

Aus dem Institut für  
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität München

Geschäftsführender Vorstand:  
Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

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

**Wirkung von Seltenen Erden auf den osteoporotisch veränderten  
Knochen im Tiermodell der ovariektomierten Ratte**

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

vorgelegt von  
Alexander Feldhaus  
aus Wipperfürth

München 2006

1. Prüfer: Prof. Dr. K. Pfister

2. Prüfer: Prof. Dr. K. Heinritzi

3. Prüfer: PD Dr. W. Breuer

Tag der mündlichen Prüfung: 28. 07. 2006

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

## Symbole

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2 LITERATUR	
2.1. Seltene Erden	2
2.1.1. Einteilung und Stellung im Periodensystem	2
2.1.2. Vorkommen der Seltenen Erden	2
2.1.3. Chemische und physikalische Eigenschaften der Seltenen Erden	3
2.1.4. Verwendung der Seltenen Erden	5
2.1.4.1. Verwendung in der Industrie	5
2.1.4.2. Verwendung in der Landwirtschaft	5
2.1.4.3. Verwendung in der Humanmedizin	12
2.1.4.4. Biochemische Eigenschaften	15
2.1.4.5. Toxizität	16
2.2. Der Krankheitskomplex Osteoporose	17
2.2.1. Grundlagen des Knochenstoffwechsels	17
2.2.2. Geschichtlicher Hintergrund und Definition der Osteoporose	22
2.2.3. Einteilung der generalisierten Osteoporose	23
2.2.4. Die biochemischen Marker des Knochenstoffwechsels	25
2.2.4.1. Marker der Knochenformation	28
2.2.4.2. Marker der Knochenresorption	30
2.2.5. Weitere biochemische Marker des Knochenstoffwechsels	32
2.2.6. Die Postmenopausale Osteoporose der Frau	34
2.2.7. Die ovariectomierte Ratte als Modell für die Postmenopausale Osteoporose der Frau	37
2.3. Zulassungsbestimmungen für Medikamente, die zur Prävention oder Therapie der Postmenopausalen Osteoporose eingesetzt werden	40
2.3.1. Präklinische Studien	41

---

2.3.2. Klinische Studien	43
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	
3.1. Versuchstiere	47
3.2. Die Operationstechniken	47
3.2.1. Die Ovariectomie	47
3.2.2. Die Scheinoperation („SHAM-Operation“)	47
3.3. Versuchstierhaltung	48
3.4. Tierfutter	48
3.5. Versuchsaufbau	50
3.5.1. Gruppeneinteilung	50
3.5.2. Serumgewinnung	51
3.5.3. Uringewinnung	51
3.6. Versuchsende	52
3.7. Bestimmung der Parameter des Knochenstoffwechsels aus dem Serum	53
3.7.1. Osteocalcin im Serum	53
3.7.2. Calciumbestimmung im Serum	54
3.8. Bestimmung der Parameter des Knochenstoffwechsels im Urin	55
3.8.1. Creatinin	55
3.8.2. Collagencrosslinks Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD)	55
3.9. Der Knochen als Parameter	58
3.9.1. Knochenlänge und Knochengewicht	58
3.9.2. Trockensubstanz der Knochen	58
3.9.3. Knochenasche	58
3.9.4. Bestimmung der Calcium- Phosphor-und Magnesiumkonzentration der Knochen	58
3.9.5. Knochendichtemessung per pQCT	59
3.10. Bestimmung der Organparameter	60
3.10.1. Bestimmung der Trockensubstanz	60
3.10.2. Mikrowellenaufschluss	60
3.10.3. Calciumbestimmung aus der Aschelösung	61
3.10.4. Phosphorbestimmung aus der Aschelösung	62

---

3.11. Sonstige Parameter	62
3.11.1. Entwicklung des Körpergewichtes der Ratten	62
3.11.2. Futtermittelverbrauch	62
3.11.3. Weender-Analyse des Futters	62
3.12. Statistische Auswertung	65
3.12.1. Vergleichsuntersuchungen	65
3.12.2. Verlaufsuntersuchungen	66
4 ERGEBNISSE	
4.1. Versuchstierdaten	67
4.1.1. Entwicklung des Körpergewichtes	67
4.1.2. Der Futtermittelverbrauch	69
4.2. Laborchemische Parameter	71
4.2.1. Parameter des Knochenstoffwechsels	71
4.2.2. Calciumstoffwechsel	75
4.3. Knochenparameter	76
4.3.1. Knochenlänge	76
4.3.2. Knochengewicht	78
4.3.3. Knochenasche	79
4.3.4. Knochendichtemessung	81
4.4. Organparameter	83
4.4.1. Organengewichte	83
4.4.2. Phosphorgehalt der Organe	85
4.4.3. Calciumgehalt der Organe	86
4.4.4. Konzentration an Seltenen Erden in der Leber	87
4.5. Weender-Analyse und Futtermittelminerale	88
4.5.1. Weender-Analyse des Futters	88
4.5.2. Mineralstoffgehalt des Futters	88
5 DISKUSSION	
5.1. Kritik der Methoden	89
5.1.1. Wahl des Tiermodells	89
5.1.2. Fütterung und Wirkstoffaufnahme der Tiere	91

5.1.3. Die Messmethoden	93
5.1.4. Der Knochenstoffwechsel	94
5.2. Wahl des Wirkstoffes	97
5.2.1. Lanthanarbonat	97
5.2.2. REE-Citrat	98
5.2.3. Einfluss der Seltenen Erden auf die Entwicklung des Körpergewichtes	98
5.3. Wirkung auf die Organparameter	100
5.3.1. Die Uterusgewichte	100
5.3.2. Die Gewichte der Lunge, Herz, Leber und Niere	101
5.3.3. Der Mineralstoffgehalt der Organe	101
5.4. Der Einfluss auf den Knochen	103
5.4.1. Parameter des Knochenstoffwechsels	103
5.4.2. Knochenlänge und Gewicht	109
5.4.3. Knochenaschegehalt	110
5.4.4. Knochendichte	111
6.1. Ausblick	113
7 Zusammenfassung	114
8 Summary	116
Literaturverzeichnis	118
Abbildungsverzeichnis	147
Tabellenverzeichnis	148
Danksagung	150
Lebenslauf	151

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
ANOVA	Analysis of Variance, Varianzanalyse
AUC	Area under the curve, Fläche unter der Kurve
bALP	Knochenspezifische Alkalische Phosphatase
BGP	Bone Gla Protein, Osteocalcin
BMD	Bone Mineral Density
BRU	Bone remodeling units
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
Ce	Cer
Crea	Creatinin
DEXA	Dual X-ray Absorptiometry
DPD	Desoxypyridinolin
DPA	Dual photon Absorptiometry
ELISA	Enzyme linked Immunadsorbant Assay
FDA	Food and Drug Administration
FV	Futtermittelerwertung
g	Gramm
GZ	Gewichtszunahme
HCL	Salzsäure
HFBA	Heptafluorobutyricacid
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
I.E.	Internationale Einheiten
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
LaCo	Lanthancarbonat
LaCo+VD	Lanthancarbonat supplementiert mit Vitamin D

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
REE-Citrat	Seltene Erden-Citrat Mischung
REE-Citrat+VD	Seltene Erden-Citrat Mischung supplementiert mit Vitamin D
LD	Letale Dosis
Mg	Magnesium
MW	Mittelwert
$\mu$ CT	Microcomputertomographie
$\mu$ g	Microgramm
$\mu$ l	Microliter
NaOH	Natronlauge
NF $\kappa$ B	Nuclear factor B
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
Oc	Osteocalcin
OVX	ovariektomiert
P	Phosphor
pQCT	Periphere Quantitative Computertomographie
PYD	Pyridinolin
RANKL	RANK Ligand
REE	Rare Earth Elements, Seltene Erden
ROI	Region of Interest
SD	Standardabweichung
SHAM	scheinoperiert
SPA	Single Photon Absorptiometry
SPF	Spezifisch pathogenfrei
T <sub>3</sub>	Trijodthyronin
T <sub>4</sub>	Tetrajodthyronin
TCA	Trichloressigsäure
TGF- $\beta$	Tumor Growth Factor- $\beta$
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TS	Trockensubstanz
US	Ursprüngliche Substanz
vs	gegen
1, 25 (OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1 $\alpha$ 25-Dihydroxycholecalciferol
25 (OH) D <sub>3</sub>	25-Hydroxycholecalciferol

## Symbole

Symbol	Erklärung
?	fraglich, nicht bekannt
-	nicht geeignet
+	geeignet
++	gut geeignet
+++	sehr gut geeignet
$p < 0,05$	Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5%, dass zwischen den beiden verglichenen Gruppen kein signifikanter Unterschied besteht (signifikant)
$p < 0,01$	Irrtumswahrscheinlichkeit unter 1%, dass zwischen den beiden verglichenen Gruppen kein signifikanter Unterschied besteht (hoch signifikant)
$p < 0,001$	Irrtumswahrscheinlichkeit unter 0,1%, dass zwischen den beiden verglichenen Gruppen kein signifikanter Unterschied (hoch signifikant)
*	( $p < 0,05$ ) vs OVX
**	( $p < 0,01$ ) vs OVX
***	( $p < 0,001$ ) vs OVX
#	( $p < 0,05$ ) vs SHAM
##	( $p < 0,01$ ) vs SHAM
###	( $p < 0,05$ ) vs SHAM

# 1 Einleitung und Problemstellung

Der Krankheitskomplex der Osteoporose betrifft mehr als 75 Millionen Menschen in den westlichen Industriestaaten und ist allein in Amerika und Europa für 2,3 Millionen Knochenfrakturen im Jahr verantwortlich. Die Osteoporose wird von der WHO zu den 10 bedeutsamsten Erkrankungen gezählt und ist als Skeletterkrankung mit niedriger Knochenmasse und einer Störung der Mikroarchitektur mit konsekutiv erhöhter Knochenbrüchigkeit und erhöhtem Frakturrisiko definiert.

Die augenblicklichen Behandlungsansätze fortgeschrittener Osteoporosestadien zeigen keine befriedigenden Ergebnisse, so dass die Erforschung präventiver Massnahmen nach wie vor im Mittelpunkt des medizinischen Interesses steht.

Die etablierten Präparate zur Prävention der Osteoporose wie die Hormonersatztherapie oder der Einsatz von Bisphosphonaten können starke Nebenwirkungen aufweisen, so dass die Suche nach einem geeigneten Alternativwirkstoff von aktuellem Interesse ist. Beim therapeutischen Einsatz von Lanthancarboxylat als Phosphorfänger bei Dialysepatienten wurde ein möglicherweise positiver Einfluss auf die Knochendichte beobachtet. Aufgrund dessen sollten in dieser Studie die knochenprotektiven Eigenschaften der Seltenen Erden unter kontrollierten Bedingungen am Tiermodell untersucht werden.

Bei den Seltenen Erden handelt es sich um 17 chemische Elemente, die zur dritten Nebengruppe des Periodensystems gehören. In der chinesischen Landwirtschaft finden Seltene Erden als Leistungsförderer bei Pflanzen und bei zur Lebensmittelgewinnung dienenden Tieren mit großem Erfolg Anwendung. Die orale Verabreichung führt zu einer verbesserten Futtermittelverwertung und höheren Gewichtszunahmen. In den letzten 7 Jahren konnten diese Effekte auch unter westlichen Haltungs- und Fütterungsbedingungen nachgewiesen werden.

In dieser Untersuchung sollte der Einfluss der Seltenen Erden auf den Knochenstoffwechsel erstmals am Modell der ovariectomierten Ratte als „small animal model“ für die Postmenopausale Osteoporose geprüft werden.

Als Parameter der Knochenresorption sollte die Exkretion von Pyridinolin und Desoxypyridinolin im Urin, und als Parameter für die Knochenformation sollte die Osteocalcinkonzentration im Serum gemessen werden. Die Messungen weiterer Parameter des Knochenstoffwechsels wie Knochengewicht, Knochenlänge, Knochenaschegehalt und Mineralstoffgehalt sollten durch die Knochendichtemessung mit Hilfe Peripherer Quantitativer Computertomographie und Mikrocomputertomographie vervollständigt werden. Mit Hilfe dieser Parameter sollen Aussagen über mögliche knochenprotektive Eigenschaften der Seltenen Erden getroffen werden.

## 2 Literatur

### 2.1 Seltene Erden

#### 2.1.1. Einteilung und Stellung im Periodensystem

Als Seltene Erden werden 17 chemische Elemente bezeichnet, die in der dritten Nebengruppe des Periodensystems zu finden sind.

Der Begriff „Seltene Erden“, im Englischen rare earth elements (REE), bezeichnet im eigentlichen Sinn die Oxide der nachfolgend aufgezählten Seltenerdmetalle (COTTON und WILKINSON, 1966).

Die Gruppe der Lanthanoide besteht aus Lanthan (La, 57) und weiteren 14 Elementen: Cer (Ce, 58), Praeseodym (Pr, 59), Neodym (Nd, 60), Promethium (Pm, 61), Samarium (Sm, 62), Europium (Eu, 63), Gadolinium (Gd, 64), Terbium (Tb, 65), Dysprosium (Dy, 66), Holmium (Ho, 67), Erbium (Er, 68), Thulium (Tm 69), Ytterbium (Yb, 70) und Lutetium (Lu, 71).

Lanthan bis Euritium gehören zu den sogenannten Ceriterden oder leichten Seltenen Erden, welche durch Ordnungszahlen von 57 bis 63 klassifiziert sind. Die schweren Seltenen Erden (von Gadolinium bis Lutetium) besitzen Ordnungszahlen von 64 bis 71.

#### 2.1.2. Vorkommen der Seltenen Erden

Die Übergangsmetalle der Seltenen Erden machen 0,01-0,02 % der Erdkruste aus und sind damit nicht so selten, wie es der Name vermuten lässt. Lanthan und Cer kommen in der Erdkruste dabei in ähnlich hohen Konzentrationen vor, wie das essentielle Mengenelement Cobalt (SÜSS, 2004).

Unter natürlichen Bedingungen sind die Seltenen Erden als Silikate, Oxide, Carbonate, Phosphate und Halogene an Mineralien gebunden, wobei es sich nach der Harkinsregel vor allem um Elemente mit gerader Ordnungszahl handelt. Als wichtige Vertreter der Lanthanoidmineralien sind Monazit und Bastnäzit, Cerit und Allanit, welche vor allem die Ceriterden enthalten, sowie Thalenit, Thortveiti und Xenotim, in denen die Yttererden vorherrschen, zu nennen. Eutenit und Betafit sind Beispiele für Erze in denen Ceriterden und Yttererden zu gleichen Teilen vorkommen (HENDERSON, 1984).

Während die Seltenen Erden in basischen Gesteinen auf eine Vielzahl von Mineralien verteilt sind, können Sie in sauren Gesteinsarten und hydrothermalen Lösungen in wesentlich höheren Konzentrationen vorkommen. Hohe Anreicherungen von Seltenen Erden sind in Alkaligesteinskomplexen und Karbonatiden zu finden.

Die weltweit größten Vorkommen von Seltenen Erden befinden sich in der Volksrepublik China (EVANS, 1990). China stellt mit 80 % der weltweiten Ressourcen auch den Hauptabbauort auf dem Weltmarkt dar (BROWN et al., 1990; PANG et al., 2002). Neben den

Ablagerungsstätten in China werden die Seltenen Erden aber weltweit abgebaut: So in den USA, Zaire, Südafrika, Brasilien, Indien, Malawi, Westaustralien, der Türkei, den USA und auf Madagaskar.

Von wirtschaftlichem Interesse ist vor allem der Abbau von Bastnäsit und Monazit. In beiden Mineralien finden sich Anreicherungen von leichten Seltenen Erden. Bastnäsit wird überwiegend in China, den USA, Zaire und auf Madagaskar abgebaut (BLUME, 2001).

Beim Abbau des Monazits spielen die primären Ablagerungsstellen kaum eine Rolle. Sie sind durch niedrige Konzentrationen und äußerst hartes Begleitgestein gekennzeichnet. Daher nutzt man die durch Verwitterungsprozesse entstandenen sekundären Ablagerungsstätten. Hierbei handelt es sich vor allem um die sogenannten Monazitsande mit Lagerstätten in Südafrika, Brasilien, Indien, Malawi, Westaustralien, der Türkei und den USA.

### 2.1.3 Chemische und physikalische Eigenschaften der Seltenen Erden

Die Seltenen Erden weisen sehr ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften auf. Aus diesem Grund war es in der Vergangenheit sehr schwierig eine klare Trennung zwischen den verschiedenen Elementen herzustellen. Als Elemente haben sie eine silberne Farbe, sind relativ weich und liegen zumeist in der hexagonal dichtesten Kugelpackung vor. Die Hauptähnlichkeit der Eigenschaften dieser Elemente ist auf die gleiche Besetzung der äußeren Elektronenhülle ( $5p^6 6s^2$ ) zurückzuführen.

Die Seltenen Erden werden auch als f-Elemente bezeichnet. Dieser Bezeichnung liegt zugrunde, dass lediglich durch die Unterschiede des 4f-Niveaus eine Differenzierung zwischen den einzelnen Elementen erstellt werden kann.

Die 4f- Niveaus nehmen allerdings an keinerlei chemischen Reaktionen teil, da sie durch die äußere Elektronenhülle abgeschirmt werden. Durch das Auffüllen der 4f-Niveaus entsteht eine weitere Besonderheit dieser Stoffgruppe: Die sogenannte Lanthanidenkontraktion. Dieser Effekt entsteht durch den Anstieg der Protonenzahl im Kern bei einer höheren Zahl von Elektronen des 4f-Niveaus. Demzufolge werden die Ionen- und Atomradien mit steigender Ordnungszahl immer kleiner (COTTON und WILKINSON, 1966), da die Elektronenschale fester an den Kern gebunden wird (WYTENBACH et al., 1997).

Die Lanthanoide kommen zumeist als dreiwertige Kationen vor, wobei jedoch selten auch zweiwertige Formen der Elemente Sm, Eu, Tm und Yb und vierwertige Formen von Ce, Pr, Nd, Tb, Dy und Ho auftreten können (EVANS, 1990).

Die vorherrschende Bindungsart der Seltenen Erden ist die ionische Bindung. Daneben gibt es aber durchaus auch Komplexverbindungen mit Komplexzahlen zwischen 6 und 12. Als

Chlorid-, Bromid-, Nitrat-, und Sulfat-Salze gehen die Lanthanoide Verbindungen ein, die wasserlöslich sind. Als Oxide, Hydroxide, Phosphate, Oxalate, Carbonate und Fluoride sind sie in Wasser nur schwer löslich. Mit sinkendem pH- Wert steigt allerdings die Löslichkeit der Hydroxide, Phosphate und Carbonate (DIATLOFF et al., 1996). Bei den früheren Trennungsvorgängen wurden die unterschiedlichen Löslichkeiten ausgenutzt; heutzutage werden die Seltenen Erden aufgrund ihrer Tendenzen zur Komplexbildung meist mit Ionenaustausch- und Extraktionsverfahren getrennt.

Eine hohe geometrische Variabilität ist kennzeichnend für diese Komplexe, was Ihnen unter anderem erlaubt mit biologischen Calciumbindungsstellen zu interagieren und Calciumionen isomorph zu ersetzen (BIRNBAUM et al., 1970; EVANS, 1990). Die Tabelle 2.1 fasst die Haupteigenschaften von Calcium und Lanthanoiden zusammen. Gemeinsam haben Calcium und Lanthan, dass beide keine signifikanten kovalenten Bindungen zeigen (EVANS, 1983).

Tabelle 2.1: Die Eigenschaften von Calcium und Lanthanoiden (nach EVANS, 1990)

<b>Eigenschaft</b>	<b>Calcium</b>	<b>Lanthanoide</b>
Koordinationsnummer	6-12	6-12
Koordinationsgeometrie	hochflexibel	hochflexibel
Donoratompräferenz	O >>N>>S	O>>N>>S
Ionenradius	1,00-1,18	0,86-1,22
Bindungsart	ionisch	ionisch
Diffusionskoeffizient	1,34	1,30 (La)
Stabilisierung im Kristallfeld	keine	unwesentlich

Wie aus der Tabelle hervorgeht, sind Calciumionen und Lanthanoidionen in ihrer Größe, in ihrer Bindungsart und der Donoratompräferenz nahezu gleich. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten ist es den Lanthanoiden möglich, Calcium bei einer Reihe von Reaktionen zu ersetzen (BIRNBAUM et al. 1970; EVANS, 1990). Viele der spezifischen Bindungsstellen für Calcium im Körper sind so angelegt, dass es zu keiner Bindung von anderen Metallionen, wie zum Beispiel des Magnesiums kommen kann. Vor allem intrazellulär ist dieses besonders wichtig, da niedrige Calciumkonzentrationen hier den sehr viel höheren Konzentrationen an Magnesium gegenüberstehen. Lanthanionen besitzen allerdings die Fähigkeit, Calcium an vielen seiner spezifischen Bindungsstellen zu ersetzen.

Allerdings gibt es auch calciumspezifische Bindungsstellen, an denen kein Ersatz der Calciumionen durch Lanthan möglich ist: Ein Beispiel ist das Concanavalin A. Wenn eine hydrophobe Umgebung vorhanden ist, kann es zu einer nichtspezifischen Bindung des Lanthans an umgebende Ionen kommen, so dass die Lanthanionenkomplexe zu groß

geworden sind, um die jeweilige Bindungsstelle zu besetzen. Es hängt also vom Ionenradius ab, ob Lanthanionen Calciumionen ersetzen können. Je ähnlicher die Ionenradien, desto eher ist eine Bindung des Lanthans möglich.

## 2.1.4. Verwendung der Seltenen Erden

### 2.1.4.1. Verwendung in der Industrie

Aufgrund ihrer ausgeprägten magnetischen, magnetoptischen, röntgenstreuenden und lumineszenzmikroskopischen Eigenschaften finden Seltene Erden einen breitgefächerten Einsatz in der Metallurgie, Radiologie, der Herstellung von Katalysatoren und Leuchtstoffröhren und in der Glas- und Keramikindustrie. Die Metallurgie stellt mit einem Verbrauch von ca. 42% der gewonnenen Lanthanoide den größten Abnehmer dar. Seltene Erden zeichnen sich durch ein hohes Reaktionsvermögen aus, so dass sie als Reduktionsmittel benutzt werden. Desweiteren verbessert ihr Einsatz maßgeblich die Belastbarkeit und Verformbarkeit von nicht rostenden Stählen. Etwa 30 % der gewonnenen Seltenen Erden werden für den Katalysatorenbau und als chemische Zusatzstoffe benutzt. Weitere 31% verbraucht die Glas- und Keramikherstellung. Lanthan verbessert die Brechzahl und Dispersion in optischen Gläsern und Linsen.  $\text{CeO}_2$  kommt als Poliermittel von Gläsern zum Einsatz. Zur Herstellung von Hochleistungsmagneten und Supraleitern sind Seltene Erden ebenso unabdingbar, wie zum Aufschluss von Kohlenwasserstoff in der Erdölindustrie.

### 2.1.4.2. Verwendung in der Landwirtschaft

Ein weiteres Einsatzgebiet der Seltenen Erden hat sich in China in den letzten 40 Jahren entwickelt, und zwar als Leistungsförderer in der Landwirtschaft. CHANG et al. (1998) beschreiben sowohl eine Anwendung bei Pflanzen, als auch bei zur Lebensmittelherstellung dienenden Tieren. Diese Studien berichten über eine Verbesserung der Futtermittelverwertung und über eine enorme Leistungssteigerung. Auch wird die Verbesserung der Qualität von tierischen Produkten unter dem Fütterungseinfluß von Seltenen Erden beschrieben.

