung

| | |
|------------------|--|
| 1997 - 2003 | Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität in München |
| 1. Dezember 2003 | Approbation als Tierärztin |
| Februar 2003 | Beginn der vorliegenden Arbeit |

10. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Walter A. Rambeck für die Überlassung des Themas, seine Hilfsbereitschaft sowie für seine freundliche Betreuung und Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit.

Bei meinem Betreuer Dr. Uli Wehr möchte ich mich besonders herzlich für seine große Hilfsbereitschaft während der Laborarbeiten sowie beim Verfassen dieser Arbeit bedanken. Er hat mir immer geduldig bei allen Fragen und Problemen zur Seite gestanden. Vielen Dank Uli!

Bedanken möchte ich mich auch bei PD Dr. Dr. Felix Eckstein und Prof. Dr. Eckhard Wolf für die gute Zusammenarbeit.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Herrn Werner Hesselbach für die ständige und unermüdliche Hilfsbereitschaft während der Laborarbeiten sowie Frau Elke Kleiner für die Hilfe beim Messen der Crosslinks.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei den Mitarbeitern des Instituts und meinen Mitdoktoranden bedanken, da sie immer für ein sehr nettes und angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium und die Dissertation ermöglicht haben. Vielen Dank für das große Vertrauen, das Ihr mir entgegen bringt!

Von ganzem Herzen danke ich auch Klaus, der all die stressigen Zeiten während des Studiums und der Doktorarbeit so prima mit mir durch gestanden hat.