Tabelle 2.2: Der Fütterungseinfluss von Seltenen Erden in der chinesischen Tierproduktion

Spezies	Dosierung der REE pro kg Futter	Effekte	Autoren
Broiler	500 mg/ Seltene Erden-Fumarat	+12,27% GZ	YANG et al. (2005)
		-13,14% FV	
Broiler	300 mg / kg Seltene Erden-Nitrat (38,7%) und Seltene Erden-Oxid	+ 20,3 % GZ	ZHANG und SHAO (1995)
	400 mg / kg Seltene Erden+Nitrat (38,7%) und Seltene Erden-Oxid	+18,6 % GZ	
	500 mg Seltene Erden+Nitrat (38,7%) und Seltene Erden Oxid	+ 6,6 % GZ	
Broiler	65 mg organische Seltene Erd-Verbindungen	+6,3 % GZ	XIE und WANG (1998)
	130 mg organische Seltene Erd-Verbindungen	+10,71 % GZ	
	195 mg organische Seltene Erd-Verbindungen	- 0,09 % GZ	
Schwein	100 mg Seltene Erden-Ascorbat	+ 8 % GZ -8 % FV	CHEN (1997)
	130 mg Seltene Erden-Citrat	+ 25 % GZ - 19 % FV	
Schwein	200 mg Seltene Erden-Mischung (22,75 La; 10,42% Ce.; 3,0%Pr.; 2,14%; Nd; 0,58%Sm; 0,09%Eu; 0,11%Gd.)	+ 3,97 % GZ - 1,66 % FV	HU et al. (1999)
	400 mg Seltene Erden-Mischung	+ 8,93 % GZ - 4,65 % FV	
	600 mg Seltene Erden-Mischung	+ 32,34 % GZ - 11,29 FV	
Schwein	100 mg Lanthansalze	+ 13,26 % GZ - 8,50 % FV	XU et al. (1999)
Schwein	100m Lanthan-Chlorid	+12,95% GZ	LIU (2005)
		-6,78% FV	

GZ = Gewichtszunahme FV = Futterverwertung

Als Beispiel für eine Studie, in der äusserst spektakuläre Verbesserungen der Gewichtszunahmen erreicht wurden, ist die Veröffentlichung von HU et al. (1999) anzuführen: Die Arbeitsgruppe erreichte durch die Zugabe von 600 mg Seltenen Erden pro Kilogramm Futter bei Ferkeln eine Wachstumssteigerung von 32% mit einer gleichzeitigen Verbesserung der Futtermittelverwertung.

LI et al. (1992) versetzten das Versuchsfutter mit einem Gemisch von Seltenen Erden, wobei pro Kilogramm Futter 50 mg der Seltenen Erden Mischung zugesetzt worden sind. Die Tageszunahmen wurden um 9% und die Futtermittelverwertung um 8% gesteigert.

In diesem Versuch wurden nicht nur die Futtermittelverwertung und die Gewichtszunahme untersucht, sondern auch die Verdaulichkeit der Rohnährstoffe. Durch den Einsatz des Seltenen Erden Gemisches wurde sowohl die Verdaulichkeit von Rohprotein, als auch von Rohfett um 8% beziehungsweise um 15% verbessert. Die Verdaulichkeit der Trockensubstanz war von den Verbesserungen nicht betroffen. Ferner konnten HU et al. (1999) eine signifikante Verbesserung der scheinbaren Verdaulichkeit von Rohprotein um 4,5% beziehungsweise 6,9% nachweisen. In diesem Versuch wurden 600 mg Seltene Erden pro Kilogramm Futter zugemischt. Bei einer Dosierung von 400 mg Seltenen Erden pro Kilogramm Futter erhöhte sich die scheinbare Verdaulichkeit der essentiellen und nicht essentiellen Aminosäuren signifikant um 3,1% und 3,4%. Der Einfluss der Fütterung der 600 mg-Dosis führte zu ähnlichen Ergebnissen.

Weitere Studien beschäftigten sich darüber hinaus mit dem Einfluss der Fütterung von Seltenen Erden auf den Hormonhaushalt. XU et al. (1999) beschreiben, dass Lanthan sowohl die Synthese, als auch die Sekretion des somatotropen Hormons oder Wachstumshormons (Growth Hormon) stimuliert. Auch die Schilddrüsenhormone T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> scheinen dem stimulierenden Einfluss von Lanthan zu unterliegen.

Die Verabreichung der Seltenen Erden erfolgt oral, entweder als Einmischung in das Futter, oder über das Trinkwasser. Sowohl Oxide, als auch Nitrate und organische Salze werden benutzt. Eine Vergleichbarkeit der einzelnen Studien ist aber leider nicht ohne Vorbehalt gegeben, da sich die eingesetzten Mischungen in Zusammensetzung, Reinheitsgrad, Konzentration und den verschiedenen Seltenen-Erd-Verbindungen voneinander unterscheiden. Außerdem muss auch die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die europäische Tierhaltung kritisch betrachtet werden, da die europäischen Leistungsstandards einer industrialisierten Tierhaltung nicht ohne weiteres mit der Situation in China vergleichbar sind. In Bezug auf die Futtermittelverwertung und die Produktivität liegen die meisten, in China eingesetzten Rassen, hinter den Hochleistungstieren aus dem Westen zurück (XIE et al., 1995). Daher gab es in den letzten Jahren eine Reihe von verschiedenen Fütterungsversuchen in der westlichen Welt, um die spektakulären Leistungssteigerungen

unter dem Einfluss der Fütterung von Seltenen Erden unter westlichen Versuchs- und Haltungsbedingungen nachvollziehen zu können. Das Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der LMU-München hat in den letzten Jahren diverse Studien durchgeführt, die sich mit dem Einsatz von Seltenen Erden in der Fütterung bei Schweinen, Broilern und Wachteln beschäftigt haben. Die ersten Versuchstiere bei den Untersuchungen zum Einfluss der Fütterung von Seltenen Erden waren Absatzferkel. Die Versuchsgruppe wurde mit einer Seltenen Erden-Chlorid Mischung in einer Dosis von 150 mg beziehungsweise 300 mg pro Kilogramm Futter gefüttert. Es konnten Gewichtssteigerungen zwischen 2% und 5% protokolliert werden. Die Futtermittelverwertung verbesserte sich um 3% bis 7%. RAMBECK et al. (1999) konnten somit nachweisen, dass die Leistungssteigerung und die gesteigerte Futtermittelverwertung bei diesem Versuchsmodell auch unter westlichen Tierhaltungsbedingungen zu erzielen waren.

Anders gestaltete sich der Zusammenhang in nachfolgenden Versuchen mit japanischen Wachteln und Broilern (SCHULLER, 2001). Bei beiden Tierspezies konnten weder Verbesserungen in der Aufzuchtleistung, noch der Legeleistung nachgewiesen werden. Nach dem Versuchsende wurde die Darmflora der Tiere analysiert. Auch hier konnten weder qualitative noch quantitative Veränderungen in der Zusammensetzung der gastrointestinalen Flora im Vergleich zu unbehandelten Tieren festgestellt werden.

Um eine Akkumulation in den Organen durch die Fütterung der Seltenen Erden zu untersuchen, wurden im Anschluss an die beiden geschilderten Versuche Organe entnommen (SCHULLER, 2001). Als Ergebnis der Analyse der Organe ist festzuhalten, dass eine Akkumulation von Seltenen Erden nur in sehr geringem Maße stattfand. Dieses steht im Widerspruch zur Veröffentlichung von FLECKENSTEIN et al. (2004). In diesem Versuch mit Broilern waren die Konzentrationen der Seltenen Erden vor allem in der Leber und den Brustmuskeln erhöht, obwohl die Menge an Seltenen Erden im Futter mit 100 mg/kg um 50 mg/kg geringer war, als bei dem vergleichbaren Versuch von SCHULLER (2001). FLECKENSTEIN et al. (2004) fanden Konzentrationen von 147 µg/kg in der ersten Versuchsgruppe und 56 µg/kg in der zweiten Versuchsgruppe in der Leber und 45 beziehungsweise 28 µg/kg im Brustmuskel. Die von SCHULLER (2001) vorgefundenen Konzentrationen sind mit 29 µg/kg in der Leber und 9,4 µg/kg im Brustmuskel deutlich geringer.

Tabelle 2.3: Ergebnisse von Fütterungsversuchen unter westlichen Bedingungen und die verwendeten Seltenen Erden Bindungsformen bei Schweinen

Versuchsgruppen	Bindungsform	Dosierung der REE pro kg Futter	Effekte	Autoren
Absatzferkel	REE-Chlorid	75 mg	+ 2 % GZ - 4-5 % FV	RAMBECK et al. (1999)
		150 mg	+ 0-5 % GZ -3-7 % FV	
Mastschwein	REE-Chlorid	300 mg	+ 12 GZ - 11 FV	HE und RAMBECK (2000)
Mastschwein	REE-Chlorid	100 mg	- 3,6 % GZ	BÖHME et al. (2002)
	REE-Nitrat		- 3,6 % GZ	
	REE-Ascorbat		- 3,4 % GZ	
	REE-Citrat		- 1,1 % GZ	
Schwein	REE-Chlorid	300 mg	+ 4-5 % GZ	EISELE (2003)
		200 mg	+ 3-10 % GZ - 2-9 % FV	
Mastschwein	REE-Citrat	200 mg	+ 9 % GZ - 3,6 % FV	KESSLER (2004)
Ferkel	REE-Citrat	50 mg	+ 0,4 % -1,8 %	KNEBEL (2004)
		100 mg	+ 8,6 % -5,5 %	
		200 mg	+ 22 % -5,5 %	
Ferkel	REE-Citrat	150 mg	+/- 0 % - 9 %	PRAUSE et al. (2004)
		300 mg	+/- 0 % +/- 0 %	
Ferkel	REE-Citrat	200 mg	- 3 % GZ + 1 %FV	KRAATZ et al. (2004)
			+ 1 %GZ + 3 % FV	
Ferkel	REE-Citrat	150 mg	- 4 % GZ - 1 % FV	GEBERT et al. (2005)
		300 mg	- 4 % GZ - 4 % FV	
Ferkel	REE-Citrat	100 mg	+ 6,3 % GZ	FÖRSTER et al. (2006)
		200 mg	- 4,3 % FV	

GZ = Gewichtszunahme FV = Futtermittelverwertung

HALLE et al. (2002) konnten in einem Mastversuch mit männlichen Broilern durch die Zugabe von Seltenen Erden- Ascorbat sowohl Steigerungen der Gewichtszunahme von 2%

bis 7%, als auch eine signifikante Verbesserung der Futtermittelverwertung dokumentieren. Im Gegensatz dazu führte die Supplementierung von Seltenen Erden im Schweinefutter zu einer Verschlechterung der Mastleistung um 1,1% bis 3,6% (BÖHME et al., 2002). Auch eine Verbesserung der Verdaulichkeit der Rohrnährstoffe durch verschiedene Lanthanoidzusätze wurde nicht bestätigt.

Tabelle 2.4: Ergebnisse von Fütterungsversuche unter westlichen Bedingungen und die verwendeten Seltenen Erden-Bindungsformen bei anderen Spezies

<b>Versuchstiere</b>	<b>Bindungsform</b>	<b>REE-Dosierung</b>	<b>Effekte</b>	<b>Autoren</b>
Broiler und Japanische Wachtel	REE-Chlorid	150 mg / kg	Keine Verbesserung in Aufzucht und Mastleistung	SCHULLER (2002)
		300 mg / kg		
		75 mg / kg		
		150 mg / kg		
		300 mg / kg		
Broiler	REE-Chlorid	100 mg / kg	+ 5 % GZ	HALLE et al. (2002)
	REE-Nitrat		+2 % GZ	
	REE-Ascorbat		+7 % GZ	
	REE-Citrat		+ 6,5 % GZ	
Broiler	REE-Chlorid	40 mg / kg	+ 4,2% GZ - 4,9% FV	HE et al. (2006)
	REE-Citrat	70 mg / kg	+ 5,4% GZ	
Kälber	REE-Citrat	300 mg / kg	Keine Verbesserung in der Mastleistung	MILLER (2006)
	REE-Citrat			
Kälber	REE-Citrat	200 mg / kg	+14,6 % GZ - 7,8 % FV	MEYER et al. (2006)
Nile Tilapia (Fisch)	REE-Chlorid	50 mg / kg	+18,7 %GZ -13,3% FV	TAUTENHAHN (2004)
		100 - 400 mg / kg	Keine Verbesserung in der Mastleistung und Futtermittelverwertung	
Regenbogenforellen	REE-Citrat	100 mg / kg	Keine Verbesserung in der Mastleistung und Futtermittelverwertung	RENARD (2005)
		200 mg / kg		
		400 mg / kg		
Karpfen	REE-Citrat	400 mg / kg	Keine Verbesserung in der Mastleistung und Futtermittelverwertung	RENARD (2005)

GZ = Gewichtszunahme

FV = Futtermittelverwertung

Die Münchner Arbeitsgruppe konnte anschließend aber in einer weiteren Studie signifikante Steigerungen der täglichen Lebendmassezunahmen um 19% ( $p < 0,05$ ) und eine hochsignifikante Verringerung des Futteraufwandes um 11% ( $p < 0,01$ ) bei einer Versuchsgruppe aus Mastschweinen nachweisen, deren Futter mit einer Seltenen Erden-Chlorid Mischung supplementiert worden sind (HE et al. 2001). Verbesserte Leistungsparameter konnten auch in der Aufzuchtphase dargestellt werden.

Warum durch die Fütterung von Seltenen Erden eine Leistungssteigerung erreicht werden kann, ist nach wie vor nicht hinreichend geklärt. In der chinesischen Literatur werden vor allem zwei Wirkmechanismen diskutiert: Auf der einen Seite könnten Seltene Erden aufgrund einer lokalen Wirkung im Intestinaltrakt zu einem ergotropen Effekt führen, und auf der anderen Seite wird Ihnen eine Beeinflussung des Intermediärstoffwechsels zugeschrieben (HE et al., 2003; XIE et al., 1995). Da Seltene Erden im Allgemeinen einer äußerst geringen Resorption aus dem Gastro-Intestinaltrakt unterliegen (DURBIN, 1956; JI, 1985; EVANS, 1990), erscheint die lokale Wirkung im Darm als die schlüssigere Erklärung. In einigen Studien wird über die Verbesserung der Verfügbarkeit und Verdaulichkeit von Nährstoffen berichtet (LI et al., 1992; XU et al., 1998). Diese Theorie konnte allerdings durch die bereits angeführte Studie von BÖHME et al. (2002) nicht bestätigt werden. Seltene Erden besitzen in vitro konzentrationsabhängig einen Einfluss auf das Wachstum von Bakterien. In niedrigen Konzentrationen führen sie zu einer Stimulierung des Bakterienwachstums, während bei hohen Konzentrationen ein bakteriostatischer Effekt eintritt (MUROMA, 1958). Es ist also eine Interaktion mit den Bakterien der Darmflora möglich. Studien von SCHULLER (2002) konnten aber weder quantitative noch qualitative Unterschiede in der gastrointestinalen Flora nach der Supplementierung des Futters mit Seltenen Erden feststellen. Auch ein ergotroper Effekt konnte im Verlauf dieser Studie nicht bestätigt werden.

Die gemessenen Veränderungen von Enzymaktivitäten und Hormonspiegeln aus dem Blut sprechen für eine Beeinflussung des Intermediärstoffwechsels durch die Fütterung von Seltenen Erden. Auch hier widersprechen sich die Ergebnisse der verschiedenen Studien: Während HE et al. (2003) signifikant erhöhte Leberenzymwerte, XIE et al. (1995) eine erhöhte Gluthationperoxidasaktivität, einen erhöhten Wachstumshormon- und Trijodthyroninspiegel bei erniedrigtem Thyroxinspiegel dokumentierten, fanden BORGER (2003) und EISELE (2003) signifikant erniedrigte Trijodthyroninspiegel vor.

Daneben kann es zu Interaktionen mit Rezeptoren durch die Konkurrenz mit Calciumionen oder zu einer immunstimulierenden Wirkung durch die Supplementierung von niedrigen Konzentrationen Seltener Erden kommen. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der Wirkmechanismus für die leistungssteigernden Effekte der Seltenen Erden bis heute nicht geklärt ist.

### 2.1.4.3 Verwendung in der Humanmedizin

Bereits kurz nach Ihrer Entdeckung wurden Versuche unternommen, die mannigfaltigen Eigenschaften der Seltenen Erden (antimikrobiell, antiviral, antiemetisch, antikarzinogen, antikoagulatorisch) für die Humanmedizin pharmakologisch zu nutzen. Oral verabreichtes Ceriumoxalat war ein verbreitetes Therapeutikum um die Übelkeit während der Schwangerschaft zu behandeln (EVANS 1990). Zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts wurde es allerdings durch andere Medikamente ersetzt. Aufgrund der antimikrobiellen Eigenschaften versuchte man Seltene Erden zur Behandlung von Tuberkulose, Cholera und Lepra zu verwenden. Die Wirkung blieb aber weit hinter den Erwartungen zurück. 1956 berichteten HUNTER und WALKER über den Antagonismus der Seltenen Erden und Calcium in Bezug auf die Blutgerinnung. Calcium wird für die letzten vier Reaktionen der Gerinnungskaskade benötigt. Durch die Competition mit Calcium kommt es daher zu einer Blockade der für die Blutgerinnung nötigen enzymatischen Reaktionen. Außerdem wird den Seltenen Erden ein hemmender Effekt auf die Plättchenaggregation zugeschrieben. Allerdings kam es bei den Patienten zu massiven Nebenwirkungen, wie Fieber, Muskelschmerzen und abdominalen Krämpfen. Daher wurden die Seltenen Erden auch in diesem medizinischen Anwendungsbereich durch nebenwirkungsärmere Präparate ersetzt (EVANS 1990). Zur Zeit finden die Seltenen Erden bei der Behandlung von Verbrennungen, der Therapie und Diagnose von Krebs und als Phosphatbinder Verwendung.

Die Haupttodesursache im Anschluss an Verbrennungen stellt neben dem Schock die Infektion der betroffenen Areale da. Cerium-Silber-Sulfadiazin wird seit den Siebziger Jahren zur Verhinderung der Wundinfektionen bei Brandopfern eingesetzt. Neben seinen antiinflammatorischen Eigenschaften fördert es zudem die Wundheilung.

Seit dem frühen zwanzigsten Jahrhundert wird die inhibitorische Wirkung der Seltenen Erden auf Krebszellen untersucht. LEWIN (1924) und COHN (1925) stellten Reduktion der Tumorgroße durch die Applikation von Cerium III-Iodid bei Morbus Hodgkin-Patienten fest. Vor allem in der chinesischen Literatur ist eine Reihe von Publikationen erschienen, welche die antikarzinogenen Eigenschaften der Seltenen Erden belegen. Auch JAKUPEC et al. (2002) konnten einen zytotoxischen Effekt von Seltenen Erden auf Krebszellen nachweisen. Nichts desto trotz werden die Ergebnisse der Studien nach wie vor kontrovers diskutiert. Durch die Fähigkeit  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Strahlen zu emittieren werden Lanthanoide in der Krebsdiagnose zur Detektion von Knochenmetastasen im Verlauf von Brustkrebs- und Prostatakrebskrankungen eingesetzt.

Der dritte augenblickliche Anwendungsbereich der Seltenen Erden stellt die Niereninsuffizienz und die daraus resultierende Hyperphosphatämie und Osteodystrophie dar (LOCATELLI et al., 2003; JOY et al., 2003). Das als Phosphatbinder wirkende

Alternativtherapeutikum Lanthancarboxat wird unter dem Namen Fosrenol® (Firma Shire, Chesterbrook, USA) vertrieben.

In der Humanmedizin wird Lanthancarboxat in der Therapie der Hyperphosphatämie bei Niereninsuffizienzen eingesetzt. Die bereits etablierten Medikamente wiesen gewisse Nebenwirkungen auf, so dass die Suche nach einem geeigneten Alternativtherapeutikum begann, welches die positiven pharmakologischen Eigenschaften ohne die starken Nebenwirkungen aufweisen sollte.

Ein Hauptproblem bei der Niereninsuffizienz ist neben der Hyperphosphatämie die renale Osteodystrophie. Die Hyperphosphatämie entsteht, da die insuffiziente Niere nicht mehr fähig ist, die adäquaten Mengen an Phosphor auszuschcheiden.

Bei der renalen Osteodystrophie kommt es durch die Einschränkung der Nierenfunktion zu einer verminderten Produktion von  $1,25\text{ (OH)}_2\text{ D}_3$  ( $1\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$ ). Diese biologisch aktivste Form des Vitamin D wird in der Niere aus Vitamin  $\text{D}_3$  umgewandelt.

Die Verminderung von  $1,25\text{ (OH)}_2\text{ D}_3$  ( $1\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$ ) führt zu einem Abfall des Calciumspiegels, welcher durch die Einschränkung der Nierenfunktion in Bezug auf die Calciumausscheidung auch nicht mehr kompensiert werden kann. Außerdem findet auch eine verminderte Calciumaufnahme aus dem Darm statt, da es zu einem Mangel des Calciumtransportproteins in der Darmschleimhaut kommt.

Aus den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüse wird vermehrt Parathormon abgegeben, so dass ein sekundärer Hyperparathyreoidismus entsteht. Verstärkt wird der Abfall des Serumcalciums noch durch die verminderte renale Phosphorausscheidung. Aufgrund des hohen Parathormonspiegels kommt es zu einer fortschreitenden Mobilisierung von Calcium aus dem Knochen und damit zur renalen Osteodystrophie.

Die verminderte Phosphatausscheidung durch die renale Insuffizienz führt zu zahlreichen Entgleisungen im Calciumstoffwechsel, da freies Calcium entsprechend dem Massewirkungsgesetz eine sehr schlecht lösliche Verbindung mit dem überschüssigen Phosphat zu Calciumphosphat eingeht. Wenn die Konzentration von Calcium und anorganischen Phosphat im Blut 60 mg/dl überschreitet, fällt die Verbindung als Kalzifikation sowohl in Gefäßen, als auch im Bindegewebe aus.

Aufgrund dieser Vorgänge ist die Hyperphosphatämie an einem nicht zu vernachlässigendem Anteil der Todesfälle im Endstadium der Niereninsuffizienz beteiligt.

Die etablierten Phosphatbinder Calciumcarbonat und aluminiumhaltige Phosphatbinder haben, wie oben bereits erwähnt, verschiedene Nebenwirkungen.

Aufgrund der Therapie mit Calciumcarbonat kann es zu Hypercalcämien und metastatischen Verkalkungen kommen (HUTCHISON et al., 2004). Da die Bindungskapazität der eingesetzten Calciumsalze bezüglich der Bindung von Phosphor begrenzt ist, mussten hohe Dosen der Calciumsalze eingesetzt werden, die wiederum zu einem erhöhten

Verkalkungsrisiko führten. Vor dem Hintergrund des ohnehin schon gestörten Calciumstoffwechsels, stellt diese Nebenwirkung ein bedeutsames Problem für den Patienten dar, vergleichbar mit dem knochenschädigenden Einfluss der aluminiumhaltigen Phosphatbinder. Die gastrointestinale Resorption der angewendeten Aluminiumverbindungen über einen längeren Zeitraum kann zur Osteomalazie und adynamischem Knochenstoffwechsel führen. Auf der einen Seite wird die Quantität und die Aktivität der Osteoblasten verringert, auf der anderen die Mineralisation nachhaltig gestört. Darüberhinaus sind Störungen der Hämatopoese, der Nebenschilddrüsenfunktion und Myopathien beschrieben (BEHETS et al., 2001). JOY und FINN (2003) führen auch Arthropathien und Enzephalopathien als unerwünschte Nebenwirkungen einer Therapie mit aluminiumhaltigen Phosphatbindern an. Da die Elimination der aluminiumhaltigen Phosphatbinder vor allem über die Niere verläuft, muß der Einsatz beim niereninsuffizienten Patienten ebenfalls kritisch beurteilt werden. Von D`HAESE et al. (2003) wird ein erhöhtes Vergiftungsrisiko durch die renale Elimination der aluminiumhaltigen Phosphatbindern beschrieben.

## Lanthancarbonat

Bei der oralen Applikation von Lanthancarbonat wird es nur zu einem sehr geringen Teil resorbiert (BEHETS et al., 2004), und seine Verträglichkeit bei oraler Gabe wird als durchweg gut beschrieben. Es können sehr milde gastrointestinale Nebenwirkungen, wie Übelkeit und Erbrechen, sowie Nasenbluten, Verstopfung und Durchfall entstehen. D`HAESE et al. (2003) berichten, dass es im Verlauf ihrer Studie bei 53% der Patienten einmalig im Anschluss an die Einnahme von Lanthancarbonat zu milden gastrointestinalen Nebenwirkungen gekommen sei. SWAINSTON HARRISON und SCOTT (2004) weisen eine Inzidenz von weniger als 2% beim Auftreten von Nebenwirkungen durch die Einnahme von Lanthancarbonat nach.

Die Speicherung der geringen Konzentrationen von Seltenen Erden in den Knochen scheint zu keiner Einschränkung der natürlichen physiologischen Prozesse im Knochen zu führen (BEHETS et al., 2004).

Vielmehr zeigt die Studie von D`HAESE et al. (2003) anhand von histologisch ausgewerteten Knochenbiopsien von Patienten mit renaler Osteodystrophie, die über einen Zeitraum von einem Jahr Lanthancarbonat oral appliziert bekamen, dass es bei 5 von 7 Patienten, die unter einem zu niedrigen Knochen turnover litten, zu einer Rückkehr zum normalen Knochen turnover kam. Daneben normalisierte sich auch der Knochenstoffwechsel von 4 der untersuchten 5 Patienten, die unter einem sekundären Hyperparathyreoidismus litten. Lanthancarbonat verhindert die gastrointestinale Aufnahme von Phosphor. Aufgrund dessen

kommt es zur vermehrten Exkretion von Phosphor in den Fäces und eine verringerten Konzentration von Phosphor im Urin (LOCATELLI et al., 2003).

Als dreiwertiges Kation besitzt es eine hohe Affinität zu Phosphor, so dass bei in vitro-Studien, je nach pH, zwischen 66,6 % und 97,5% des vorhandenen Phosphates gebunden worden ist. Im Vergleich zu den etablierten Phosphatbindern weist Lanthancarboxonat eine ähnliche Phosphorbindungskapazität wie Aluminiumhydroxid auf. Bei einem pH von 3 übertrifft die Bindungskapazität sogar die des Calciumcarbonats (SWAINSTON HARRISON und SCOTT, 2004).

#### 2.1.4.4. Biochemische Eigenschaften

Lanthanoide besitzen die Eigenschaft in vitro mit vielen Zellbestandteilen zu reagieren. Unter anderem gibt es Interaktionen mit Aminosäuren, Plasmaproteinen, Phospholipiden, Enzymen, Nukleoproteinen, intermediären Metaboliten und inorganischen Phosphaten (DAS et al., 1988). Seltene Erden besitzen sowohl die Möglichkeit mit Membranproteinen zu interagieren, als auch die Fähigkeit in gesunde Zellen einzudringen (EVANS, 1990). Darüberhinaus wird von LIU et al. (2003) über einen Zunahme der Membranfluidität, eine Abnahme des Membranpotentials und über ein Anschwellen der Mitochondrien berichtet. Außerdem wird eine Freisetzung von Cytochrom C durch den Einfluss von Seltenen Erden beschrieben.

Auf Enzyme und Neurotransmitter wirken die Lanthanoide auf unterschiedliche Art und Weise. Auf der einen Seite können Lanthanionen die Cholinesterase und die Magnesium-ATPase hemmen, zum anderen auch Enzyme, wie zum Beispiel die Kinase C, aktivieren (WADKINS et al., 1998).

An den Neuronen können  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$  und  $\text{Lu}^{3+}$  in Konzentrationen von 100 nMol bis 100  $\mu\text{Mol}$  zur direkten Freisetzung von Neurotransmittern führen (VACCARI et al., 1999). Auch an den Calciumbindungsstellen der Mitochondrien und an einer Reihe von Enzymen kann es zu einer Konkurrenz zwischen Lanthanoiden und Calcium kommen. Desweiteren ist aber auch zu erwähnen, dass Calcium abhängige Mechanismen für die Freisetzung von Neurotransmittern durch die erwähnten Seltenen Erden blockiert werden können (PRYZWARA et al., 1992; VACCARI et al., 1999).

An der glatten intestinalen Muskulatur kann es durch die Konkurrenz von  $\text{La}^{3+}$  mit  $\text{Ca}^{2+}$  zu einer Hemmung der Kontraktion kommen (WEISS GOODMAN, 1963). Die Calcium-ATPase im sarkoplasmatischen Retikulum der Skelettmuskelfasern wird ebenso gehemmt (VAN DER LAARSE et al., 1995), wie dies auch an der Muskulatur des Herzens nachgewiesen ist (FWAZI und MCNEAL, 1985; HOBBER und SPAETH, 1914).

Durch die Zugabe von Lanthanoiden konnte eine Steigerung der Proliferation von Zellen, aber auch eine Induktion der Apoptose beobachtet werden (WASSERMANN et al., 1996;

GREISBERG et al., 2001). Der diesen an sich paradoxen Wirkungsweisen zugrunde liegende Wirkungsmechanismus ist noch nicht bekannt.

### 2.1.4.5 Toxizität

Grundsätzlich werden Seltene Erden für Säugetiere nur als geringgradig toxisch angesehen (HALEY, 1979). Bei oraler Aufnahme ist sie mit der Toxizität von Kochsalz zu vergleichen (WALD, 1990).

Die Toxizität hängt aber vor allem von dem Applikationsweg ab. Während Seltene Erden bei oraler Verabreichung nur zu einem geringen Teil (1 bis 10%) resorbiert werden (DURBIN, 1956; JI, 1985; EVANS 1990), ändert sich die Toxizität bei anderen Applikationswegen beträchtlich. Eine Steigerung ist bei der subkutanen, intramuskulären, intraperitonealen und intravenösen Verabreichung nachgewiesen. Dieses ist auf die gesteigerte Verfügbarkeit zurückzuführen, welche beispielsweise bei der intravenösen Verabreichung bei nahezu 100% liegt, so dass schon bei 10 bis 100 mg/kg Körpergewicht eine LD<sub>50</sub> nachgewiesen wurde (EVANS 1990). Neben der Verabreichungsform variiert die Toxizität auch mit dem Geschlecht und der Spezies der Labortiere (BULMAN, 2003). Bei männlichen Ratten sind die Veränderungen im Blutbild beispielsweise irreversibel, bei weiblichen jedoch nicht (ZHANG et al., 2000). Bei Ratten liegt die oral verabreichte letale Dosis bei 2,5 g/kg Körpergewicht Neodymiumnitrat, 4,5 g/kg Körpergewicht Lanthannitrat und 10 g/kg Körpergewicht Lanthanacetat (HALEY, 1979).

Die Symptome einer akuten Vergiftung durch Seltene Erden reichen von Ataxien und aufgekrümmten Rücken bis zu Respirationsschwierigkeiten und Sedation (ARVELA, 1977; HALEY, 1985). Die Verweilzeit der Ionen von Seltenen Erden im Blut ist sehr kurz; nach einem Tag sind nur noch geringe Reste nachzuweisen. Anders verhält sich dies in Bezug auf die Organe. In der Leber erreicht der Gehalt an appliziertem Europium und Dysprosium nach 8 bis 24 Stunden erst sein Maximum, um dann wieder stetig abzufallen. Nach intravenöser Verabreichung von Seltenen Erd Chloriden kommt es zu einer Anreicherung in der Leber (über 78%), in der Milz und im Knochenmark (NAKAMURA et al., 1997). Dem ist allerdings noch hinzuzufügen, dass es unterschiedliche Anreicherungen bei den „leichten“ und „schweren“ Seltenen Erden gibt; während sich die Ceriterden vor allem in der Leber anreichern, akkumulieren die Yttererden vor allem im Knochen. Eine Leberverfettung kann ebenso durch eine Infusion mit Seltenen Erden (KYCKER et al., 1957; SNYDER et al., 1960; MAGNUSSON et al., 1963) hervorgerufen werden, wie eine kardiale Fibrose mit dadurch bedingter Kardiomyopathie. Die Ablagerung im Herzmuskel wird durch einen Magnesiummangel des Herzens zum Applikationszeitpunkt erklärt (EAPEN et al., 1996). Dieser Effekt wurde bei der Applikation von Cer beobachtet. Durch KARTHA et al. (1998)

konnte dieses Ergebnis bestätigt werden, in dem den Versuchstieren bei einer magnesiumreduzierten Diät Cer-Chlorid-haltiges Wasser (1 g/ Liter) angeboten wurde.

Die Ausscheidung von Seltenen Erden geschieht über den Urin, die Wand des Gastrointestinaltraktes und die Galle (MAGNUSSON, 1963).

Über die Lunge können Partikel der Seltenen Erden bei Personen, die diesen über längere Zeit exponiert waren (Arbeiter in der Glasindustrie), in den Körper gelangen, und in großen Mengen in Lunge, Leber, Niere und Nägeln akkumulieren. In der Lunge kann eine Pneumokoniose entstehen (SABBIONI, 1982; SULOTTO et al., 1986; WARRING und WATTLING, 1990; NEMERY, 1990; PORRU et al., 2000).

Bei der Untersuchung der Seltenen Erden auf Mutagenität konnte diese allerdings nicht bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurden Ratten hohe Dosen Gadolinium intraperitoneal verabreicht und nachfolgend wurden die Versuchstiere anhand des Mikronukleus-Tests und der Auswertung des Knochenmarks untersucht (TORITSUKA et al., 1999). Bei der oralen Applikation von Seltenen Erden konnte ebenfalls kein teratogener oder mutagener Effekt beobachtet werden (JI, 1985).

## 2.2. Der Krankheitskomplex Osteoporose

### 2.2.1. Grundlagen des Knochenstoffwechsels

Das Knochengewebe besitzt aufgrund seiner Stützfunktion besondere biomechanische Eigenschaften. Diese sind auf die Einlagerung von anorganischer Grundsubstanz in die organische Knochenmatrix zurückzuführen. Neben seiner Stützfunktion besitzt das Skelett Funktionen im Stoffwechsel und es umschließt das blutbildende Knochenmark. Ferner dienen die Knochen als primäres Reservoir für die Elemente Calcium und Phosphor.

#### Die Struktur des Knochens

Der Knochen kann in zwei wesentliche Strukturen eingeteilt werden: das äußere, kompakte Knochengewebe (Kortikalis), das circa 70 % der Skelettmasse darstellt, und das innere, trabekuläre Knochengewebe (Spongiosa), welches einen Anteil von circa 30 % der gesamten Knochenmasse einnimmt. Der spongiöse Anteil enthält ein verzweigtes Netzwerk aus Knochenbälkchen, -blättchen und -röhrchen, welche in Ihrer Gesamtheit als Trabekel bezeichnet werden (FLEISCH, 1995). Die Trabekel sind entlang der Zug- und Druckrichtung orientiert und unterstützen die Kortikalis in ihrer Belastungsfähigkeit. Die schwammartig angeordneten Lamellen, welche namensgebend für die Spongiosa sind, schließen Lakunen ein, welche durch die Knochenkanälchen miteinander in Verbindung stehen. Die knochenbauenden Osteoblasten befinden sich in den Lakunen und Knochenkanälchen. Die Osteozyten wiederum sind durch ihre zytoplasmatischen Fortsätze, die gap-junctions,

miteinander verbunden und stellen mit diesen Verbindungen den Stofftransport von der Oberfläche sicher. In der dichteren, außen gelegenen Kortikalis durchziehen feinste Kanäle das solide Gewebe. Je nach Belastung und Funktion des Knochens gibt es Variationen zwischen den beiden Anteilen des Knochens. Die langen Röhrenknochen bestehen, ausgenommen an den Schaftenden und im Epiphysenbereich, aus Kortikalis. Im Gegensatz dazu dominiert der spongiöse Anteil bei der Zusammensetzung von Wirbel- und Handwurzelknochen (FREEMONT, 1989).

Zum umliegenden Gewebe wird der Knochen durch das Periost, oder Knochenhaut, abgegrenzt. In dieser bindegewebigen Hülle befinden sich Blut- und Lymphgefäße, sowie Nervenfasern.

## Knochenzellen

Sowohl im adulten, als auch im wachsenden Knochen sind fünf verschiedene Zelltypen zu unterscheiden: die Vorläufer der Knochenzellen (Präosteoblasten und Präosteoklasten), Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten und die endostalen Knochenbelegzellen.

Die Präosteoblasten entstehen aus undifferenzierten Mesenchymzellen als Vorläuferzellen der Osteoblasten. Von den Osteoblasten werden die organischen Bestandteile der Knochenmatrix, die Kollagenfasern und die Grundsubstanz des Knochens (Glycosaminglycane und Proteoglycane) synthetisiert. Sie beteiligen sich an der Mineralisation des Knochens und wandeln sich nach ihrer Aktivitätsphase in Osteozyten um. Diese, über gap-junctions verbundenen Zellen, stellen den Stoffaustausch, und damit die Erhaltung des Knochens sicher. Die endostalen Knochenbelegzellen halten unter anderem die Calciumhomöostase aufrecht, indem sie als endostale Membran eine Ionenbarriere zwischen Knocheninnenraum und den Blutgefäßen bilden. Die Ursprünge der Osteoklasten sind im monozytären Makrophagensystem zu finden. Die vielkernigen, durch Zellfusion entstandenen Osteoklasten können sich amöboid fortbewegen und sind in der Lage mit Hilfe von proteolytischen Enzymen Knochengewebe abzubauen.

## Die anorganische Matrix

Calcium und Phosphor, die als Hydroxylapatit vorliegen, stellen den Hauptanteil der anorganischen Komponente des Knochens dar. Über 90 % des im Körper vorhandenen Calciums ist im Knochen gespeichert. Hydroxylapatit ist ein nadelförmiger oder plättchenförmiger Kristall, dessen Oberfläche mit einer Hydratationshülle umgeben ist. Durch die Hydratationshülle findet der Austausch von Ionen zwischen dem Kristall und der extrazellulären Flüssigkeit statt. Neben den schon erwähnten Elementen Calcium und Phosphor stellen die Kristalle ein wichtiges Reservoir für Zink, Kupfer, Eisen und Blei dar.

(JEE, 1988). Auch Magnesium, Natrium, Carbonat, Strontium, Cäsium und Citrat werden im Knochen gespeichert (GEHORN-ROBEY, 1995).

## Die organische Matrix

Es gibt im Knochen zehn verschiedene Arten von Kollagentypen, von denen die interstitiellen, fibrillenbildenden Kollagene vom Typ I, II und III im Säugerorganismus vorherrschen.

Der Hauptbestandteil (90%) der organischen Matrix besteht aus Typ I Kollagen. Die verbleibenden 10% setzen sich aus nicht kollagenen Proteinen wie dem Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin und dem Bone Sialo Protein zusammen.

Seine dreidimensionale Struktur und damit die außerordentliche Stabilität erhält der Knochen durch die Quervernetzung der Fibrillen des Typ I-Kollagens. Die Fibrillen sind untereinander mittels Disulfidbrücken durch sogenannte Crosslinks verbunden.

## Modeling, Remodeling und Wachstum

Das Wachstum ist vor allem im Bereich der Epiphysenfuge lokalisiert und führt zu einer Verlängerung des Knochens. Um aber die Architektur und die mechanische Integrität des Knochens aufrecht zu erhalten, sind die Vorgänge des Modelings und Remodelings unerlässlich. Neben dem Wachstum sind es die wichtigsten physiologischen Mechanismen, die sich im Knochen abspielen. Als Modeling wird die Veränderung von Form und Größe des Knochens während des Wachstums bezeichnet (FROST, 1983). Beim Modeling wird der Knochen hauptsächlich in seiner Form und Masse verändert. Resorption und Aufbau geschehen parallel am gleichen Knochen an verschiedenen Stellen. Der Knochen ist in der Lage, auf starke mechanische Belastung mit dem sogenannten „Modeling Drift“ zu reagieren. Hierbei kommt es zu einer Vermehrung des exzentrischen und zur Abnahme des konzentrischen Knochenwachstums (JEE, 1988). Durch das primäre Wachstum von der Epiphysenfuge aus entsteht ein Knochengewebe, welches aus struktureller Sicht von geringerer Qualität ist.

Deshalb muss der Knochen, wie auch andere Gewebetypen, während der gesamten Lebensspanne des Organismus erneuert und ersetzt werden. Dieser Prozess setzt also erst nach Beendigung des primären Wachstums ein und wird als Remodeling bezeichnet (FROST 1983). Beim Menschen beginnt die Resorption primärer trabekulärer und kortikaler Knochensubstanz bereits im ersten Lebensjahr (PARFITT, 1982).

Oftmals liegen den osteoporotischen Veränderungen des Knochens Störungen im Remodeling zu Grunde. Daraus resultiert dann der eintretende Knochenverlust. Zum einen kann es zu einer Vergrößerung des Knochenvolumens kommen, welches am Knochen turnover teilnimmt, auf der anderen Seite können Unterschiede der Geschwindigkeit

des Umbaus der BRU (Bone Remodeling Units) zu einem Ungleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenformation führen. Kombinationen aus einer erniedrigten Knochenformation bei normaler Knochenresorption sind ebenso möglich, wie eine erhöhte Knochenresorption bei normal ablaufender Formation.

## Die Steuerungshormone des Knochenstoffwechsels

Eine große Anzahl von Hormonen und regulativ wirkenden Botenstoffen kontrolliert den Knochenstoffwechsel: Das Parathormon wird in der Nebenschilddrüse synthetisiert und ist das wichtigste Hormon um die Calciumhomöostase aufrecht zu erhalten. Auf der einen Seite kommt es zu einer Steigerung der Knochenresorption durch die Aktivierung der Osteoklasten, und auf der anderen Seite werden Calcium Aufnahme aus dem Darm mit Hilfe von Vitamin D<sub>3</sub>, beziehungsweise seiner Metaboliten 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> gesteigert, indem die Proteinbiosynthese des Calcium-Transportproteins Calbindin-D gesteigert wird. In der Niere wird die Sekretion von Calcium im distalen Tubulus verhindert und die Reabsorption von Phosphat gehemmt. Außerdem wird die renale Synthese von 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> forciert, die dann, wie oben bereits erwähnt, unter anderem zu einer Steigerung der Calciumaufnahme aus dem Darm führt.

Calcitonin entsteht in den C-Zellen der Schilddrüse und steigert den Calciumeinbau in die Knochen, indem es die Osteoblasten aktiviert und die Osteoklasten hemmt. Osteoklasten verfügen über einen Rezeptor für Calcitonin. Nach einer Aktivierung des Rezeptors gehen die Osteoklasten in eine Ruhephase über (JEE, 1988) und die Ausdifferenzierung neuer Osteoklasten wird arretiert (MARTIN, 1993). Die Abgabe des Calcitonins wird über die Serumcalciumspiegel und die Konzentration von Calcium in der extrazellulären Flüssigkeit kontrolliert.

Vitamin D wird als Provitamin 7-Dehydrocholesterin in der Leber aus Cholesterin synthetisiert. Unter dem Einfluss von UV-Strahlen wird der Cholesterinring in der Epidermis durch Photolyse aufgebrochen und das Cholecalciferol entsteht. Eine weitere, wichtige Aufnahmequelle stellt die Nahrung dar: Tierisches Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>) und Ergocalciferol (Vitamin D<sub>2</sub>) pflanzlichen Ursprungs. In der Leber wird Vitamin D am C-25-Atom hydroxyliert, besitzt aber noch keine physiologische Aufgabe. Erst in der Niere wird das 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> am C-1-Atom hydroxyliert, wodurch das biologisch wirksame 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> entsteht. Es gibt noch etwa 35 weitere Metaboliten des Vitamin D, deren Aufgaben in vivo aber bis jetzt nicht genau geklärt werden konnten. Die wichtigste Wirkung des biologisch aktiven 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> ist die bereits erwähnte Stimulation des intestinalen Calcium-Transportes über die Stimulierung der Proteinbiosynthese des calciumbindenden Proteins Calbindin-D. Am Knochen ist der Einfluss widersprüchlich zu beurteilen; die antirachitische Wirkung führt zu einer vermehrten

Knochenmineralisation und Knochenformation, andererseits sind auch Steigerungen der Knochenresorption unter dem Einfluss von Vitamin D dokumentiert.

Das Knochenwachstum unterliegt ebenfalls den Steuerungsmechanismen einer Reihe von Hormonen: Die Sekretion von Wachstumshormon („somatotropes Hormon“ oder „growth hormon“) führt zu einer Zunahme der Knochensubstanz. Glucocorticoide (Cortisol, Cortison und Corticosteron) verhindern dagegen das Skelettwachstum (LUKERT und RAISZ, 1990). Sie können die Proteinbiosynthese und die Prostaglandinsynthese der Osteoblasten inhibieren (MCARTHY et al., 1990) und die Knochenresorption durch eine Stimulation der Osteoklasten steigern (DE FRANCO et al., 1992). Die Glucocortikoide sind am sekundären Hyperparathyreoidismus beteiligt, da Sie die intestinale Calciumresorption und die Calbindin-D-synthese inhibieren. Weiterhin sind das adrenokortikotrope Hormon (ACTH), das thyreotrope Hormon (TSH) und die weiblichen und männlichen Geschlechtshormone am Knochenstoffwechsel beteiligt.

Das thyreotrope Hormon (TSH) stimuliert die Knochenresorption und erhöht damit auch den Knochen turnover (KLAUSHOFER et al., 1989).

Die Östrogene der postmenopausalen Frau werden vor allem aus dem in der Nebennierenrinde gebildeten Androstendion synthetisiert. Da diese Synthese sich vor allem im Fettgewebe vollzieht, haben übergewichtige Frauen der entsprechenden Altersgruppe ein geringeres Osteoporoserisiko (COBAYASHI et al., 2005). Der genaue molekulare Wirkungsmechanismus der Östrogene auf den Knochen ist noch nicht hinreichend geklärt, obwohl inzwischen ein spezifischer Rezeptor für Östrogene an Osteoblasten nachgewiesen worden ist. Den Östrogenen wird eine entscheidende Rolle bei der Knochenformation zugeschrieben. Neben der Rolle der Östrogene bei der Knochenformation konnten KAMEDA et al. (1997) nachweisen, dass 17- $\beta$  Estradiol einen Zelluntergang der Osteoklasten induziert. Östrogene haben auch eine Wirkung auf die Interleukin 1 Freisetzung. Die Familie der Interleukine sind als potente Stimulatoren für die Knochenresorption bekannt, da sie die Proliferation und Differenzierung der Osteoklastenvorläuferzellen stimulieren, und die Osteoklasten aktivieren (KIM et al., 2006).

Östrogene vermindern die Freisetzung von Knochenresorptiv wirkendem Interleukin 1 und 6 (PACIFICI et al., 1989; GIRASOLE et al., 1992), so dass es bei einem Mangel an Östrogenen zu einer gesteigerten Knochenresorption kommt (GIRASOLE et al., 1992; JILKA et al., 1992).

Daneben stimulieren die Östrogene die Aktivität der Lysin-Oxidase, so dass die Quervernetzung der Kollagenfasern im Knochen gesteigert wird (SANADA et al., 1978).

Auch bestimmte Vitamine besetzen eine zentrale Rolle im Knochenstoffwechsel. Neben dem bereits beschriebenen Vitamin D sind vor allem Vitamin C und K zu nennen. Sie fördern die

Kollagenfasersynthese in den Osteoblasten und sind Co-Faktoren bei zahlreichen enzymatischen Reaktionen.

## 2.2.2. Geschichtlicher Hintergrund und Definition der Osteoporose

In Darstellungen aus der Kunst des antiken Griechenlands und des alten Ägyptens existierten bereits Gemälde und Vasen, auf denen Männer gebeugt und mit gekrümmter Wirbelsäule dargestellt sind (APFELBOOM und BODY, 1993). Auch Hippokrates (460-377 v. Chr) weist bereits auf den Schmerz im unteren Teil der Wirbelsäule als typisches Leiden älterer Menschen hin. Er bezeichnete diesen Schmerz als eine Ansammlung von Schleim und Galle (BYL, 1983). Daher scheint es, dass die Osteoporose bereits seit dem Altertum ein Problem älterer Menschen war. Einschränkend muss man allerdings zu bedenken geben, dass die Lebenserwartung der Menschen wesentlich geringer war, und auch Schmerzen anderer Genesen durch den gekrümmten Rücken dargestellt worden sind.

Aufgrund der gestiegenen Lebenserwartung und der niedrigeren Sterblichkeit von Kindern mit genetisch bedingten Skeletterkrankungen ist die Osteoporose erst im 20. Jahrhundert zu einer Krankheit mit epidemiologischer Bedeutung geworden (LINDSAY und COSMAN, 1992). Der Pathologe Pommer war der Erste, der Ende des neunzehnten Jahrhunderts den Begriff der Osteoporose benutzte. Er unterschied dabei die Krankheitsbilder der physiologischen Altersosteopenie, der Osteomalazie und der Osteoporose. Der Begriff der Postmenopausalen Osteoporose ist von ALBRIGHT et al. (1940) geprägt worden. Die von Ihnen „idiopathische Osteoporose“ genannte Krankheit wurde von der Altersosteopenie und der senilen Osteoporose unterschieden.

Die deutsche Gesellschaft für Osteologie und Osteoporose definiert die Osteoporose auf Grundlage der Consensus Development Conference von 1991 und der WHO als eine systemische Skeletterkrankung, die durch niedrige Knochenmasse und eine Störung der Mikroarchitektur des Knochengewebes mit konsekutiv erhöhter Knochenbrüchigkeit und erhöhtem Frakturrisiko charakterisiert ist (CLARENZ et al., 1996). Nach NORDIN et al. (1966) hat dabei der osteoporotische Knochen die normale chemische Zusammensetzung. Im Laufe der Erkrankung kommt es zu einer Reduktion der Knochenmasse, die durch die Imbalance zwischen Resorption und Formation, wobei die physiologischen Wechselwirkungen zwischen den Osteoblasten und Osteoklasten gestört sind, ausgelöst wird (KUO et al., 2006).

Bis zum Jahr 1996 gab es eine semantische Unterteilung der Osteoporose. Die Erkrankung wurde in der präklinischen Phase als Osteopenie bezeichnet. Erst nachdem die Krankheit sich anhand von Knochenbrüchen klinisch manifestierte, wurde sie als Osteoporose eingestuft. Die Unterscheidung der beiden Abschnitte wurde dann durch LINDSAY und

COSMAN (1992) kritisiert, da die pathologischen Veränderungen schon lange vor der eigentlichen klinischen Manifestation vorhanden sind. Die neue Bezeichnung der Osteoporose wurde nun für die Verminderung der Knochenmasse pro Volumeneinheit unabhängig vom klinischen Bild benutzt.

### 2.2.3. Einteilung der generalisierten Osteoporose

Die Einteilung der verschiedenen Formen der generalisierten Osteoporose geschieht in die primäre und die sekundäre Osteoporose.

Die primäre Form der Osteoporose umfasst die Postmenopausale Osteoporose und die senile Osteoporose. Zudem werden die primären Osteoporosen noch in Typ I und Typ II eingeteilt; Typ I steht für den östrogenabhängigen trabekulären Knochenverlust nach der Menopause, und Typ II repräsentiert den senilen, altersabhängigen trabekulären und kortikalen Knochenverlust.

Diese Einteilung in Typ I und Typ II unterliegt nach wie vor noch Diskussionen, da sich bei der alternden Frau die beiden Vorgänge überlagern (MARCUS, 1992).

#### Einteilung der Osteoporoseformen nach STRACKE (1992) und KRAENZLIN (1995)

##### **Primäre Osteoporose**

- Idiopathische Osteoporose
- Juvenile Osteoporose
- Prämenopausale Osteoporose
- Präsenile Osteoporose
- Postmenopausale Osteoporose (Typ-I-Osteoporose)
- Senile Osteoporose (Typ-II-Osteoporose)

##### **Sekundäre Osteoporose und ihre Ursachen**

###### Endokrine Ursachen

- Hypogonadismus
- Hypercortisolismus
- Hyperthyreose
- Hyperparathyreoidismus
- Hyperprolaktinämie
- Akromegalie
- Idiopathische Hypercalciurie
- Diabetes mellitus
- Homozystinurie

### Ernährung

- Lebenslange geringe Calcium- und Vitamin-D-Zufuhr
- Phosphat-, Protein- und faserreiche Kost
- Anorexia nervosa

### Gastrointestinale Erkrankungen

- Zustand nach Magenresektion
- Malabsorption
- Malnutrition
- Primär biliäre Zirrhose
- Laktose-Intoleranz
- Morbus Crohn

### Knochenmarks- und Tumorerkrankungen

- Multiples Myelom (Plasmozytom)
- Mastozytose
- Lymphoproliferative Erkrankungen
- Diffuse Knochenmetastasierung

### Parainfektios/Immunogen

- Chronische Polyarthrit
- Morbus Crohn

### Genetik

- Weiße und asiatische Rasse
- Familiäre Osteoporosehäufung
- Vitamin-D-Rezeptor-Gendefekt

### Hereditäre Bindegewebserkrankungen

- Osteogenesis imperfecta
- Ehler-Danlos-Syndrom
- Marfan-Syndrom

### Inaktivität/Immobilisation

- Geringe körperliche Aktivität
- Langfristige Bettruhe
- Paraplegie

- Hemiplegie
- Raumfahrt

#### Iatrogen/Medikamentös

- Glucocorticoide und andere Immunsuppressiva
- Asthma bronchiale, Posttransplantationsosteoporose
- Schilddrüsenhormone
- Antikonvulsiva
- Heparine
- LH–RH–Analoga
- Laxantien

#### Im Rahmen komplexer Osteopathien

- Renale Osteopathie
- Intestinale Osteopathie

#### Andere Ursachen

- Schlankheit
- Kleine Körperstatur
- Chronischer Alkoholismus
- Rauchen
- Koffein

Bei der sekundären Osteoporose führen häufig nicht nur einzelne Faktoren wie eine Grunderkrankung, Medikamente oder Risikofaktoren zur Entstehung der Krankheit, sondern es handelt sich häufig um ein multifaktorielles Geschehen.

## 2.2.4. Die biochemischen Marker des Knochenstoffwechsels

Die Beeinflussung des Knochenstoffwechsels unterliegt vor allem den Prozessen des Abbaus von Knochen durch die Osteoklasten und dem Aufbau von Knochengewebe durch die Osteoblasten. Ähnlich wie bei anderen Knochenerkrankungen ist bei der Osteoporose das physiologische Gleichgewicht zwischen diesen beiden Komponenten des Knochenturnovers gestört.

Durch den Einsatz von empfindlichen Parametern für den Knochenstoffwechsel kann die Aktivität der Knochenzellen genau bestimmt werden. Diese, als Knochenmarker bezeichneten Parameter, können aus dem Urin und dem Serum nachgewiesen werden,

wobei die Knochenmarker aus dem Urin einer höheren prozentualen Streuung unterliegen (GARNEO et al., 1994). Die Knochenmarker können in Marker für die Knochenresorption und in Marker für die Knochenformation eingeteilt werden (BRIOT und ROUX, 2005). Diese Marker werden von den Osteoblasten und Osteoklasten synthetisiert und dann in das Blut abgegeben. Die Ausscheidung verläuft vor allem über die Leber. Einige Bruchstücke des Knochenkollagens werden allerdings auch über den Urin ausgeschieden. Somit können diese biochemischen Knochenmarker anhand der Blut- und Urin-Analyse helfen, Erkenntnisse über Störungen im Knochenstoffwechsel und über die Gesundheit des Knochens zu sammeln (ZITTERMANN et al., 2006). Auch DELMAS et al. (1991) beschreiben eine exakte Möglichkeit zur Bestimmung des Verhältnisses zwischen Knochenabbau und Knochenbildung durch den Einsatz von spezifischen Knochenmarkern. Daher sind die Knochenmarker mittlerweile etabliert, um die Messungen der Knochendichte in Bezug auf die Diagnose und die Behandlung der Osteoporose zu unterstützen.

Die Effektivität von Medikamenten durch die Messung der Knochenmarker kann schneller bestimmt werden, als dieses durch die Messung der Knochendichte möglich wäre. Ferner können Sie einen Beitrag zur Risikoabschätzung von Knochenfrakturen leisten (INABA, 2006).

Abgesehen von der Einstufung in Marker der Knochenformation und der Knochenresorption lassen sich die Knochenmarker nach SEIBEL (1995) in die folgenden 3 Gruppen einteilen:

Parameter der zellulär-enzymatischen Aktivität (Osteoblasten- bzw. Osteoklastenmarker):

- Knochenspezifische alkalische Phosphatase
- Tartrat-resistente saure Phosphatase

Matrixprodukte, die beim Aufbau bzw. Abbau der Knochenmatrix freigesetzt werden:

- Propeptide
- Hydroxyprolin
- Osteocalcin
- Collagencrosslinks
- Crosslinked Telopeptide
- Osteonectin
- Osteopontin

Mineralmarker:

- Calcium in Serum und Urin
- Phosphat in Serum und Urin

Zu bedenken ist, dass die unterschiedlichen Marker zum Teil sehr unterschiedliche Biostabilität und Spezifität aufweisen. Daneben gibt es exogene und endogene Einflüsse, welche die Urin- und Serumkonzentrationen der Marker beeinflussen können, aber in keiner Beziehung zum Knochenstoffwechsel stehen. Zu nennen sind Nieren- und Leberfunktion, Körpergewicht und Größe, Alter, Geschlecht und diätetische Einflüsse. Wie bei anderen Biomarkern lassen sich auch bei den Knochenmarkern circadiane Schwankungen nachweisen. Die Tagesschwankungen liegen im Allgemeinen bei 10% bis 15%, wobei auch höhere Abweichungen in Einzelfällen beobachtet worden sind. Deshalb sollte der Entnahmezeitpunkt auf eine bestimmte Tageszeit festgelegt werden. Aufgrund der hohen tageszeitlichen Konzentrationsschwankungen haben sich die Vormittagsstunden in diesem Zusammenhang als Entnahmezeitpunkt durchgesetzt. Nachfolgend sollen einige Knochenmarker, die in der vorliegenden Arbeit benutzt wurden, dargestellt werden.

Tabelle 2.5a : Wichtige Knochenmarker nach SEIBEL und RAUE (1996)

Marker	Stabilität	Spezifität	Hauptquelle	Einfluss Leber/ Nierenfkt.
<u>Knochenformation</u>				
Gesamt-ALP	stabil	+++	Leber, Knochen u.a.	L:+++
Knochen-ALP	stabil	+	Osteoblasten	L:+++
PICP	stabil	+++	Osteoblasten, Fibroblasten	L,N:+++
Osteocalcin	instabil	+++	Osteoblasten, Knochenmatrix	N:+++
<u>Knochenresorption</u>				
Urin- Ca <sup>2+</sup>	stabil	++	Knochen, Nahrung	N:++
Hydroxyprolin	stabil	+	Knochen, Bindegewebe, Nahrung	L,N:+
TRAP	instabil	++	Osteoklasten	?

? = fraglich, ALP = Alkalische Phosphatase, PICP = Carboxyterminales Propeptid des Typ I-Kollagens, TRAP = Tartrat-resistente saure Phosphatase, Crosslinked-vernetzte Telopeptide: Ntx = aminoterminal, Ctx = carboxyterminal, ICTP = Crosslinked-vernetztes carboxyterminales Kollagen-Typ-I-Telopeptid

Tabelle 2.5b : Wichtige Knochenmarker nach SEIBEL und RAUE (1996)

<u>Marker</u>	<u>Stabilität</u>	<u>Spezifität</u>	<u>Hauptquelle</u>	<u>Einfluss Leber/ Nierenfkt.</u>
<u>Knochenresorption</u>				
Pyridinolin	stabil	++	Kollagen (Knorpel, Knochen, Sehnen)	
Desoxypyridinolin	stabil	+++	Kollagen (Knochen, Dentin)	
Crosslinked Telo peptide			Kollagen (Knochen, Bindegewebe)	
Ntx	stabil	++		?
Ctx	stabil	+		?
ICTP	stabil	+		N:++

? = fraglich, ALP = Alkalische Phosphatase, PICP = Carboxyterminales Propeptid des Typ I-Kollagens, TRAP = Tartrat-resistente saure Phosphatase, Crosslinked-vernetzte Telo peptide: Ntx = aminoterminal, Ctx = carboxyterminal, ICTP = Crosslinked-vernetztes carboxyterminales Kollagen-Typ-I-Telo peptide

### 2.2.4.1. Marker der Knochenformation

Die verschiedenen Knochenmarker werden in den drei unterschiedlichen Phasen der Knochenbildung sezerniert. Als erste Phase ist die Proliferation der Osteoblasten zu nennen, gefolgt von der Matrixbildung und der abschließenden Mineralisation. Die 10-12 Tage andauernde Proliferationsphase ist durch die Synthese des bereits beschriebenen Kollagens vom Typ I gekennzeichnet. Dieses ist für die Bildung der organischen Matrix des neuen Osteoids verantwortlich. Der in dieser Zeit charakteristisch nachzuweisende Knochenmarker ist das „Carboxyterminal Propeptid des Typ-I- Kollagens (PICP). Es schließt sich die etwa zehn Tage dauernde Phase der Matrixreifung mit einer erhöhten Aktivität der knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase (bALP) an. Der erste Knochenmarker, der in der vorliegenden Arbeit eine Rolle spielt, ist das Osteocalcin. Osteocalcin wird vor allem in der Mineralisationsphase des Knochens synthetisiert.

#### Osteocalcin

Das Protein Osteocalcin oder „Bone Gla Protein“ wird von Osteoblasten und Odontoblasten synthetisiert und ist deshalb fast ausschließlich im Knochen und im Dentin zu finden. Damit stellt es einen hochspezifischen Knochenmarker dar, der während der

Matrixmineralisationsphase gebildet wird (LIAN und FRIEDMANN, 1978). Die physiologische Funktion des Osteocalcins ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird nur von reifen Osteoblasten während der Mineralisationsphase der Knorpelgrundsubstanz gebildet (HEERSCHKE et al., 1992). Osteocalcin wird eine wichtige Rolle bei der Mineralisierung der Grundsubstanz zugesprochen, da es Calciumionen binden kann und sich an Hydroxylapatit anlagert (COLFORD und LUEDDECKE, 1999). Da Osteocalcin chemotaktische Funktionen zugesprochen werden, könnte es für die Abstimmung zwischen Osteoklasten und Osteoblasten von Bedeutung sein. Bei Studien an Osteocalcin-Knockout-Mäusen kam es zu einer höheren Knochenmasse mit gesteigerter Knochenneubildung. Mineralisierung und Knochenresorptionsraten unterlagen hierbei keiner Veränderung (DUCY et al., 1996). Neben Mineralisierung der Grundsubstanz des Knochens wird dem Osteocalcin somit auch eine Rolle bei der Regulation der Matrixsynthese zugesprochen.

Das Osteocalcinprotein besitzt ein Molekulargewicht von 5800 und besteht bei den meisten Tierspezies und beim Menschen aus einer Sequenz von 49 Aminosäuren. Die Ratte stellt mit einer Anzahl von 50 Aminosäuren eine Ausnahme dar. Die Synthese des Osteocalcins ist von verschiedenen Vitaminen abhängig (LEPAGE et al., 2001). Unter der Mitwirkung von Vitamin C wandelt eine Peptidase zunächst das Prä-pro-Osteocalcin in Proosteocalcin um, welches nun durch Entfernung des Propeptids zum eigentlich biologisch aktiven Osteocalcin umgewandelt wird. Diese Entfernung des Propeptids ist eine Carboxylierung, die Vitamin K abhängig ist. Osteocalcin besitzt nun Residuen des  $\gamma$ -Carboxyglutamats, welche durch die beschriebene, Vitamin K abhängige, posttranslationale Modifikation von Glutaminsäure entstehen. An diesen  $\gamma$ -Carboxyglutamatesiduen können Calciumionen binden.

Osteocalcin macht 2% der gesamten Masse der Knochenproteinfraktion aus und stellt mit etwa 25% die Hauptfraktion der nicht-kollagenen Proteine im Knochen dar. Ungefähr 80% des neusynthetisierten Osteocalcins werden im Anschluss an die Freisetzung durch die Osteoblasten in die Knochenmatrix inkorporiert. Die verbleibenden Anteile gelangen in die Blutzirkulation, in der das neugebildete Osteocalcin allerdings einer schnellen Biodegradierung unterliegt. Aus diesem Grund sind im Serum neben den intakten, bioaktiven, carboxylierten Anteilen der Osteocalcinsynthese auch immer verschiedene Osteocalcinfragmente vorhanden (FOURNIER et al., 1989). Zur Bestimmung der Osteocalcinkonzentration im Blut sind zwei verschiedenen ELISA-Verfahren möglich: Zum einen kann nur intaktes Osteocalcin nachgewiesen werden, andere Testkits interagieren auch mit Osteocalcinfragmenten. Um das intakte Osteocalcin nachzuweisen, kommt ein Sandwich-ELISA mit monoklonalen Antikörpern zum Einsatz. Diese binden sowohl am amino-, als auch am carboxyterminalen Ende des Proteins. Aufgrund dessen wird von Ihnen nur intaktes Osteocalcin detektiert. Anders verhält es sich bei den ELISA-Kits, deren Antikörper auch mit den Fragmenten des Osteocalcins interagieren können. Hier binden die

eingesetzten Antikörper auch am N-terminalen MID-Fragment des Osteocalcins, welches aus mindestens 43 Aminosäuren besteht. Da sowohl das intakte Osteocalcin, als auch das beschriebene Fragment nicht bei der Resorption des Knochens freigesetzt werden, erlauben diese eine zuverlässige Aussage über die Formation des Knochens.

Die Instabilität des Osteocalcins stellt ein Problem bei seiner Bestimmung dar. Durch eine Lagerung bei Raumtemperatur kann schon innerhalb weniger Stunden nach der Blutentnahme ein Verlust der Immunreaktivität eintreten (WITHOLD, 1996). Auch das mehrmalige Auftauen der entnommenen Proben kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen, falls der Temperaturbereich von  $-25^{\circ}$  Celsius überschritten wird. Die Stabilität des Osteocalcins kann nach LANG et al. (1996) durch Zugabe eines Proteolysehemmers gesteigert werden.

Da die Osteocalcinkonzentration tageszeitlichen Schwankungen unterliegt, muss der Entnahmezeitpunkt einheitlich gewählt werden. Hohe Osteocalcinwerte im Serum sind vor allem in den frühen Morgenstunden beschrieben (GUNDBERG et al., 1985).

Bei primären Osteoporosen ist eine Unterscheidung zwischen postmenopausalen Gesunden und Kranken allein aufgrund der Osteocalcinbestimmung nicht möglich, da die Osteocalcinwerte über einen weiten Bereich gestreut sind. Außerdem kann es bei einem latenten Mangel an Vitamin K und Vitamin D bei älteren Patienten zu einer erhöhten Konzentration von uncarboxyliertem Osteocalcin kommen. Anders stellt sich der Zusammenhang bei der Glucocorticoid induzierten Osteoporose dar: einhergehend mit der Depression der Osteoblastenfunktion finden sich hier regelmäßig erniedrigte Osteocalcinwerte.

## 2.2.4.2 Marker der Knochenresorption

### Die Collagencrosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin

Die Hauptvertreter der Collagencrosslinks sind zum einen das Pyridinolin (PYD), welches im Knochen, im Knorpel und in geringen Mengen auch im Bindegewebe nachgewiesen wurde, und das Desoxypyridinolin (DPD), das ausschließlich im Knochen und im Kollagen des Dentins vorkommt (DELMAS et al., 1991).

Zwar sind Pyridinolin und Desoxypyridinolin in großen Mengen in kollagenreichen Nahrungsmitteln (Fisch und Fleisch) enthalten, aber durch die fehlende Resorption aus dem Verdauungstrakt ist keine Beeinflussung der Versuchsergebnisse zu erwarten (COLLWELL et al., 1993).

Durch die erliegende ovarielle Funktion und die damit eintretende Menopause der Frau kommt es zu einem Anstieg in der Ausscheidung von Pyridinolin und Desoxypyridinolin um 80%- 100% im Vergleich zu prämenopausalen Werten. Eine Therapie mit Östrogenen in

Verbindung mit Biphosphonaten kann die Ausscheidung von Pyridinolin und Desoxypyridinolin wieder auf prämenopausale Werte senken (SEIBEL und RAUE, 1996). PARVIAINEN et al. (1999) beschreiben einen Abfall der Marker der Knochenresorption bei einer Studie, in welcher Frauen im Lebensalter von 52- 68 Jahren mit den Symptomen einer Postmenopausalen Osteoporose mit Hormonanaloga behandelt worden sind.

Nachdem die neugebildeten Kollagenfibrillen in der Knochenmatrix eingelagert sind, reifen sie durch die Ausbildung spezifischer Quernetzverbindungen. Diese Komponenten werden als Pyridinum-Crosslinks (Pyridinolin und Desoxypyridinolin) bezeichnet und bestehen aus nicht reduzierbaren Quervernetzungen zwischen den Aminosäuren der helikalen Region und Resten auf den nicht helikalen amino-(N) und carboxy-(C) terminalen Regionen. Diese sogenannten Telopeptide verleihen den Kollagenen ihre große Stabilität.

Im Zuge des Knochenabbaus wird reifes Kollagen degradiert und die Collagencrosslinks werden im Urin ausgeschieden. Im Urin liegen 40% der Collagencrosslinks in freier Form vor, während 60% an große Peptide gebunden sind. Für die Interpretation der Ergebnisse ist es wichtig zu wissen, dass das Verhältnis der ausgeschiedenen Collagencrosslinks zueinander relativ stabil ist. Aus diesem Grund lassen sich Aussagen über eine tatsächliche Knochenresorption oder eine Beteiligung des Abbaus von Weichteil- oder Knorpelgewebe treffen.

Das Verhältnis zwischen freien Pyridinolin zu Desoxypyridinolin-Anteilen beim Menschen liegt bei 4,5:1 und für das Gesamt- Pyridinolin zum Gesamt- Desoxypyridinolin 5,4:1 (ENGLER und RIESEN, 1995). Das Verhältnis beim Pferd liegt bei 10:1 (LENSING, 1998) und beim Schaf bei 8,75:1 (RIEDER, 2000). Beim Hund liegt das Verhältnis altersabhängig bei 7:1 bis 13:1 (ALLEN et al., 1998) und bei der Ratte 1,5:1 (KRAMMER 2001).

Die Collagencrosslinks sind sehr stabil, was eine 24 Stunden-Sammelurin-Messung ermöglicht. In Verbindung mit ihrer hohen Gewebsspezifität dienen die Collagencrosslinks daher als äußerst zuverlässige Marker für die Knochenresorption. Um den unterschiedlichen Konzentrationen des gesammelten Urins Rechnung zu tragen, muss die Konzentration der Collagencrosslinks zum Urin-Creatinin-Wert in Beziehung gesetzt werden. Die Referenzmethode zum Nachweis der Collagencrosslinks stellt die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) dar. Zunächst wird der Urin sauer hydrolysiert und durch eine Cellulose Extraktion gereinigt.

Das Messen von Pyridinolin und Desoxypyridinolin geschieht in der HPLC-Anlage, in der die Collagencrosslinks aufgetrennt und mittels ihrer Eigenfluoreszens quantitativ bestimmt werden (BLACK et al., 1988; COLLWELL et al., 1993). Diese Methode stellt die zur Zeit sensitivste Methode dar, um die Konzentration der Collagencrosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin zu messen. Neben dem Nachweis durch das HPLC können die

Collagencrosslinks auch durch ELISA (Enzym linked immun adsorbant assay) nachgewiesen werden (PARVIAINEN et al., 1999).

## 2.2.5. Weitere biochemische Marker des Knochenstoffwechsels

### Osteonectin

Osteonectin wurde erstmals 1981 von der Forschungsgruppe um John D. Termine entdeckt, beschrieben und auch benannt. Der Name setzt sich aus dem griechischen Wort für Knochen („osteo“) und dem lateinischen „nectere“ für verbinden zusammen. Laut TERMINE et al. (1981) handelt es sich um ein 32.000 dalton schweres, knochenspezifisches Protein, welches die Fähigkeit besitzt, Hydroxylapatit und Collagen zu binden. Durch die Bindung zum unlöslichen Collagen Typ I resultieren Komplexe, die wiederum Apatitkristalle und freie Calciumionen binden können. Antikörper gegen das Osteonectin zeigen Kreuzreaktionen mit Knochen und Dentin, aber zu keinem anderen Geweben. Osteonectin ist vor allem in der Matrix der mineralisierten, trabekulären Anteile des Knochens zu finden. Die Ergebnisse der Studie von TERMINE et al. (1981) fassen Osteonectin als gewebespezifisches Protein, welches die mineralisierten Anteile des Knochens mit dem Kollagen verbindet, und möglicherweise die aktive Mineralisation des Knochengewebes initiiert, zusammen.

Osteonectin wird vor allem während des aktiven Remodelings exprimiert und gehört, wie auch das Osteopontin, zu den häufigeren Proteinen der nichtkollagenen Proteinfraction des Knochens. Obwohl seine genaue Rolle im Knochenstoffwechsel noch nicht vollständig verstanden ist, ist es für das Remodeling und damit für die Aufrechterhaltung der physiologischen Knochenmasse wichtig.

Dieses zeigt sich unter anderem durch Versuche mit Osteonectin-Null-Mäusen, bei denen es durch das Fehlen des Osteonectins zu starken Entgleisungen im Knochenstoffwechsel gekommen ist (DELANY et al., 2003). Vor allem der trabekuläre Anteil des Knochens war von Osteopenie betroffen, da dieser Anteil des Knochengewebes eine höhere metabolischen Rate aufweist, als der cortikale Knochenanteil. Sowohl die Anzahl der Osteoklasten, als auch der Osteoblasten fällt durch das Fehlen von Osteonectin ab. Neben den Funktionen im Knochen ist Osteonectin in anderen Geweben für eine Vielzahl von Aufgaben zuständig, indem es die Proliferation und Adhäsion von Zellen inhibieren kann, die Expression von Enzymen stimuliert und die Angiogenese modulieren kann. Ausserdem trägt es zur Regulierung Wachstumsfaktorfunktionen bei (BRADSHAW und SAGE, 2001). MOTAMED (1999) beschreibt das Osteonectin als ein 34.000 Dalton schweres Protein, welches aus drei verschiedenen strukturellen Domänen besteht. Diese sind zuständig für die Regulation von Adhäsion und Proliferation von Zellen, sowie in die Matrixsynthese involviert. Neben den erwähnten Eigenschaften und Aufgaben spielt Osteonectin auch bei der

Angiogenese der Wundheilung, dem Tumorwachstums und bei der Kataraktbildung eine Rolle, so dass es in vielerlei Hinsicht im Focus des medizinischen Interesses steht.

## RANKL und Osteoprotegerin

Interleukin 1 ist ein Entzündungsmediator, der als potenter Stimulus für die Knochenresorption und als Inhibitor für die Knochenformation wirkt (DINARELLO, 1994). Interleukin 1 erhöht die Differenzierung der Osteoklasten, indem es die Fusion der praeosteoklastischen Vorläuferzellen fördert. Ausserdem wirkt es als überlebensverlängernder Faktor für reife Osteoklasten (KIMBLE et al., 1996; JIMI et al., 1999).

Die Verlängerung der Lebensdauer der reifen Osteoklasten und die Förderung der Entwicklung der Osteoklastenvorläuferzellen geschieht über einen Mechanismus, indem RANK, RANKL und unter anderem der nuclear Factor-  $\kappa$ B (NF-  $\kappa$ B) eine entscheidende Rolle spielen. Die Aktivierung des NF-  $\kappa$ B über den RANK Rezeptor führt zur transkriptionalen Regulation bestimmter Zielgene an der Promoterregion. Zudem werden noch weitere Signalkaskaden über die Wachstumsfaktoren JUN, FOS und FRAN in Gang gesetzt, so dass es zu einer vermehrten Expression der für die Entwicklung der Osteoklasten nötigen Gene kommt (WADA et al., 2005). RANKL ist eine Abkürzung und steht für RANK-Ligand.

RANKL und Osteoprotegerin gehören zu der TNF- Protein- Superfamilie (WADA et al., 2005; LEE et al., 2006). Der aktivierende Rezeptor RANK gehört zum Typ I der Transmembranproteine. Die Aktivierung durch den Liganden (RANKL) von RANK führt dann zur bereits oben beschriebenen weitergehenden Signaltransduktion über verschiedene Enzyme und Wachstumsfaktoren.

Zusammen mit Osteoprotegerin gehört RANKL zu den Zytokinen, die von mesenchymalen Zellen produziert werden, und maßgeblich die Osteoklastenentwicklung regulieren (SUDA et al., 1999)

Osteoprotegerin ist ein löslicher Rezeptor, der RANKL bindet, und damit die Interaktion zwischen RANKL und den Osteoklastenvorläufern verhindert (HOFBAUER et al., 2000). Stoffe, die eine Knochenresorption stimulieren, lassen auch die RANKL-Spiegel steigen und die Osteoprotegerinspiegel fallen. Somit wird davon ausgegangen, dass sowohl RANKL, als auch Osteoprotegerin massgeblich an der Regulation der Osteoklastenentwicklung beteiligt sind (LEE et al., 2006). Osteoprotegerin kommt in den meisten inneren Organen, sowie den Lymphknoten und im Knochenmark vor. RANK wird im Skelettmuskel, in der Leber, im Darm, im Thymus, in der Prostata und anderen Drüsen, sowie im Pankreas und in den Osteoklasten exprimiert (WADA et al., 2005).

TINTUT et al. (2005) konnten in Ihrer Studie nachweisen, dass es unter Abwesenheit von RANKL zu keiner Resorption in angesetzten Kontrollkulturen von calcifiziertem Gewebe

gekommen ist. Bei dieser Studie wurde die Gefäßverkalkung als Vergleich zur Knochenformation und des Remodelings benutzt, da sich die Schlüsselaspekte ähneln.

Auch WADA et al. (2005) beschreiben die Aktivierung des Rezeptors NF- $\kappa$ B (RANK) durch seinen Ligand (RANKL) und die Wechselwirkung zum hemmenden Osteoprotegerin als eine zentrale Regulation der Osteoklastenentwicklung.

Daneben interagiert RANKL auch mit einer Reihe von anderen Liganden-rezeptoren-systemen und trägt hiermit zur Homöostasis in der normalen Physiologie des Knochens bei. Die Möglichkeiten neuer Medikamente, welche in diese Signalvermittlung eingreifen, könnten die Behandlung vieler Knochenkrankheiten revolutionieren.

## Osteopontin

Osteopontin ist ein phosphoryliertes Glycoprotein und ist unter den nicht kollagenen Proteinen der Knochenmatrix häufig vertreten (RITTLING und DEHNHARDT, 1999).

Es wird von aktivierten Makrophagen, Osteoblasten, Osteoklasten, Leukozyten und T-Lymphozyten abgegeben. Es ist in der Extrazellulärflüssigkeit, in inflammatorischen Prozessen und in mineralisiertem Gewebe zu finden. Im Knochen befindet es sich in der mineralisierten Phase der Knochenmatrix. Osteopontin spielt eine wichtige Rolle bei Zell-Matrix und Zell zu Zell-Interaktionen. Im Knochen vermittelt es die Anheftung der Osteoklasten an die Knochenmatrix durch verschiedene Oberflächenstrukturen (Integrine, CD 44). Die Parathormon-gesteuerte Knochenresorption ist von Osteopontin abhängig, während Calcitonin zu einer Hemmung der Synthese von Osteopontin führt. Das Wachstum von Calciumoxalat- Kristallen wird durch Osteopontin verhindert. Aufgrund dieser Aufgaben ist Osteopontin ein wichtiger Bestandteil des Remodelings im Knochen und es kann durch einen Mangel an Osteopontin zur Dysfunktion von Osteoblasten kommen (SODEK et al., 2000).

Darüberhinaus spielt es eine Rolle bei der Chemotaxis. Die Aktivierung von T-Lymphozyten geht mit einer erhöhten Transkription von Osteopontin einher. Daher wird dem Osteopontin auch eine Rolle bei der Pathogenese der Arthritis zugeschrieben (GRAVALLESE, 2003).

### 2.2.6. Die Postmenopausale Osteoporose der Frau

Die Postmenopausale Osteoporose gehört zu den primären Osteoporoseformen und wird auch als Typ I Osteoporose bezeichnet. Sie tritt als Folge des Erliegens der ovariellen Funktion bei Frauen nach der Menopause auf. Männer sind von dieser Form der Osteoporose daher wesentlich weniger häufig betroffen. Die Hauptursache für den verstärkten Knochenabbau ist ein gesteigerter Knochenturnover. Bei diesem kann aber aufgrund des Östrogenmangels der abgebaute Knochen nicht in gleichem Maße durch qualitativ gleichwertiges Knochengewebe ersetzt werden (ERIKSEN et al., 1990). Auch

RIGGS et al. (2001) beschreiben, dass aufgrund des Fehlens von Östrogenen im Anschluss an die Menopause ein Anstieg der Knochenresorption mit einem fortschreitenden Verlust an Knochenmasse resultiert. Der entstehende Verlust an Knochenmasse kann sich von 0,5-1% auf bis zu 3-6% pro Lebensjahr steigern (KALU, 1991).

Die Pathogenese der Osteoporose stellt zwar ein multifaktorielles Geschehen da, jedoch nimmt der Mangel an Östrogen eine zentrale Bedeutung ein. Lange Zeit blieb die Wirkungsweise des Östrogens im Knochenstoffwechsel unbekannt. Die wichtige Rolle der Östrogene wird aber schon durch den Zusammenhang zwischen dem Mangel an Östrogenen und dem Verlust der Knochenmasse nach einer Ovariectomie, oder aufgrund des Erliegens der ovariellen Funktion (im Fall der Postmenopausalen Osteoporose) klar. Zudem kann die Behandlung mit weiblichen Hormonen dem trabekulären Knochenverlust vorbeugen (LINDBERG et al., 2006).

Da die Osteoblasten Rezeptoren für Sexualhormone besitzen, lag die Vermutung, dass Östrogene eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel spielen, nah: Nachgewiesen war, dass ein Mangel an Östrogen zu einer Erhöhung der knochenresorptiv wirkenden Zytokine Interleukin-1 und -6 führte. Das Interleukin 1 (IL-1) System besteht aus IL-1a und IL-1b und dem IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1ra). IL-1a und IL-1b sind als starke Stimuli für die Knochenresorption bekannt (ROMAS und MARTIN, 1997). Sie stimulieren die Vorläuferzellen der Osteoklasten zur Proliferation und zur Differenzierung und aktivieren die reifen Osteoklasten.

Durch den Knochenabbau wird Calcium aus dem Skelettsystem mobilisiert. Um nun die Calciumhomöostase aufrecht zu erhalten wird bei hohen Calciumspiegeln im Serum die Parathormonsekretion gehemmt und die Calciumausscheidung in der Niere forciert. Zum einen ist das Calciumangebot im Glomerulumfiltrat erhöht, und desweiteren wird die Rückresorption von Calcium durch die niedrigen Parathormonspiegel gehemmt. Zudem wird in der Niere durch die niedrigen Parathormonspiegel weniger Vitamin D in seine biologisch aktive Variante umgewandelt. Dieses führt zu einer Verminderung der Calciumaufnahme aus dem Darm.

In vitro konnten HUGHES et al. (1996) nachweisen, dass Östrogene die Apoptose von Osteoklasten hervorrufen. Dieses geschieht, indem die Osteoblasten unter Östrogeneinfluss zu einer gesteigerten Synthese von TGF- $\beta$  stimuliert werden. Wenn nun ein Mangel an Östrogenen besteht, wird damit auch zwangsläufig die TGF- $\beta$  Konzentration fallen. Die Folge ist eine verlängerte Lebensdauer der aktiven Osteoklasten, welches zu einer gesteigerten Resorption des Knochengewebes führt. BLAIR et al. (2005) konnten feststellen, dass es unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  zu einem Abfall der Entwicklungsrate unter der Aktivität von Osteoklasten kommt.

Neben der Einleitung der Apoptose der Osteoklasten ist TGF- $\beta$  ein Wachstumsfaktor der Zellen, die für die Knochenformation verantwortlich sind, so dass niedrigere Konzentrationen an TGF- $\beta$  auf diesem Wege zusätzlich auch noch zu einer verminderten Knochenformation führen. Zusammenfassend ist also festzustellen, dass die Kombination der dargestellten Effekte einer gesteigerten Knochenresorption, bei gleichzeitiger Hemmung der Knochenneubildung, einer der Hauptgründe des Knochenverlustes in der Pathogenese der Postmenopausalen Osteoporose darstellt.

Es ist vor allem der trabekuläre Knochen, der von dem Postmenopausalen Knochenverlust betroffen ist. Dieser hat eine wichtige Funktion bei der Kompensation von Zug- und Druckkräften. Vor allem sind also die Knochen betroffen, denen im Körper wichtige Stützfunktionen unterliegen. Die typische Fraktur der Postmenopausalen Osteoporose ist daher auch die Wirbelfraktur, die entweder als akutes schmerzhaftes Ereignis, oder eher schleichend mit zahlreichen Mikrofrakturen und der Entstehung des sogenannten Witwenbuckels einhergeht. Durch die Mikrofrakturen kommt es zur Verformung der Wirbel und zu schmerzhaften Einbrüchen der Wirbelkörper mit einer nachfolgenden Verkrümmung und Verkürzung der Wirbelsäule (STRACKE, 1992). Da auch der distale Radius und der Oberschenkelhals besondere Stützfunktionen übernehmen, treten aufgrund der Postmenopausalen Osteoporose bei älteren Menschen auch in diesen Bereichen des Skeletts häufig Frakturen auf. Schätzungsweise erleiden ein Drittel der Frauen mit weißer Hautfarbe und einem Lebensalter von über 50 Jahren Frakturen des Beckens, der Hüfte oder der Handgelenke aufgrund der postmenopausal bedingten Knochendefekte (MELTON et al., 1992). Zusätzlich kann bei Frauen des entsprechenden Alters das Krankheitsgeschehen der Postmenopausalen Osteoporose durch das Auftreten der senilen Osteoporose kompliziert werden (LINDSAY, 1995).

Bei der Postmenopausalen Osteoporose handelt es sich um eine Krankheit, die auch aufgrund des gestiegenen durchschnittlichen Lebensalters zu einer immer größer werdenden Belastung für die Betroffenen und das gesamte Gesundheitssystem wird. Die Krankheit kann die Lebensqualität durch verschieden Aspekte beträchtlich senken. Die Folgen der schmerzhaften Frakturen können zur Immobilität und zur Unfähigkeit der Betroffenen werden, ihren Alltag zu leben. Die Einschränkung der Mobilität kann somit zur Isolation mit einem geschwächten Selbstwertgefühl werden, welches letztendlich in Depressionen der betroffenen Person enden kann. Somit kann die Osteoporose eine beträchtliche Einschränkung der Lebensqualität darstellen (DE LA LOGE et al., 2005).

Neben den persönlichen Problemen der Betroffenen stellen die durch die Osteoporose entstehenden Kosten ein ernsthaftes Problem für jedes Gesundheitswesen dar. Dieses wird auch durch die Zahlen der National Osteoporosis Foundation unterstrichen. In der Disease Statistic von 2005 werden über 10 Millionen Menschen mit einem Lebensalter von über 50

Jahren beschrieben, die an der Osteoporose leiden. Damit stellt die Osteoporose die am weitesten verbreitete Knochenkrankheit der westlichen Gesellschaften dar. Etwa weitere 34 Millionen Amerikaner gehören zur Risikogruppe, die vom Knochenverlust betroffen sein kann, und jedes Jahr ist die Osteoporose für mehr als 1,5 Millionen Knochenbrüche der Bevölkerung der Vereinigten Staaten verantwortlich (National Osteoporosis Foundation, Disease statistics 2005).

### 2.2.7. Die ovariectomierte Ratte als Modell für die Postmenopausale Osteoporose der Frau

Der entscheidende Auslöser für die Postmenopausale Osteoporose der Frau ist der Abfall des Sexualhormons Östrogen durch die Menopause (LINDBERG et al. 2006). Um nun unter Versuchsbedingungen ähnliche Voraussetzungen zu schaffen, wäre eine Tierart ideal, bei der es zu ähnlichen Zusammenhängen im Alterungsprozess kommt. Allerdings existiert keine Tierart, abgesehen von wenigen Primaten, bei der es zu einer physiologischen dem Menschen vergleichbaren Menopause kommt. Insofern stellen die vorhandenen Tiermodelle lediglich Kompromisslösungen dar. Um die Postmenopausale Osteoporose der Frau simulieren zu können, muss ein ovarieller Hormonmangel in vivo induziert werden. Dieses geschieht durch die Ovariectomie oder Ovarihysterektomie. Dabei müssen die Charakteristika des Knochenverlustes und seiner Folgen in einem oder mehreren Aspekten denen der Postmenopausalen Osteoporose der Frau entsprechen, so dass die physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen des Tiermodells in Bezug auf die Frau entsprechend ausgewertet werden können. Daneben sollten auch die Phänomene, die als Begleiterscheinungen (Arzneimittelwirkungen und Nebeneffekte des Östrogenmangels) der Krankheit auftreten, vergleichbar sein (KALU, 1991).

DAVIDSON et al. (1987) stellen zudem noch weitere Anforderungen an das Tiermodell: Die Tiere müssen eine gleichwertige Verwendbarkeit aufweisen und die Ergebnisse müssen übertragbar sein. Neben angestrebten geringen Beschaffungskosten und einfacher experimenteller Handhabung muss ein Basiswissen über die biologischen Besonderheiten der ausgewählten Tierart vorhanden sein. Letztendlich müssen die Experimente auch ethisch und sozial vertretbar sein. Trotz all dieser Vorgaben sollten aber die Grenzen der Übertragbarkeit des eingesetzten Tiermodells bedacht werden, um eine möglichst objektive Interpretation der Versuchsergebnisse zu gewährleisten. Aus veterinärmedizinischer Sicht ist zudem noch darzustellen, dass es bei den bisher untersuchten Tiermodellen für die Osteoporose des Menschen zum Knochenverlust, nicht aber zu einer erhöhten Frakturanfälligkeit kommt (RODGERS et al., 1993).

Das am häufigsten eingesetzte Tiermodell stellt die Ratte dar (JEREON et al., 1996); 1991 wurden durch Dike N. Kalu zwei verschiedenen Modelle für die Standardisierung des

Versuchsmodells der ovariectomierten Ratte vorgestellt: Zum einen das „mature rat model“, bei welchem drei Monate alte Ratten, und das „aged rat model“, bei dem 12 Monate alte Ratten verwendet werden. Die Postmenopausale Osteoporose ist eine Erkrankung des erwachsenen Menschen. Das spricht für den Einsatz von adulten Tieren mit abgeschlossenem Knochenwachstum. Allerdings kann der durch die Ovariectomie ausgelöste Knochenschwund bei älteren Tieren durch alters- oder krankheitsbedingte Ursachen überlagert werden. Auch die höheren Anschaffungskosten, die Verfügbarkeit und die wesentlich längere Zeitdauer, bis sich mit Hilfe der histologischen und biochemischen Parameter ein Knochenverlust der älteren Ratten nachweisen lässt, sprechen für die Verwendung der jüngeren, drei Monate alten Tieren. Bei den drei Monate alten Ratten zeigen sich die Effekte der Ovariectomie bereits nach etwa einem Monat (KALU, 1991) und das Angebot an Versuchstieren dieses Alters ist grösser.

Ratten bieten einige praktische Vorteile, um die Postmenopausale Osteoporose der Frau zu untersuchen. Sie sind relativ kostengünstig, in großer Menge zu beschaffen und einfach in ihrer Unterbringung. Da die Ratte seit langer Zeit für Tierversuche eingesetzt wird, gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen bezüglich des Mineralstoffwechsels (vor allem über den Calcium- und Phosphorspiegel), der verschiedenen Knochenmarker und der histomorphometrischen Auswertung (RODGERS et al., 1993; NEWMAN et al., 1995), die als Vergleichswerte zur Interpretation der gewonnenen Ergebnisse genutzt werden können. Ovariectomierte Ratten weisen ähnliche Reaktionen im Hinblick auf therapeutisch wirksame Substanzen auf wie die postmenopausal-osteoporotische Frau. So konnten Östrogene (LINDSAY 1988), Biphosphonate (STORM et al., 1990), Parathormon (HORI et al., 1988) und Calcitonin (MACINTYRE et al., 1988) erfolgreich an der Ratte getestet werden.

Die Amerikanische Food and Drug Administration hat zudem die ovariectomierte Ratte als Modell für Studien zur Untersuchung von Medikamenten für die Behandlung und Prophylaxe der Osteoporose zugelassen (US FDA, 1994).

Als Nachteile der Ratte als Versuchsmodell müssen die kleine Körpergröße und das damit verbundene geringe Blutvolumen, sowie die hohe metabolische Grundaktivität gesehen werden. Aufgrund des kurzen Lebensalters sind Langzeitstudien anhand des Rattenmodells nicht möglich. Da es sich bei Ratten um Quadrupeden handelt, neigen die Versuchstiere im Gegensatz zur osteoporotischen Frau nicht zu einer erhöhten Frakturanfälligkeit, obwohl sich die pathophysiologischen Mechanismen im Anschluss an eine Ovariectomie ähneln. Bei strenger Betrachtung dürfte daher die Ratte nicht als Modell für die Postmenopausale Osteoporose bezeichnet werden, sondern nur als Modell für den postmenopausalen Knochenverlust, da nur bei der Frau die per definitionem festgelegten klinischen Erscheinungsbilder eintreten.

In der folgenden Tabelle 2.6 sind die Unterschiede und Ähnlichkeiten zwischen der postmenopausalen Frau und dem Versuchsmodell der ovariectomierten Ratte zusammengestellt.

Tabelle 2.6: Unterschiede zwischen dem Versuchsmodell Ratte und der postmenopausalen Frau

Ratte	Frau
Östrogenspiegel fällt abrupt nach der Ovariectomie	Kontinuierlicher Abfall des Östrogenspiegels
Keine Havers'schen Kanäle und daher fehlendes intrakortikales Remodeling	Intrakortikales Remodeling vorhanden aber wichtiger ist der Ausfall des trabekulären Remodelings durch die primäre Osteoporose
Lebenslange Modeling Aktivität	Verminderte Osteoblastenfunktion in späteren Stadien der Osteoporose
Quadrupeden; Auftreten von anderen biomechanischen Kräften als beim Bipeden	Bipeden

Tabelle 2.7 Übereinstimmungen in Bezug auf den Knochenstoffwechsel bei der Ratte als OVX-Modell und der postmenopausalen Frau

Knochenverlust durch den Abfall des Östrogens
Erhöhter Knochen turnover mit einer gesteigerten Knochenumbaurate
Verlust von trabekulärem Knochen ist höher als von kortikalem Knochen
Geringe intestinale Calciumabsorption
Parameter der Knochenresorption steigen im Serum und im Harn
Zunahme des Körpergewichtes schützt vor Knochenverlust
Arzneimittel zeigen vergleichbare Wirkungen

## 2.3. Zulassungsbestimmungen für Medikamente, die zur Prävention oder Therapie der Postmenopausalen Osteoporose eingesetzt werden

Seit dem Jahre 1979 bindet die US Food and Drug Administration die Zulassung von Osteoporosemedikamenten an verschiedene Testreihen (COLMAN, 2002; HUBBARD, 2004), in denen unter Versuchsbedingungen die Wirksamkeit der zu testenden Medikamente anhand von verschiedenen Modellen nachgewiesen werden muss.

Die Medikamente müssen in dreiphasigen Studien getestet werden. Diese setzen sich aus der ersten, oder präklinischen Phase, und den klinischen Phasen 2 und 3 zusammen.

In der präklinischen Phase dienen Tiermodelle als Vergleich zur postmenopausalen Frau, während die klinischen Phasen 2 und 3 die Wirkung der Medikamente auf den Knochenstoffwechsel von Probanden untersuchen.

Abschliessend wird zudem die Sicherheit der Medikamente in der vierten Phase beurteilt.

1979 wurde in den klinischen Phase 2 und 3 die Knochenmasse anhand von Einzelphotonabsorbtion und mittels der Ganzkörper-Neutronen-Aktivierungsanalyse bestimmt (COLMAN, 2002).

Dieses änderte sich 1984, als die Untersuchungen den neuen technischen Möglichkeiten angepasst wurden und die Guidelines überarbeitet wurden (HUBBARD, 2004). Die Bestimmung der Knochenmasse erfolgte mit Hilfe der Doppel-Photonen-Absorbtion, und die Probanden wurden mit Vitamin D und Calcium substituiert (COLMAN, 2002). Außerdem stand nun zusätzlich die Prävention der Osteoporose im Vordergrund.

1994 wurde die Knochendichte mit dem neueren DEXA (Dual energy x-ray absorptiometry)-Verfahren gemessen und anhand der gewonnenen Daten fand eine Abschätzung des Zustandes des Skelettes und der Frakturwahrscheinlichkeit statt (COLMAN, 2002).

Die vorliegende Version der „*Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis*“ stammt aus dem Jahre 1994 und stellt damit die aktuelle Version der Guidelines dar.

Den klinischen Studien am Menschen müssen präklinische Studien voran gehen. In diesen steht die Auswirkung der Medikamente auf die Knochenqualität im Vordergrund. Dieses geschieht vor dem Hintergrund, dass eine alleinige Bestimmung der Knochendichte unzureichend ist, um Architektur und Belastbarkeit des Knochens richtig einschätzen zu können. Die Qualität des Knochens wird durch die Knochenmasse, die Architektur und die Knochenstärke bewertet (RIZZOLI, 2002; BONE, 2002).

Da es keine Tierspezies gibt, die alle Charakteristika der menschlichen Osteoporose aufweist, müssen zwei Versuchsreihen als präklinische Studien an unterschiedlichen Versuchstieren durchgeführt werden (RODAN, 2002).

Diese präklinischen Studien sollen sich in zwei verschiedene Versuchsreihen teilen: Zunächst werden die zu testenden Medikamente an ovariektomierten Ratten als „small animal model“ getestet. Es schliessen sich Testreihen an grösseren Tieren oder „large animal models“ (BONE, 2002; RIZZOLI, 2002), welche die Möglichkeit des Remodelings des Knochens besitzen, an. In aller Regel handelt es sich hier um Primaten, wobei es jedoch dem Auftraggeber der Studien unterliegt, eine passende Tierart auszuwählen.

Der Vorteil der präklinischen Testreihen an Versuchstieren ist die Möglichkeit der direkten Entnahme und Analyse des zu untersuchenden Knochengewebes.

Die präklinischen Studien sollen die Wirksamkeit der zu testenden Substanzen in Bezug auf die klinische Indikation (Prävention oder Behandlung der Postmenopausalen Osteoporose), den Behandlungsablauf (fortlaufenden oder intermittierende Medikamenteneinnahmen) und die Dosis (Verträglichkeit der bis zu fünffach erhöhten Dosis) vergleichen (RIZZOLI, 2002).

Die Dauer der präklinischen Studien sollte so gewählt werden, dass eine Vergleichbarkeit zur 4 Jahre dauernden Einnahme beim Menschen besteht. Die zu messenden Parameter schließen die biochemischen Marker der Knochenresorption und Formation, die histomorphometrische Analyse der Knochenarchitektur, die Messung der Knochendichte und der biomechanischen Eigenschaften (Druck- und Zugkräfte) des Knochens ein (RIZZOLI 2002). Die histomorphometrischen Messungen, die biomechanischen Messungen und die Dichtebestimmung sollen an Tibia und Femur und den Lendenwirbeln vorgenommen werden. Wenn möglich, soll eine Übereinstimmung der Techniken der klinischen und präklinischen Testreihen bestehen.

## 2.3.1. Präklinische Studien

### Studiendesign

Bei einer Studie, welche ein Medikament für die Prävention der Osteoporose testet, muss die Behandlung sich unverzüglich an die Ovariektomie anschließen. Ein Präparat zur Osteoporosebehandlung verlangt folglich auch nach Versuchstieren, bei denen sich infolge der Ovariektomie bereits ein signifikant nachweisbarer Knochenverlust entwickelt.

Der Behandlungsablauf der präklinischen Studie muss sich genau an die später geplanten Medikamenteneinnahmen orientieren, um auch hier eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen.

Die Behandlung der Versuchstiere erfolgt mit zwei unterschiedlich hohen Dosierungen des Medikamentes (BONE, 2002). Zunächst werden die Tiere mit der in Vorversuchen

ermittelten optimalen Dosierung behandelt. Diese Dosierung wird dann um das fünffache gesteigert. Zum einen können hierdurch die relevanten Informationen über Knochendichte und Belastbarkeit gewonnen werden, und auf der anderen Seite wird der Sicherheitsaspekt durch die fünffache Erhöhung der Dosis berücksichtigt.

Die Dauer der präklinischen Experimentalphase sollte aufgrund der Dauer des Knochenturnovers gewählt werden. Als Knochenturnover wird der komplette Vorgang der Knochenformation und Knochenresorption bezeichnet. Dieser vollzieht sich beim Menschen zwei bis viermal im Zeitraum von 100 bis 200 Tagen. Bei den Versuchstieren Ratte und Affe ist etwa mit neun Turnovern im Jahr zu rechnen. Die Dauer der präklinischen Versuchsreihen muss nun so lang gewählt werden, dass sie dem Knochenturnover eines Menschen über einen Zeitraum von vier Jahren entspricht (BONE, 2002), so dass sich eine Tierversuchsdauer von mindestens 16 Monaten ergibt (RIZZOLI, 2002). Bei Affen kann die Dauer aufgrund der Lebenserwartung gesteigert werden.

## Tiermodelle

Zunächst müssen die Tierspezies in zwei Kategorien unterteilt werden: auf der einen Seite die Tiere, welche ein Remodeling des Knochens aufweisen (Primaten, Schweine, Schafe) und auf der anderen Seite Ratten, die lediglich über ein Modeling des Knochens verfügen (US FDA 1994). Hierbei findet physiologisch kein Abbau des Knochengewebes statt. Darüber hinaus werden die Tiermodelle noch in die Kategorien beschleunigter Knochenabbau und verminderte Knochenformation eingeteilt, welches durch Ovariectomie, Kastration oder durch die Gabe verschiedener Medikamente erreicht wird.

## Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels

Als Marker für die Knochenresorption wird Pyridinolin aus dem Urin gemessen. Als Marker für die Knochenformation sind sowohl Osteocalcin, als auch alkalische Phosphatase zugelassen.

## Knochenmasse und Knochendichtemessung

Bei den Modeling- Tieren (Ratten und Mäuse „small animal model“) werden Knochenmasse und –dichte vor allem über das Gewicht der Knochenasche bestimmt. Aber auch DPA (Dual photon absorptiometry), DEXA ( Dual energy x-ray absorptiometry) und QCT (Quantitative computed tomography) können bei den kleineren Tieren zum Einsatz kommen. Bei den Remodeling-Tieren („Large animal model“) kommen alle gebräuchlichen Absorbtiions- und Tomographietechniken wie SPA (Single photon absorbtometry), DPA, DEXA und QCT zum Einsatz, die sich aber in Zukunft aufgrund des technischen Fortschritts noch erweitern können.

## Analyse der Knochenarchitektur und Histologie

Mit Hilfe der Tartrat resistenten sauren Phosphatase können die Osteoklasten sichtbar gemacht werden und polarisiertes Licht dient zum Erkennen der Kollagenfasern. Neben diesen relativ einfachen Techniken werden auch technisch kompliziertere Techniken eingesetzt. Ein Beispiel ist der Einsatz von Tetracyclin am Knochen, durch welchen Informationen über den Knochenstoffwechsel erhalten werden können.

## Biomechanische Verfahren um die Belastbarkeit des Knochens zu untersuchen

Die drei Hauptmöglichkeiten die Stabilität eines Knochens zu prüfen sind das Biegen, das Verdrehen und Druckbelastung. Biegen und Verdrehen wird an Tibia und Femur, die Druckbelastung am Wirbelkörper ausgeführt.

### 2.3.2. Klinische Studien

Zunächst sollen die Arzneimittel den allgemein gültigen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Testverfahren unterzogen werden.

In den Phase 2 Studien werden zunächst 12 Monate dauernde, doppelt blinde, Placebo kontrollierte Versuche mit parallelen Gruppen durchgeführt, um die minimal effektive Dosis herauszufinden und eine Dosis Wirkungskurve zu erstellen. Ein Wert wird festgelegt, der dem Unterschied zwischen der Placebogruppe (ihre Knochendichte stellt die Nulllinie dar) und den mit dem Medikament behandelten Patienten in Bezug auf eine Verbesserung der Knochendichte entspricht. Es kommen folgende Tests zum Einsatz, um die Pharmakodynamik des zu testenden Medikamentes zu untersuchen:

- Messung des Parathormonspiegels aus dem Serum
- Messung der biologisch aktiven Vitamin D Metaboliten
- Messung des Urin-hydroxyprolins oder anderer Knochenmatrixkomponenten
- Studien über die Calciumhomöostase und die Aufnahme von Calcium aus dem Darm
- Knochenbiopsien zu Beginn und zum Ende des Versuches

Die Phase 3 Studien müssen folgendermaßen durchgeführt werden: Nach den präklinischen Tests an den bereits beschriebenen Tierarten und den Phase 2 Studien müssen die Effizienz und die Sicherheitsbestimmungen der zu testenden Medikamente diskutiert und festgelegt werden. Es besteht ein Unterschied bei den Untersuchungen, je nachdem, um was es sich für ein Präparat handelt: Bei Östrogenen wird sowohl in der Osteoporoseprävention, als auch in der Osteoporosetherapie die Knochendichte gemessen, um die Wirksamkeit des Präparates festzustellen. Dieses liegt der Tatsache zugrunde, dass der Einsatz von

Östrogenen in vielen Studien zu einer signifikanten Reduktion der Häufigkeit von Frakturen geführt hat. Anders verhält es sich mit nicht-östrogenhaltigen Präparaten. Diese werden in der Osteoporoseprophylaxe zwar auch mit der Methode der Knochendichte beurteilt, aber falls diese Medikamente für die Behandlung der etablierten Osteoporose eingesetzt werden sollen, müssen sie unter dem Aspekt der Verhinderung von Frakturen getestet werden.

## Medikamente zur Behandlung von Patienten mit etablierter Osteoporose

### Studiendesign

Studien für die Behandlung von Patienten, die aufgrund der Osteoporose bereits unter Frakturen leiden, sollen in doppelt blinden, randomisierten Gruppen getestet werden. Entweder wird ein Placebo oder ein bereits als wirksam anerkanntes Medikament als Vergleich benutzt. Allerdings bedeutet die Benutzung eines anderen Medikamentes einen höheren Aufwand der Planung, um eine Vergleichbarkeit der Substanzen sicherzustellen. Die Anzahl der Probanden muss so gewählt werden, dass am Ende der Studie bei einem Vergleich der Substanzen ein signifikantes Ergebnis vorhanden ist.

### Studienteilnehmerinnen

Die Teilnehmerinnen der Studie müssen seit 5 Jahren in der postmenopausalen Phase sein, und entweder bereits Frakturen der Wirbelkörper aufweisen, oder eine Knochendichte von  $\leq 2$  S.D. unterhalb des durchschnittlichen Peaks von prämenopausalen Frauen besitzen. Desweiteren sollten die Probanden ein Mindestalter von 60 Jahren haben und Symptome wie Knochenschmerzen oder Gewichtsverlust aufweisen.

## Medikamente zur Prävention der Osteoporose bei asymptomatischen Patienten

### Studiendesign

Wenn ein Medikament für die Behandlung der Osteoporose zugelassen wurde, kann die Knochendichte als vielversprechender Parameter für Versuche zur Prävention der Osteoporose gesehen werden. Die Untersuchungen müssen randomisierte, doppelt blinde, Placebo kontrollierte Versuchsabläufe umfassen, in denen verschiedene Dosierungen gewählt werden, um die minimal effektive Dosis zu bestimmen. Diese Studien müssen sich über einen Zeitraum von 2 Jahren erstrecken und die Anzahl der Probanden muss so gewählt werden, dass Effektivität und Sicherheit des Arzneimittels gewährleistet sind.

## Studienteilnehmerinnen

Die Teilnehmerinnen sollten sich seit 1 bis 3 Jahren in der Menopause befinden und älter als 45 Jahre sein. Sie dürfen noch keine Symptome oder Anzeichen der etablierten Postmenopausalen Osteoporose aufweisen. Daneben können auch ovariektomierte Frauen an den Versuchen teilnehmen, die ein erhöhtes FSH Level mit niedrigen Estradiol Werten im Serum aufweisen. Patienten, die zur Risikogruppe gehören, welche die Postmenopausale Osteoporose ausbilden könnten, sollen ebenfalls Eingang in die Teilnehmergruppen finden. Neben detaillierten Beschreibungen und Aufzählungen der Messmethoden legen die Guidelines auch die Auswertung der Ergebnisse fest, um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Studien zu garantieren.

Die Phase 4 befasst sich nun abschließend noch einmal genau mit der Sicherheit des jeweiligen Medikamentes, wobei die bereits gewonnenen Daten Eingang in die Beurteilung und Testreihen finden. Untersucht wird die Wirkung auf das blutbildende System, die Auswirkung auf die Funktion der Niere, der Leber und die Elektrolythomöostase. Darüber hinaus werden Glucose im Plasma, Proteine im Serum, sowie der Harn, das Herz und die Gerinnungszeit (Prothrombinzeit) untersucht. Bei einer repräsentativen Anzahl der Patienten muss zudem noch eine Untersuchung der Augen erfolgen. Da Calcium und Phosphor eine wichtige Rolle in Bezug auf den Knochenstoffwechsel spielen, werden die Serumkonzentrationen dieser Ionen in den meisten Fällen, und Urincalcium und Urinphosphat in einigen Fällen kontrolliert. Anhand von Röntgenbildern und Ultraschall werden die Patienten bei gegebenem Anlass auf Weichteilverkalkungen untersucht. Histomorphometrische Untersuchungen bezüglich der Knochenmineralisationsdefekte und eine Darstellung der Knochenbrüchigkeit soll klarstellen, ob die Medikamentengabe sich negativ auf die Knochenstruktur und/oder die biomechanischen Eigenschaften des Knochens auswirkt. Allerdings soll die Knochenbiopsie aufgrund der Invasivität erst so spät wie möglich im Verlauf der Studie entnommen werden.

Falls ein Medikament mehrere pharmakologisch wirksame Bestandteile enthält, legt die FDA auch hier genaue Angaben in Bezug auf die Versuchsabläufe fest.

Das letzte Kapitel der Guidelines befasst sich mit Prioritäten, welche die Forschung sich beim Krankheitskomplex der Postmenopausalen Osteoporose setzen sollte:

- Die Entwicklung von zweckmäßigen Prüfungsmethoden, die für die Routine Diagnostik in klinischen Versuchen geeignet sind
- Weitere Erforschung der Knochenmarker und ihrer Verwendung
- Korrelation von Wirbeldeformation, Frakturen und Knochendichte

- Abschätzung der Sensitivität und Spezifität von Wirbelfrakturen
- Abschätzung der Knochenqualität anhand nicht invasiver Methoden in klinischen Versuchen

(US FDA, 1994)

## 3 Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Fütterung von Seltenen Erden auf den Knochenstoffwechsel bei ovariectomierten Ratten als Modell für die Postmenopausale Osteoporose der Frau untersucht. Es wurden vier verschiedene Futterzusätze verwendet; je ein Futter mit Lanthanarbonat und ein Futter mit einer Mischung aus Seltenen Erden und Citrat. Zusätzlich wurden 2 der 4 Versuchsfuttersorten noch mit Vitamin D supplementiert.

### 3.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 70 weibliche Wistar Han Ratten. Die Tiere dieses „Small animal Osteoporosemodels“ stammten aus einer SPF-Zucht (spezifisch pathogenfrei) der Charles River Laboratories in L'Arbresle in Frankreich. Zehn der 70 Tiere waren nicht kastriert, sondern lediglich scheinoperiert.

Die Ovariectomie und die Scheinoperation („SHAM- Operation“) wurden im Alter von elf Wochen bei den Ratten durch Mitarbeiter der Firma Charles River in L'Arbresle, Frankreich durchgeführt. Die Ratten wurden eine Woche später, im Alter von zwölf Wochen, angeliefert. Die Studie wurde nach Anmeldung des Versuchsvorhabens mit der Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt.

### 3.2. Die Operationstechniken

#### 3.2.1. Die Ovariectomie

Durch einen Schnitt in der Flankengegend (zwischen letzter Rippe und Schwanzansatz) wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Ovarien entfernt. Der Verschluss der Wunde erfolgte durch Adaption der Hautschichten mit Wundklammern, welche zehn Tage post operationem entfernt wurden. Zur Vermeidung einer Infektion wurde antibiotikahaltiges Wundspray aufgetragen. Zudem bekamen die Tiere noch eine systemische Antibiose.

#### 3.2.2. Die Scheinoperation („SHAM-Operation“)

Bei der Scheinoperation wurde in der gleichen Verfahrensweise vorgegangen, wie bei der Ovariectomie.

Die Ovarien wurden hier allerdings lediglich mit einem Kastrationshaken aus der Bauchhöhle hervorgezogen, um dann wieder reponiert zu werden. Die Scheinoperation hatte den Sinn, gleiche Ausgangsbedingungen hinsichtlich Narkose und Operation bei den Tieren herzustellen. Aufgrund des ausgelösten Stresses einer Operation kann es zu Verzehr- und

Wachstumsdepression kommen. Daneben besteht auch ein Zusammenhang zwischen Immunsystem, Entzündungsmediatoren und dem Knochengewebe (RAISZ et al., 1993).

### 3.3. Versuchstierhaltung

Die Versuchstiere wurden in einem fensterlosen, voll klimatisierten Raum paarweise in Makrolonkäfigen vom Typ IV mit erhöhtem Deckel der Firma TECHNIPLAST, Hohenpeißenberg, gehalten. Die Käfige hatten eine Abmessung von 59,5 cm x 38 cm x 20 cm.

Makrolon ist ein aus Polycarbonat bestehendes und bruchsaicheres Plastik, welches sich im Autoklaven bei bis zu 120°C sterilisieren lässt. Die Käfige wurden durch einen erhöhten Deckel aus geschweißtem Draht mit einer eingesenkten Futterraufe und einer Halterung für die Trinkflasche abgeschlossen. In einem Käfigständer hatten jeweils 20 Käfige mit einem Besatz von je zwei Ratten Platz. Während der Versuchsdurchführung wurde ein konstantes Lichtprogramm mit einem Tag- und Nachtrythmus von zwölf Stunden eingehalten. Die Raumtemperatur lag durchschnittlich bei 23°C. Die Luftfeuchte betrug im Durchschnitt 43%. Sowohl Futter, als auch Wasser (Leitungswasser) stand den Tieren ad libitum zur Verfügung.

### 3.4. Tierfutter

Die Trägersubstanz bestand aus einem handelsüblichen Alleinfuttermittel für Nager (Nr. 3430) und wurde den Tieren in pelletierter Form angeboten.

Das Futter wurde während des Versuches alle zwei Wochen zurückgewogen. Aus der Differenz bei voller Futterraufe und dem Gewicht des Futters zwei Wochen später errechnete sich der Futtermverbrauch. Dementsprechend konnte für die Tiere eines Käfigs gemeinsam ein durchschnittlicher Futtermverbrauch errechnet werden.

Tabelle 3.1: Futterzusammensetzung des Alleinfutters für Laborkleinnager

Rohprotein	18,5%
Rohasche	6,3%
Rohfett	4,5%
Rohfaser	4,5%

ME Ratte	12,5 MJ/kg
Calcium	10,5 g/kg
Phosphor	8 g/kg
Lysin	10 g/kg
Met/Cys	7 g/kg
Vitamin A	14000 IE/kg
Vitamin D	800 IE/kg
Vitamin E	80 IE/kg

In das Futter der Therapiegruppe LaCo wurde Lanthanarbonat in der in der Tabelle angegebenen Dosierung eingemischt. Das Futter der Therapiegruppe LaCo+VD wurde zusätzlich mit Vitamin D versetzt.

In das Tierfutter der Therapiegruppen REE-Citrat und REE-Citrat+VD wurde die Seltene Erden-Citrat-Futtermischung eingemischt, wobei wiederum REE-Citrat +VD zusätzlich Vitamin D verabreicht wurde.

Den Dosierungen des Lanthans in der vorliegenden Studie lagen die Studien von D' HAESE et al. (2003) und SWAINSTON HARRISON und SCOTT (2004) zugrunde, welche die Einsatzmöglichkeiten und Wirkungen von Lanthan untersuchten. D'HAESE et al. (2003) verabreichten dabei 3,75 g, während SWAINSTON HARRISON und SCOTT (2004) eine Dosierung von 9,0 g pro Tag und Patient wählten. Ausgehend von diesen Studien wurden die Dosierungen auf die Ratte als Tiermodell umgelegt.

Dabei wurde von einem Gewicht von 300 g der Ratte und einer Futteraufnahme von 20 g am Tag ausgegangen. Lanthanarbonat enthält im Durchschnitt eine 4 fach höhere Konzentration an Lanthan als die ebenfalls verfütterte Seltene Erden-Citrat Mischung. Daher wurde die Seltene Erden-Citrat-Mischung 4 fach höher dosiert.

Die Zugabe des Vitamin D unterstützt die Aufnahme von Calcium in den Knochen. Der Dosierung lagen die Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung zur Prophylaxe der Postmenopausalen Osteoporose zugrunde.

## 3.5. Versuchsaufbau

### 3.5.1. Gruppeneinteilung

Die im Alter von Elf Wochen entweder ovariektomierten (n=60) oder SHAM-operierten (n=10) Ratten wurden am Tag ihrer Ankunft in die Versuchsstallungen paarweise eingesetzt. Von allen Tieren wurde das Gewicht bestimmt. Anschließend wurden die Ratten nach Körpergewicht den einzelnen Versuchsgruppen zugeteilt, wobei jeweils ein leichtes Tier mit einem schwereren Tier zusammengesetzt wurde, um gleichmässige Ergebnisse zu erhalten. Es folgte eine zweiwöchige Eingewöhnungsphase, in der alle Tiere das pelletierte, nagerübliche Versuchsfutter „Altromin 1324“ der Firma ALTROMIN GmbH, Lage, sowie Leitungswasser ad libitum erhielten. Zum Ende dieser Eingewöhnungsphase wurde den Tieren Blut abgenommen und der Urin von 24 Stunden gesammelt.

Diese Werte dienten als Nullwerte. Anschließend folgte die Futterumstellung auf das Therapiefutter.

Tabelle 3.2 zeigt die Aufteilung in Kontrollgruppen und Therapiegruppen mit der jeweiligen Futterzusammensetzung. Gruppen SHAM und OVX stellten die Kontrollgruppen dar. Sie erhielten ein Standard- Erhaltungsfutter für Laborkleinnager. Die Gruppe SHAM stellte die Positivkontrolle dar und war als einzige Gruppe nicht ovariektomiert, sondern scheinoperiert. Die Gruppe OVX diente als Negativkontrollgruppe. Die Gruppen LaCo und LaCo+VD erhielten das Therapiefutter mit Lanthancarbonsäure und Lanthancarbonsäure mit Vitamin D. Die Gruppe REE-Citrat erhielt die Seltene Erden-Citrat Mischung und Gruppe REE-Citrat+VD zusätzlich noch Vitamin D.

Tabelle 3.2 : Gruppeneinteilung der Therapie- und Kontrollgruppen und die Futterzusätze pro kg Futter

SHAM	Scheinoperiert	Positivkontrolle
OVX	Ovariektomiert	Negativkontrollgruppe
LaCo	1,74 g Lanthancarbonsäure	Therapiekontrollgruppe
LaCo Vitamin D*	1,74 g Lanthancarbonsäure mit Vitamin D*	Therapiekontrollgruppe
REE-Citrat	8 g Seltene Erden- Citrat Mischung (La 2,4 g, Ce 4,4 g, Pr 0,4 g, Nd 0,8 g)	Therapiekontrollgruppe
REE-Citrat Vitamin D*	8 g Seltene Erden- Citrat- Mischung (La 2,4 g, Ce 4,4 g, Pr 0,4 g, Nd 0,8 g) mit Vitamin D*	Therapiekontrollgruppe

\*=1500 internationale Einheiten

### 3.5.2. Serumgewinnung

Alle vier Wochen wurde den Versuchstieren Blut aus der Vena Saphena entnommen. Die Entnahme erfolgte ausschließlich in den Vormittagsstunden, um einer Verfälschung der Werte durch circadiane Schwankungen entgegenzuwirken.

Um die Entnahmezeitpunkte der zehn Tiere aus einer Gruppe gleichmäßig auf den Vormittag zu verteilen, wurden die Tiere von Beginn der ersten Blutentnahme meanderförmig randomisiert, das heißt, dass nach jeweils zwei Tieren aus einer Gruppe zwei Tiere aus der nächsten Gruppe folgten.

Zur Fixation der Tiere während der Blutentnahme kam eine Röhre zum Einsatz, in welche die Ratten mit dem Kopf voran hineinkrochen. Eine Hilfsperson konnte nun die Beine und den Schwanz des Versuchstieres fixieren und die Vena saphena stauen. Dieses Verfahren hat sich als vergleichsweise stressfrei für die Tiere herausgestellt. Um eine sichere Handhabung der aus handelsüblichen Plastikflaschen hergestellten Röhren zu garantieren, wurden diese auf ein Brett geklebt.

Durch das Wachstum der Tiere mussten die Röhren im Verlauf der Experimentalphase mehrere Male dem Körperrumfang der Tiere angepasst werden.

Zunächst kamen Kanülen mit einem Durchmesser von 0,7 mm zum Einsatz. Durch das Wachstum der Tiere konnten später dann 0,9 mm dicke Kanülen benutzt werden. Beide Arten der Kanülen stammten von der Firma Neolus®.

Um der vorzeitigen Koagulation des Blutes entgegenzuwirken, wurde der Plastikonus einer jeden Kanüle entfernt.

Das Blutentnahmenvolumen war aufgrund der Körpergröße der Ratten auf 500 µl begrenzt. Hieraus ergeben sich ca. 200 µl Serum.

Nachdem die entnommenen Proben geronnen waren, wurden die Proben 5 Minuten lang in einer EPPENDORF MINI SPIN PLUS Zentrifuge bei 6000 U/ min zentrifugiert.

Das klare Serum wurde mit einer 200 µl Pipette (EPPENDORF AG, HAMURG) abpipettiert und in 0,75 ml- Eppendorf-Cups gegeben und bei -20°C eingefroren.

### 3.5.3. Uringewinnung

In den gleichen Zeitabständen (alle vier Wochen) wurde der Urin der Tiere gesammelt. Aus technischen Gründen war die Uringewinnung immer um einen Tag zur Blutentnahme versetzt, da jeweils die Hälfte der Tiere über 24 Stunden in Stoffwechselkäfigen der Firma EHRET, Emmendingen, gesetzt wurde, während den verbleibenden Tieren Blut abgenommen wurde. Sowohl Wasser, als auch das standardisierte Futter der einzelnen Gruppen stand den Tieren während der Zeit im Stoffwechselkäfig ad libitum zu Verfügung.

Da der Urincreatininquotient in die spätere Auswertung der zu bestimmenden Parameter miteingerechnet wurde, konnte auf eine Kontrolle der verbrauchten Trinkwassermenge verzichtet werden.

Der gewonnene Urin wurde dann in 1,5 ml Eppendorf-Cups pipettiert und bei -20°C eingefroren.

### 3.6. Versuchsende

Der Fütterungsversuch endete nach 6 Monaten, wobei die Tiere noch ein letztes Mal gewogen wurden und es erfolgte die letzte Blutentnahme und die letzte Uringewinnung. Um die nötigen Analysen an den Knochen und den Organen der Tiere durchzuführen, wurden die Tiere dann getötet.

Die Versuchstiere wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen getötet; am ersten Tag die Ratten der Kontrollgruppen SHAM und OVX, am zweiten Tag die Gruppen LaCo, LaCo+VD, REE-Citrat und REE-Citrat +VD.

Um einen möglichst stressfreien Tod der Tiere zu gewährleisten, kamen große Exsikkatoren aus Glas mit einem doppelten Boden zum Einsatz. Unter den ersten Boden wurden mit Äther (Diethylether, Art. Nr. 5920. 3, ROTH, Karlsruhe) getränkte Zellstofftücher eingelegt, so dass die Ratten den Dämpfen ausgesetzt waren.

Bei der darauf folgenden Sektion wurde den Tieren die abdominale Hohlvene caudal der Leber durchtrennt. Nun wurden den Tieren das Herz, die Nieren, die Leber, die Lunge und die Bauchorta entnommen. Die entnommenen Organe wurden dann mit einer Präzisionsanalysenwaage (CP 224 S, SARTORIUS AG, GÖTTINGEN) gewogen, und anschließend in kleine, wiederverschließbare Plastiktüten (Medikamententüten, bezogen von Heiland Med.Vertriebsgesellschaft, Hamburg) gepackt, und bei -20°C tiefgefroren.

Nach Entnahme der genannten Organe wurden nun Tibia, Fibula und Femur beider Hinterbeine vom Tier entfernt und freipräpariert. Das gleiche geschah mit der Lendenwirbelsäule. Die Präparation erfolgte mit feiner Präparierschere und Einmalskalpellen (bezogen von der Firma Heiland Med. Vertriebsgesellschaft, Hamburg).

Nach vollständiger Entfernung der Muskeln, Sehnen, Bändern und sonstigem anhaftendem Gewebe wurden die zu analysierenden Knochen in Kompressen gewickelt, welche in Ringerlösung getränkt waren. Dieses wirkte einer Austrocknung während des Einfrierens entgegen.

## 3.7. Bestimmung der Parameter des Knochenstoffwechsels aus dem Serum

### 3.7.1. Osteocalcin im Serum

Die Bestimmung der Konzentration des Knochenmarkers Osteocalcin wurde mit einem Sandwich-ELISA-Test vorgenommen. Dieser speziell für Ratten hergestellte ELISA stammte von der Firma Nordic Bioscience Diagnostics A/S Herlev, Denmark (Rat-MID® Osteocalcin Elisa), und ist in der Lage sowohl carboxyliertes, als auch decarboxyliertes Rattenosteocalcin zu messen.

Durch den Hersteller wurden die angegebenen Normbereiche der Osteocalcinkonzentration im Serum (ng/ml) 3 Monate alter, weiblicher Sparque Dawley Ratten mit diesem Assay wie folgt angegeben:

Probandenanzahl	n=30
MW	417,8 ng/ml
SD	83,5 ng/ml
Mittelabw	15,3 ng/ml

#### Reagenzien und Material:

Rat-MID, Osteocalcin ELISA der Firma Nordic Bioscience Diagnostics A/S, Herlev, Denmark, bestehend aus:

- Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte (MTP)
- Probendiluent
- Osteocalcinstandards A–F (0, 35,5; 110,3; 247,8; 479,3 und 1071,2 ng/ ml)
- Kontrolle (185,8 ng/ml)
- synthetisches, humanes Osteocalcin
- Primärer Antikörper (spezifisch für die mittlere Molekülstruktur, Aminosäuren 21–29) zu vermischen mit primärem Inkubationspuffer
- Sekundärer Antikörper (peroxidasekonjugiert, spezifisch für Mäuse-IgG)
- Tetramethylbenzidin (TMB)- Chromogen-Lösung
- Stopplösung
- Waschlösung
- Abdeckfolie für MTP
- Assay Reader Sunrise Remote, Tecan, Crailsheim

- Bidestilliertes Wasser, Reinstwasseranlage der Serie Ultra Clear, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
- Präzisionspipette 10 µl , 1000 µl mit dazugehörigen Spitzen von Eppendorf AG, Hamburg
- Semiautomatische Multipipette, 300 µl , Eppendorf AG, Hamburg
- ELISA–Plattenschüttler Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg
- Vortex Mixer MS2 Minishaker, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen

Das Funktionsprinzip des Testes ist eine kompetitive Bindung der monoklonalen Antikörper mit gebundenem und freiem Osteocalcin.

Zunächst wird die Mikrotiterplatte vorinkubiert. Zu diesem Zweck wird synthetisches humanes Osteocalcin zugegeben. Um nun das nicht gebundenen humane Osteocalcin nach der Vorinkubation zu entfernen folgte die erste Waschung. Anschließend werden nun die Standards, die Serumproben und der monoklonale Antikörper zugegeben. Nun wurden diese Substanzen inkubiert. Es folgte die zweite Waschung und die Zugabe eines mit Peroxidase markierten Antikörpers. Diese markierten Antikörper hefteten sich an die bereits gebundenen monoklonalen Antikörper an und die Peroxidase wandelte das zugegebene Substrat Tetramethylbenzidin in eine farbige Lösung um. Das Ende der Farbreaktion wird durch Zugabe einer Stopplösung erreicht. Die gemessene Farbintensität ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Osteocalcins. Die Standardisierung der Messergebnisse wird durch die Zugabe von humanem Osteocalcin erreicht, welches das gleiche Bindungsverhalten gegenüber dem markierten Antikörper besitzt.

### 3.7.2. Calciumbestimmung im Serum

Zur Bestimmung des Calciums im Serum kam ein Flammenphotometer (EFOX 5053, EPPENDORF, Hamburg) zum Einsatz. Die Serumproben wurde im Verhältnis von 1:5 mit bidestilliertem Reinstwasser (Reinstwasseranlage der Serie Ultra Clear, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel) verdünnt. Eine abermalige Verdünnung der vorbereiteten Proben folgte mit einer 1%igen Lithiumchloridlösung (Art.Nr.0030 358.007, Eppendorf) mit Hilfe eines Dual Diluters 1:20. Nach der Zugabe der entsprechenden Aliquote Acetylen wurden die Proben verbrannt. Die Farbintensität der entstehenden Flamme ist dabei direkt proportional zur Konzentration des Calciums in der Serumprobe.

## 3.8. Bestimmung der Parameter des Knochenstoffwechsels im Urin

### 3.8.1. Creatinin

Um eine einheitliche Parameterbestimmung zu gewährleisten mussten alle Proben aus dem Urin als Quotienten der Urin Creatinins bestimmt werden.

Die hier gewählte modifizierte Methode (nach JAFFE) um die Konzentration der jeweiligen Urinprobe anhand der Creatininkonzentration zu ermitteln stammt aus dem Jahre 1886.

Alkalische Pikrinsäure bildet mit Creatinin einen gelben Farbkomplex, dessen Dichte direkt proportional zur Creatininkonzentration in der Probe ist. Die Messung erfolgte anschließend in einem Fotometer.

### Reagenzien und Materialien

- 3 Mikrotiterplatten mit je 96 Kavitäten, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Creatinin Assay KIT Metra R, Osteomedical GmbH, Bünde, bestehend aus 3 Creatinin-Standards mit 5, 20 und 40 mmol/l Urin-Puffer-Matrix, 1 Creatinin Low Control sowie 1 Creatinin High Control, Farbreagenz: 14 ml 0,14% Pikrinsäure + 2 ml NaOH
- Multipipette, Firma Eppendorf, Hamburg
- Assay Reader Sunrise Remote, Tecan, Crailsheim

Zunächst wurde auf die erste Mikrotiterplatte 190 µl Reinstwasser und 10 µl Urin pipettiert. Indem nun zwei weitere Verdünnungen in Mikrotiterplatten folgten, wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Schließlich lag eine Verdünnung von 1:40 vor. Nun wurde die 0,14% Pikrinsäure zugegeben und 30 Minuten inkubiert. Abschließend erfolgte eine photometrische Messung bei 490 nm der Proben mit einem ELISA-Plattenleser.

### 3.8.2. Collagencrosslinks Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinoline (DPD)

Der Nachweis der Collagencrosslinks als Parameter für die Knochenresorption erfolgte nach einer modifizierten isokratischen Methode nach BLACK et al. (1988) und COLLWELL et al. (1993) mit Hilfe der High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). Die Urinproben wurden zunächst mit einer sauren Hydrolyse aufgeschlossen und dann mit Hilfe von Cellulose-Chromatographysäulen vorgereinigt. Anschließend erfolgte die Detektion der nachzuweisenden Knochenparameter Pyridinolin und Desoxypyridinolin anhand von

Eigenfluoreszenz in einer Ionenpaar-Reversed-Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Anlage.

## Reagenzien und Apparate

- Salzsäure rauchend, Rotipuran® 37%, Roth, Karlsruhe, Art.Nr. 4625.2
- Essigsäure Rotipuran® 100%, Roth, Karlsruhe, Art.Nr. 3738.2
- Heptafluorobutyricacid 99% (HFBA) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art.Nr. 16,419-4), mit Reinstwasser auf 1% verdünnt
- Acetonitril, Roth, Karlsruhe, Art.Nr. 7330.2
- Bidestilliertes Wasser
- Chromatographiesäule Chromabond Crosslinks 3 ml/300 mg® Spezialphase zur Anreicherung von Kollagen–Crosslinks, Art.Nr. 730 458, Charge 34.247, Firma Macherey–Nagel GmbH & Co. KG, Düren
- Vakuumkasten Vakuum manifold Processing Station mit 20 Steckplätzen, Agilent Technologies GmbH, Böblingen
- Vakuum-Zentrifuge, Eppendorf Concentrator 5301, Firma Eppendorf, Hamburg
- Trockenschrank Heraeus Funktion Kine, Firma Kendro, Langenselbold
- HPLC-Anlage VWR-Hitachi Firma VWR-Hitachi, Darmstadt, Geräte der Linie Elite LaChrom
- Säulenofen, Säule 150 × 4mm (bei 150 °C betrieben), Spherisorb ODS2, Latek Labortechnik-Geräte GmbH, Eppelheim
- Fluoreszenzdetektor, L 2480, VWR-Hitachi, Darmstadt
- Probengeber, Autosampler L 2200 mit Probenkühlung, VWR-Hitachi, Darmstadt
- Pumpe L-2100 und Organizer L-2130 HTA-Pumpe, VWR-Hitachi, Darmstadt
- Eluent 85:15 (Reinstwasser: Acetonitril, s.o.), mit HFBA (s.o.) von pH 1,75
- Standard PYD und DPD der Firma Quidel, San Diego, USA

## Aufschluss und Vorfraktionierung

Zunächst mussten die Proben aufgeschlossen und vorfraktioniert werden. Hierzu wurden zu 250 µl Urin 250 µl 37% Salzsäure gegeben und bei 105 Grad Celsius im Trockenschrank für 16 Stunden sauer hydrolisiert. Nach Abkühlung der Proben wurden nun 250 µl Waschlösung zugesetzt, welche sich aus einem Teil Eisessig (Essigsäure, 100%), einem Teil Reinstwasser und vier Teilen Acetonitril zusammensetzte.

Um die Proben für die Messung im HPLC entsprechend reinigen zu können, kamen nun Cellulose-Chromatographie Säulen und ein Vakuumkasten zum Einsatz. Bei jedem Waschgang konnten 20 Proben durchgespült werden, dabei konnte jede einzelne Probe

durch einen separaten Verschlussahn an den 20 Steckplätzen des Vakuumkastens mit einer individuellen Durchflussgeschwindigkeit gereinigt werden. Die mit 300 mg Cellulose gefüllten Chromatographiesäulen wurden zunächst mit 5 ml Waschlösung konditioniert. Dann folgte die Reinigung der Proben mit insgesamt 60 ml Waschlösung; um die für die HPLC- Messung störenden Chromogene, Aminosäuren und Salze so weit wie möglich aus der Probe zu entfernen.

Um nun die Knochenparameter Pyridinolin und Desoxypyridinolin zu gewinnen, wurden die Säulen nach Abschluss des Waschvorgangs mit 3 ml Reinstwasser eluiert, da dieses eine höhere Affinität zu den Collagencrosslinks aufweist als die Chromatographiesäulen. Das Eluat trocknete dann bei 60°C in einer Vakuumzentrifuge. Nach einer Zeitspanne von etwa 6 Stunden waren die Proben vollständig trocken und die Collagencrosslinks als kleiner weißer Kreis am Boden des Probengefäßes erkennbar. Pyridinolin und Desoxypyridinolin wurden nun mit 100 µl 1% HFBA aufgenommen und in kleine Flaschen für die Messung im HPLC-Gerät pipettiert.

### Messung von Pyridinolin und Desoxypyridinolin mittels HPLC

Die mobile Phase der mittlerweile aufgeschlossenen und vorfraktionierten Probe bestand zu 85 % aus Reinstwasser und zu 15 % aus Acetonitril. Um eine Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Standards zu erreichen, wurde der pH- Wert der Proben durch die Zugabe von 0,1 n NaOH bzw. einprozentiger HFBA auf 1,75 eingestellt. Die Retentionszeit lag bei 8 min. (Pyridinolin) und ca. 9 min. (Desoxypyridinolin). Die Proben wurden in einen Autosampler einsortiert und der Inhalt der HPLC-Flaschen wurde auf HPLC –Trennsäulen gegeben. Bei 8°C eluierten Pyridinolin und Desoxypyridinolin bei vergleichbarer Retentionszeit wie der Standard bei einer Extinktion von 295 nm und einer Emission von 400 nm.

### Reproduzierbarkeit und Wiederfindung der Methode

Nach WEHR (1998) lag die Gesamtproduzierbarkeit einer Urinprobe, die 15 Mal aufbereitet und an drei verschiedenen Tagen gemessen wurde, bei 4 Prozent für Pyridinolin und bei 11 Prozent für Desoxypyridinolin.

Die Wiederfindung lag nach WEHR (1998) im Mittel bei 96,5% plus minus 2,2 für Pyridinolin und 94,6% plus minus 4,1 bei Desoxypyridinolin und wurde jeweils nach Zusatz verschiedener Konzentrationen und Standards im Doppelansatz bestimmt.

## 3.9. Der Knochen als Parameter

### 3.9.1. Knochenlänge und Knochengewicht

Von den Versuchstieren wurden die Knochen des rechten Hinterbeins verwendet. Länge und Gewicht wurde von Femur, Tibia und Fibula gemessen. Um genaue Ergebnisse zu erhalten wurde eine elektronische Schublehre (Elektr. Digital Messschieber 150 × 0,01mm, Art.Nr. C229 849, Vogel, Kevelar) verwendet. Mit dieser konnte die Länge bis zwei Dezimalstellen hinter dem Komma gemessen werden. Die Knochenmesspunkte waren am Femur vom Trochanter major bis zum Condylus medialis und bei der Tibia dienten die Facies articularis proximalis tibiae und der Malleolus medialis tibiae als Messpunkte.

### 3.9.2. Trockensubstanz der Knochen

Zuerst wurden die Knochen im rohen Zustand als ursprüngliche Substanz (US) gewogen und dann in Porzellantiegeln (Schmelztiegel 79MF4,W. Haldenwanger, Technische Keramik GmbH & Co. KG, Berlin) für eine Dauer von 7 Tagen im Trockenschrank bei einer Temperatur von 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

### 3.9.3. Knochenasche

Die getrocknete rechte Tibia eines jeden Tieres wurde im Muffelofen (Thermicon® II4021, Heraeus, Hanau) verascht. Nach Abschluss der Bestimmung der Trockenmasse verblieben die Knochen in den hierfür benutzten Porzellantiegeln, so dass diese direkt in den Muffelofen gestellt werden konnten. Nach einer Dauer von drei Tagen bei einer Temperatur von 550°C waren die Knochen rein weiß. Die aus den Knochen hergestellte Knochenasche wurde dann in 3 ml 37% ige Salzsäure aufgenommen und anschließend mit Reinstwasser auf 10 ml verdünnt.

### 3.9.4. Bestimmung der Calcium- Phosphor- und Magnesiumkonzentration der Knochen

#### Calciumbestimmung

Der Calcium Gehalt der Knochen wurde mit einem Flammenphotometer (EFOX 5053, EPPENDORF, Hamburg) gemessen. Die Aschelösung der Knochen wurde auf ein Verhältnis von 1:1000 mit Reinstwasser verdünnt, in 1,5 ml Eppendorfcups pipettiert und bestimmt.

Um nun den Calciumgehalt ermitteln zu können, mussten die Ergebnisse der Flammenfotometermessung in folgende Formel eingesetzt werden. 40,08 g/mmol stellt das molare Gewicht von Calcium dar.

$$\text{Ca (mg/g)} = \frac{40,08 \text{ (g/mmol)} \times \text{Messwert (mmol/ltr)} \times \text{Verdünnung (ml)}}{1000 \times \text{Einwaage}}$$

## Phosphorbestimmung

Zur Bestimmung des Phosphorgehaltes der Knochen wurde ein Photometer (Spektralphotometer Genesys 10 UV, Thermo Spectronic, USA) eingesetzt.

50 µl der Knochenaschelösung in einer 1:100 bis 1:1000 Verdünnung (je nach Höhe des Phosphorgehaltes der Knochen einer Gruppe) wurde in 12 ml-PP-Rundbodenröhrchen (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht) mit 1 ml Trichloressig (TCA) mit Hilfe eines Vortexers vermischt. Nun folgte die Zugabe von 1 ml Ammoniummolybdat und 1 ml Ammoniumvanadat, erneute Mischung mit dem Vortexer und anschließender 10 minütiger Inkubation. Die Proben wurden in Messküvetten (Plastibrand® Einmalküvetten 2,5 ml makro PS, Art. Nr. 759005, Brand, Wertheim) umgefüllt und bei 366 nm gemessen.

Die Phosphorkonzentration in mg/g der Knochen konnte nun anhand der folgenden Formel errechnet werden:

$$\text{P (mg/g)} = \frac{10,5 \times \text{Messwert} \times \text{Verdünnung (ml)}}{0,34 \text{ (g/mol)} \times 100 \times \text{Einwaage (g)}}$$

Der Wert 10,5 stellt einen empirischen Faktor und der Wert 0,34 g/mmol die Standardkonzentration dar.

### 3.9.5. Knochendichtemessung per pQCT

Die periphere quantitative Computertomographie (pQCT) beruht auf dem Prinzip eines Fächerstrahls, der von einer Röntgenröhre und einem speziellen Blendensystem erzeugt wird und in Abhängigkeit der Struktur, auf die er trifft, verschieden stark absorbiert wird. Ein Detektorkranz empfängt die reflektierten, nicht absorbierten Anteile des erzeugten Strahls und fügt ihn einem Rechner zu. Dieser erstellt anhand der Daten ein Absorptionsprofil. Nach jeder Messung dreht sich die Apparatur um eine definierte Gradzahl weiter, um die nächsten Messungen am Knochen vorzunehmen.

Mit dieser Technik ist es möglich verschiedene Projektionen derselben Schicht und gleicher Schichtdicke zu erzeugen. Durch die mathematische Faltung der gemessenen Absorptionsprofile der verschiedenen Messwinkel können bei diesem, als gefilterte Rückprojektion bezeichneten Verfahren, nun Querschnittsbilder errechnet werden, die dem Knochen entsprechen. Die Umrechnung in Dichtewerte (mg/cm<sup>3</sup>) geschieht durch die

Kalibrierung mit Phantomen bekannter Hydroxylapatitkonzentrationen und den entsprechenden Schwächungskoeffizienten.

Die Messung der Knochendichte war eine Kooperation der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. F. Eckstein des Institutes für Anatomie und Muskuloskelettale Forschung der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität, Salzburg, Österreich, und des Anatomischen Institutes der Medizinischen Universität München (Frau M.sc. Maiko Matsuura).

## 3.10. Bestimmung der Organparameter

Den Versuchstieren wurden Uterus, Nieren, Herz, Leber, Lunge und Bauchorta entnommen. Die Organe wurden vom anhaftenden Gewebe befreit und in ihrer ursprünglichen Substanz gewogen.

Die Analyse der Uteri wurde lediglich zur Kontrolle der stattgefundenen Ovariectomie bei den Kontrolltieren der OVX-Gruppe und den vier Therapiegruppen durchgeführt. Auf der einen Seite wurde auf die Gewichtsdifferenz der Uteri, auf der anderen Seite auf das makroskopische Fehlen der Ovarien geachtet.

Danach wurden in Leber und Herz die Trockensubstanz und der Calcium- und Phosphorgehalt bestimmt.

### 3.10.1. Bestimmung der Trockensubstanz

Zunächst wurden die Organe in ihrer ursprünglichen Substanz in Aluschälchen (Neolab, Heidelberg) gewogen, und dann bis zum Erreichen der Gewichtskonstanz bei 103°C in den Trockenschrank verbracht und erneut gewogen. Nach Abzug des Leergewichts der Aluschale ergab sich das Gewicht der Trockensubstanz. Je nach Größe des zu wiegenden Organs dauerte der Trocknungsvorgang vier bis sieben Tage.

### 3.10.2. Mikrowellenaufschluss

Die Probe wird beim Mikrowellenaufschluss unter einem erhöhten atmosphärischen Druck in konzentrierter Salpetersäure gekocht, damit aufgeschlossen, und in Lösung gebracht. Diese Methode bietet den Vorteil, dass auch kleine Probemengen für die Analyse vorbereitet werden können. Zudem können flüchtige Verbindungen nicht entweichen. Alle Proben haben die gleichen Aufschlussbedingungen durch konstanten Druck, hohe Reaktionstemperaturen von 250 bis 300°C und einem chemischen Gleichgewicht. Durch den Einsatz von Quarzglasbehältern gab es keinen Verschleiss an den Behältern.

## Geräte und Materialien

- Mikrowelle MLS 1200 mega mit zugehörigem Steuergerät Terminal 320 und 50 ml Quarzglaseinsatz (EMLS © , PFA–C–35/QS–50 Einsatz), MLS GmbH, Leutkirch im Allgäu
- 10 ml Pipette, Eppendorf, Hamburg
- 1000 µl Pipette, Eppendorf, Hamburg
- Salpetersäure (HNO<sub>3</sub>), Rotipuran® 65%ig, Art.Nr. 4989.2, Roth, Karlsruhe
- Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Rotipuran® 30%ig, Art.Nr. 9681.1, Roth, Karlsruhe
- Bidestilliertes Wasser, Reinstwasseranlage der Serie Ultra Clear, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel

Nachdem die Organe im Trockenschrank Ihre Gewichtskonstanz erreicht hatten, und damit vollständig getrocknet waren, wurden sie mit Hilfe von Analysenwaagen in Quarzgläser eingewogen. Die mit den Proben bestückten Quarzglasbehälter wurden in Druckkammern aus Teflon eingesetzt. Pro Durchlauf konnten 10 Proben aufgeschlossen werden. In die Teflontiegel wurden 5 ml Reinstwasser und 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pipettiert, in den Inhalt der Quarzgläser 5 ml HNO<sub>3</sub>.

Es gibt keine Verbindung zwischen dem Teflontiegel (außen) und dem Inhalt der Quarzglasbehälter (innen).

Die Proben wurden etwa eine Stunde gekocht, wobei die Temperatur durch einen Temperatursensor im Inneren einer der Druckkammern überprüft werden konnte. Nachdem die Proben ca. 20 Minuten abgekühlt waren, konnte man die Tiegel aus dem Mikrowellenrondell entnehmen.

Die Proben wurden nach Abschluss des Mikrowellenaufschlusses in Lösung gebracht und anschließend in 12 ml-Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden bis zur 10 ml Skalierung aufgefüllt. Durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid erreicht man eine bessere Aufschlussqualität.

### 3.10.3. Calciumbestimmung aus der Aschelösung

Die Calciumbestimmung aus der Asche der Organe wurde genauso durchgeführt, wie die Calciumbestimmung aus dem Serum. Die Lösungen konnten in einer 1:10 Verdünnung verwendet und anhand der bereits aufgeführten Formel ausgewertet werden:

$$\text{Ca (mg/g)} = \frac{40,08 \text{ g/mmol} \times \text{Messwert (mmol/ltr)} \times \text{Verdünnung (ml)}}{1000 \times \text{Einwaage (g)}}$$

### 3.10.4. Phosphorbestimmung aus der Aschelösung

Auch die Phosphorbestimmung wurde nach der gleichen Methode wie beim Serum durchgeführt. Je nach Konzentration der Proben mussten Verdünnungen von 1:100 bis

1:1000 angewendet werden. Nachstehend wird die bereits bekannte Formel zur Berechnung der Phosphorgehaltes der Organe dargestellt:

$$P \text{ (mg/g)} = \frac{10,5 \times \text{Messwert} \times \text{Verdünnung (ml)}}{0,34 \text{ g/mmol} \times 100 \times \text{Einwaage (g)}}$$

## 3.11. Sonstige Parameter

### 3.11.1 Entwicklung des Körpergewichtes der Ratten

Das Wiegen der Tiere erfolge alle zwei Wochen mit Hilfe einer Waage von Sartorius (TE 6101, Sartorius AG, Göttingen). Die Ratten wurden einzeln gewogen.

### 3.11.2. Futterverbrauch

Zusammen mit dem alle zwei Wochen stattgefundenem Wiegen der Tiere wurde auch der Futterverbrauch protokolliert. Da jede Futtergabe in die Raufen der Käfige festgehalten wurde, ergab sich der Futterverbrauch aus der Differenz des gegebenen Futters und der Rückwaage des Raufeninhaltes nach zwei Wochen. Es wurden immer 2 Tiere in einem Käfig zusammengehalten. Daher konnte der durchschnittliche Futterverbrauch der beiden Tiere ermittelt werden.

### 3.11.3. Weender-Analyse des Futters

In der Weender-Analyse werden die Nährstoffe eines Futters bestimmt. Im Verlauf der durchgeführten Weender-Analyse wurden Trockensubstanz-, Asche-, Protein-, Fett-, und Fasergehalt des Futters bestimmt.

#### Bestimmung der Trockensubstanz

100 g bis 150 g der ursprünglichen Substanz wurden im Mörser zerkleinert und dann zur Trocknung in den Trockenschrank gebracht. Hier wurden die Futterproben bei 103 °C bis zum Erreichen der Gewichtskonstanz getrocknet.

## Bestimmung der Rohfaser

### Materialien und Geräte

- Foss Fibertec hot extractor 2010, Foss, Hamburg
- Fibertec cold extractor 1021, Foss, Hamburg
- Glasfiltertiegel mit eingeschmolzenem gesintertem Glasfilter, Foss, Hamburg
- Filtrationshilfsmittel: Celite 545, Art.Nr. 102693, Merck, Darmstadt
- Antischaummittel Octanol, Art.Nr. 100991, Merck, Darmstadt
- Schwefelsäure 1,25%ig, Art.Nr.109912, Merck, Darmstadt
- Kalilauge 1,25%ig, Art.Nr. 109918, Merck, Darmstadt
- Bidestilliertes Wasser und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
- Trockenschrank Heraeus Funktion Kine, Kendro, Langenselbold
- Muffelofen Controller P320 30-3000 - C, Nabertherm, Lilienthal
- Exsikkator aus Glas, bezogen von VWR International GmbH, Wien, Österreich

Die getrockneten Futterproben aus der Trockensubstanzbestimmung wurden für die Rohfaserbestimmung verwendet. Nach dem Wiegen der leeren Fritten erfolgte die Futtereinwaage von ca. 1 g (auf 0,1 mg genau). Als Filtrationshilfsmittel wurde den Proben etwa 0,2 g (auf 0,1 mg genau) Celite zugegeben.

Es folgte ein Kochvorgang im Fibertec hot extractor mit Schwefelsäure  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1,25%ig) und anschließend mit Kalilauge (KOH, 1,25%ig). Um das Aufschäumen der Proben zu verhindern, wurde beim kleinsten Anzeichen auf Schaumbildung 1 Tropfen Octanol zugegeben. Nach Beendigung der beiden Kochgänge erfolgte eine Reinigung der Glasfiltertiegel mit Reinstwasser und anschließend eine Trocknungsphase von 1 Stunde bei 103°C im Trockenschrank. Um der Kondenswasserbildung vorzubeugen und damit die Gewichtskonstanz beizubehalten, erfolgte die Abkühlung der Glasfiltertiegel über einen Zeitraum von 30 Minuten im Exsikkator. Anschließend wurden die Futterproben mit der Analysenwaage gewogen und im Muffelofen bei 520°C verascht. Durch die Differenz der Glasfiltertiegel mit der Futtereinwaage als Trockensubstanz vor der Analyse und dem Gewicht des Glasfiltertiegels nach der Veraschung im Muffelofen abzüglich der Celiteeinwaage errechnete sich die Rohfasermenge im Futter.

### Bestimmung der Rohasche

Das Futter in seiner ursprünglichen Substanz wurde in Porzellantiegel eingewogen und im Muffelofen bei 550°C über einen Zeitraum von 36 h verascht. Die entstandene Rohasche wurde gewogen und als Prozentwert der ursprünglichen Substanz berechnet.

## Bestimmung des Rohproteins

Zur Bestimmung des Rohproteins wurde das Kjeldahlverfahren eingesetzt. Bei diesem wird der Stickstoffgehalt im Futter ermittelt und daraus der Proteingehalt in Prozent mit Hilfe eines Umrechnungsfaktors ( $N \times 6,25$ ) errechnet.

## Materialien und Geräte

- Foss Kjeltac 2400, Dispenser 0-25 ml, Foss, Hamburg
- Schwefelsäure 98%ig, Art.Nr. 100748, Merck, Darmstadt
- Natronlauge 21%ig, Art.Nr. 105593, Merck, Darmstadt
- Natronlauge 32%ig, Art.Nr. 105590, Merck, Darmstadt
- Salzsäure 0,2n, Art.Nr. 113134, Merck, Darmstadt
- Borsäurelösung 1%ig, Art.Nr. 100160, Merck, Darmstadt
- Kjeltabs Cu/3,5 (3, 5 gK<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0, 4 gCuSO<sub>4</sub> × 5H<sub>2</sub>O), VWR International GmbH, Wien, Österreich

0,5 bis 1 g Futter in seiner ursprünglichen Substanz wurden in eine 250 ml Tube eingewogen und mit ein bis zwei Kjeltabs versetzt. Mit dem Dispenser wurden dann 10 ml konzentrierte Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) zugegeben. Die Überführung des in der Probe befindlichen Stickstoffes in Ammoniumsulfat wurde durch das Kochen bei 380°C im Aufschlussblock erreicht. Anschließend folgte ein Destillierungsprozess, bei dem der Stickstoff unter Zugabe von Natronlauge als NH<sub>3</sub> in eine Vorlage von Borsäure überführt wurde. Durch Titration mit Salzsäure konnte der NH<sub>4</sub>OH- Gehalt der Vorlage und damit auch die Stickstoffmenge bestimmt werden. Die nötige Umrechnung des Stickstoffes auf % Rohprotein erfolgte automatisch.

## Rohfett-Bestimmung

### Geräte

- Soxtec Avanti 2050, Foss, Hamburg
- Soxlet-Hülsen, Foss, Hamburg
- Siedesteinchen (Glasperlen), bezogen von VWR International GmbH, Wien, Österreich
- Petrolether (40-60 °C), Art.Nr. T173.3, Roth, Karlsruhe
- Trockenschrank
- Glasmörser (Ah00 Staatl. Berlin)

Von den in einem Mörser zerkleinerten Futterproben wurde mit einer Analysenwaage 1 bis 2 g mit Hilfe eines Hülsenträgers in die Filterhülsen eingewogen. Der untere Topf mit drei

Siedesteinchen wurde ebenfalls gewogen. Anschließend wurden die Probegefäße in den Fettextractor gestellt, die Extraktionshülsen mit 80 ml Petroläther befüllt und mit der Programmeinstellung Nummer 1 bei 135°C extrahiert. Es schloss sich eine Trocknung des Probenmaterials über 60 min bei 103°C im Trockenschrank und anschließender Abkühlphase im Exsikkator an. Durch die entstandene Gewichts Differenz konnte das Rohfett in Prozent bestimmt werden.

## 3.12. Statistische Auswertung

Zur Auswertung der ermittelten Daten wurde das Statistikprogramm SIGMASTAT, Version 3.0, SYSTAT SOFTWARE Inc., Richmond, Ca, USA verwendet.

Die Analysenergebnisse in der vorliegenden Arbeit wurden als arithmetischer Gruppenmittelwert  $\bar{X}$  mit Standardabweichung angegeben.

### 3.12.1. Vergleichsuntersuchungen

Um die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppe zu untersuchen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (one way ANOVA) angewandt. Mit der Dunn`s Methode wurden die Therapiegruppen zuerst einmal versus der Kontrollgruppe OVX und dann versus der Kontrollgruppe SHAM verglichen. Beim Auftreten von signifikanten Unterschieden gegenüber den Kontrollgruppen wurde für jedes Gruppenpaar  $p < 0,05$  angegeben. P entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit. Diese liegt unter 5%, wenn zwischen den beiden verglichenen Gruppen kein signifikanter Unterschied vorhanden ist. Die Aussagekraft dieses statistischen Vergleiches entspricht in seiner Aussagekraft dem Ergebnis des ungepaarten t-Testes. Liegt p über 0,05 muss insofern eine sichere Signifikanz des untersuchten Unterschiedes ausgeschlossen werden.

In einigen Fällen lag die Irrtumswahrscheinlichkeit deutlich unterhalb der 5% Marke. Hier wurde dann der Holm-Sidak-Test angewandt. Der Holm-Sidak-Test ist der zur Zeit der empfohlene Test für paarweise Vergleichsstudien, da er noch wesentlich feinere Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen darzustellen in der Lage ist, als der Bonferroni- oder der Turkey-Test. Es handelt sich um eine multifaktorielle Varianzanalyse, in der in der vorliegenden Arbeit stets versus der beiden Kontrollgruppen OVX und SHAM verglichen wurde. Lag die Irrtumswahrscheinlichkeit niedriger, als mit der Dunn`s Methode aufgefunden, wurde der Unterschied als hoch signifikant bezeichnet und entsprechend mit  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$  angegeben.

Um eine bessere Übersicht zu gewährleisten, wurden die verschiedenen Signifikanzen mit den folgenden Symbolen gekennzeichnet:

\* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) vs OVX

# ( $p < 0,05$ ), ## ( $p < 0,01$ ), ### ( $p < 0,001$ ) vs SHAM

### 3.12.2. Verlaufsuntersuchungen

Bei der Auswertung der Parametern aus den unterschiedlichen Verlaufsuntersuchungen (Osteocalcin aus dem Serum, Crosslinks aus dem Urin) wurde zunächst die Fläche unter der Kurve (AUC) jedes einzelnen Tieres berechnet und anschließend der arithmetische Gruppenmittelwert mit Standardabweichung bestimmt. Nun konnten die errechneten gesamten Flächen unter den Kurven in der gerade beschriebenen Art und Weise (Varianzanalyse nach Dunn und Holm-Sidak) ausgewertet werden. Falls eine Signifikanz oder eine hohe Signifikanz bestand, wurden die Gruppen in der oben dargestellten Art und Weise mit den Symbolen versus OVX bzw. SHAM gekennzeichnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1. Versuchstierdaten

#### Allgemeinzustand

Der Allgemeinzustand der Tiere blieb über die gesamte Versuchsdauer stabil. Lediglich ein Tier aus der Therapiegruppe, die mit Lanthancarbonat (LaCo) behandelt wurden, verstarb. Bei einer Anzahl von 70 Versuchstieren entspricht dieser Todesfall einem Anteil von 1,5%. Dieses Tier wurde für die gesamte Laufzeitdauer der Studie aus den statistischen Auswertungen ausgeschlossen, um keine krankheitsbedingten Verfälschungen der Ergebnisse zu erhalten.

#### 4.1.1. Entwicklung des Körpergewichtes

Die Bestimmung des Körpergewichtes der Versuchstiere erfolgte alle zwei Wochen.

Bereits zu Versuchsbeginn war ein Unterschied des Körpergewichtes zwischen der SHAM-Gruppe und den ovariectomierten Tieren festzustellen: Die Tiere der SHAM-Gruppe wogen im Mittel  $215,8 \text{ g} \pm 16,2$  während die OVX-Tiere eine um 7% höhere Körpermasse von im Mittel  $229,6 \text{ g} \pm 18,0$  aufwiesen.

Vier Wochen nach Versuchsbeginn unterschieden sich die Körpergewichte der ovariectomierten Tiere ( $MW 313,2 \text{ g} \pm 31,3$ ) signifikant von denen der SHAM-Gruppe ( $MW 259,2 \text{ g} \pm 17,5$ ). Sie wogen im Mittel 55 g mehr als die SHAM-Tiere, was einer um 21% höheren Körpermasse entspricht.

Die Tiere der Therapiegruppen (LaCo, LaCo+VD, REE-Citrat, REE-Citrat+VD) und die ovariectomierte Kontrollgruppe (OVX) zeigten während der gesamten Versuchsdauer ein hochsignifikant höheres Gewicht, als die Tiere aus der SHAM-Kontrollgruppe.

Die LaCo+VD und REE-Citratgruppe wiesen in der Woche 4 post interventionem ein signifikant höheres Körpergewicht als die OVX-Kontrollgruppe auf. Die durchschnittlichen Gewichte dieser beiden Therapiegruppen lagen in der Woche 4 post interventionem um 6,6% bei der LaCo+VD-Gruppe und 6,8% bei der REE-Citrat Gruppe, und in der 8. Woche des Versuches um 6,7% (LaCo+VD) und 7,1% (REE-Citrat) über dem Gewicht der OVX-Kontrollgruppe.

Tabelle 4.1: Mittleres Körpergewicht (MW±Stabw) der Therapie- und Kontrollgruppen in g in den Wochen 0, 4, 8, 14, 20, 26 post interventionem

KM in g	Woche 0 MW±SD	Woche 4 MW±SD	Woche 8 MW±SD
SHAM	215,8±16,2 <sup>***</sup>	259,2±17,5 <sup>***</sup>	273,8±19,0 <sup>***</sup>
OVX	229,6±18,0 <sup>#</sup>	313,2±31,3 <sup>###</sup>	331,9±34,2 <sup>###</sup>
LaCo	240,5±11,7 <sup>#</sup>	326,6±18,1 <sup>###</sup>	346,3±21 <sup>###</sup>
LaCo+ VD	241,2±10,6 <sup>#</sup>	333,9±22,6 <sup>###</sup>	354,2±24,8 <sup>###</sup>
REE-Citrat	241,2±8,1 <sup>#</sup>	334,6±13,1 <sup>###</sup>	355,3±17,6 <sup>###</sup>
REE-Citrat+ VD	241,8±7,6 <sup>#</sup>	329,5±18,3 <sup>###</sup>	355,2±28,2 <sup>###</sup>
KM in g	Woche 14 MW±SD	Woche 20 MW±SD	Woche 26 MW±SD
SHAM	284,1±20,5 <sup>***</sup>	299,6±28,0 <sup>***</sup>	306,8±24,8 <sup>***</sup>
OVX	341,7±37,8 <sup>###</sup>	357,8±40,3 <sup>###</sup>	372,9±42,6 <sup>###</sup>
LaCo	359,3±24,6 <sup>###</sup>	377,2±29 <sup>###</sup>	381,2±31 <sup>###</sup>
LaCo+ VD	363,6±30,8 <sup>###</sup>	379±32 <sup>###</sup>	388,4±34,4 <sup>###</sup>
REE-Citrat	367,2±22,9 <sup>###</sup>	382,9±22,5 <sup>###</sup>	389,9±25,8 <sup>###</sup>
REE-Citrat+ VD	366,5±31,9 <sup>###</sup>	378,6±39,6 <sup>###</sup>	396,3±44,2 <sup>###</sup>

\* (p &lt;0,05), \*\* (p&lt;0,01), \*\*\* (p&lt;0,001) vs OVX

# (p &lt;0,05), ## (p&lt;0,01), ### (p&lt;0,001) vs SHAM

Die Tabelle 4.2 zeigt die Körpergewichte der Therapie- und Kontrollgruppen als Fläche unter der Kurve. Dabei zeigt OVX ein hochsignifikant höheres Körpergewicht als SHAM. Auch alle Tiere aus den Therapiegruppen wiesen ein hochsignifikant höheres Gewicht auf als SHAM. Gegenüber OVX ist das Körpergewicht von REE-Citrat signifikant erhöht.

Tabelle 4.2: Statistische Auswertung der Flächen unter der Kurve (AUC) der Körpergewichte (MW±ST) in den Therapie- und Kontrollgruppen im Verlauf

	AUC Körpergewichte (MW±SD)
SHAM	1074,8±75,8***
OVX	1280,5±117,5###
LaCO	1340,9±78,2###
LaCo+VD	1356,5±78,6###
REE-Citrat	1369,2±64,3####
REE-Citrat +VD	1335,7±87,2###

\* (p <0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001) vs OVX

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

#### 4.1.2. Der Futterverbrauch

Der Futterverbrauch wurde alle zwei Wochen parallel zum Wiegen der Tiere ermittelt und bezieht sich auf die Aufnahme in g pro Tier und Tag. Zu Beginn der Studie ergab sich ein hochsignifikant höherer Futterverbrauch bei allen Gruppen im Vergleich zur SHAM-Gruppe (11,7 g± 0,9). Zusätzlich wies REE-Citrat+VD (15,2 g± 0,9) einen hochsignifikanten, LaCo+VD (14,8 g± 0,9) und REE-Citrat (14,4 g± 0,9) einen signifikant höheren Futterverbrauch auf, als OVX (13,4 g± 0,8).

Der Futterverbrauch in der vierten Woche war ebenfalls bei allen Therapiegruppen hochsignifikant gegenüber SHAM (21,4 g± 1,9) erhöht. Auch OVX (24,7 g±3,3) zeigte eine signifikante Erhöhung des Futterverbrauches gegenüber SHAM.

Im weiteren Verlauf der Studie fiel der Futterverbrauch der Therapiegruppen und der Kontrollgruppe OVX ab, während der Futterverbrauch von SHAM nur geringe Schwankungen aufwies. In der achten und zehnten Woche nach der ersten Wiegung waren keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den Therapiegruppen und den Kontrollgruppen SHAM (21,3 g± 4,4; 18,4 g± 3,5) und OVX (19,9 g± 1,3; 19,3 g± 1,5) vorhanden.

24 Wochen nach der ersten Futterwiegung war der Futterverbrauch aller Therapiegruppen hochsignifikant gegenüber SHAM (17,8 g± 0,4), und der Gruppen LaCo, LaCo+VD und REE-

Citrat+VD auch gegenüber OVX (17,4 g± 0,6) verringert. Die REE-Citrat-Gruppe zeigt eine signifikante Verringerung des Futtermittelsverbrauches gegenüber OVX.

Tabelle 4.3: Durchschnittlicher Tagesfuttermittelsverbrauch in g der Therapie- und Kontrollgruppen in den Wochen 0, 4, 8, 14, 20, 26 post interventionem

<b>Futtermittelsverbrauch in g</b>	<b>Woche 0 MW±SD</b>	<b>Woche 4 MW±SD</b>	<b>Woche 8 MW±SD</b>
SHAM	11,7±0,9 <sup>***</sup>	21,4±1,9 <sup>*</sup>	21,3±4,4
OVX	13,4±0,8 <sup>###</sup>	24,7±1,3 <sup>#</sup>	19,9±1,3
LaCo	13,5±1,4 <sup>###</sup>	25,2±4,0 <sup>###</sup>	20,0±1,4
LaCo+ VD	14,8±0,9 <sup>***###</sup>	26,5±1,9 <sup>###</sup>	21,5±1,0
REE-Citrat	14,4±0,9 <sup>*</sup>	25, ±2,4 <sup>###</sup>	20,5±0,9
REE-Citrat+VD	15,2±1,0 <sup>***###</sup>	25,9±2,6 <sup>###</sup>	20,8±1,2
<b>Futtermittelsverbrauch in g</b>	<b>Woche 14 MW±SD</b>	<b>Woche 20 MW±SD</b>	<b>Woche 24 MW±SD</b>
SHAM	17,0±2,7	17,6±0,5	17,8±0,4
OVX	18,6±1,1	17,0±1,5	17,4±1,6
LaCo	18,8±4,4	15,4±0,7	17,2±1,5 <sup>####</sup>
LaCo+ VD	20,0±1,3	17,2±0,4	17,1±0,8 <sup>####</sup>
REE-Citrat	16,6±1,1 <sup>*</sup>	15,5±1,0	16,6±1,7 <sup>###</sup>
REE-Citrat+ VD	17,0±0,9	16,3±1,8	16,6±3,7 <sup>####</sup>

\* (p <0,05), \*\* (p <0,01), \*\*\* (p <0,001) vs OVX

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

## 4.2.Laborchemische Parameter

### 4.2.1.Parameter des Knochenstoffwechsels

#### Osteocalcin

Osteocalcin als Marker für die Knochenformation wurde zu Versuchsbeginn und in den Wochen 4, 8, 12, 16, und 20 post interventionem gemessen. Die Tabelle 4.4 zeigt die Osteocalcinwerte in ng/ ml.

Beim Vergleich der Kontrollgruppen SHAM und OVX fiel auf, dass die Osteocalcinkonzentration der OVX-Gruppe deutlich mit etwa 60% über der Osteocalcinkonzentration der SHAM-Gruppe lag. Die Osteocalcinwerte der OVX-Gruppe fielen dann bis zur 16. Woche post interventionem nahezu linear auf etwa 9% des Ausgangswertes (417,3 ng/ ml zu 38,1 ng/ ml in Woche 16) ab. Diesem Abfall der Osteocalcinwerte folgte ein geringer Anstieg um etwa 100 ng/ml, so dass der Osteocalcingehalt in Woche 20 etwa ein Drittel des Ausgangswerts betrug.

Auch bei der SHAM-Kontrollgruppe konnte ein ähnlich kontinuierlicher Abfall des Osteocalcins bis Woche 16 auf 34,8% des Ausgangswerts beobachtet werden; aber auch in dieser Kontrollgruppe stieg der Osteocalcinwert bis Woche 20 wieder gering an und betrug zuletzt etwa die Hälfte des Ausgangswertes.

Die LaCo-Therapiegruppe wies bis zur 8. Woche ein starkes Absinken der Osteocalcinwerte bis auf 41,8% in der 8. und 25% in der 20. Woche post interventionem auf.

Die REE-Citrat-Therapiegruppe wies den höchsten Osteocalcinwert aller Tiergruppen in Woche 0 post interventionem auf. Dieser fiel kontinuierlich bis auf 18,2% des Ausgangswertes in Woche 20.

Die REE-Citrat+VD-Gruppe zeigte einen ähnlichen Verlauf mit einem Abfall auf 23% des Ausgangswertes in Woche 20, wobei sich zwischen Woche 12 und 16 ein geringgradiger Anstieg der Osteocalcinkonzentration beobachten lies.

Tabelle 4.4: Mittlerer Osteocalcingehalt (MW ± SD) des Serums in ng/ml der Therapie- und Kontrollgruppen im Versuchszeitraum 0, 4, 8, 12, 16 und 20 post interventionem

	Woche 0 MW ± SD	Woche 4 MW±SD	Woche 8 MW±SD	Woche 12 MW±SD	Woche 16 MW±SD	Woche 20 MW±SD
SHAM	271,0±79,6	169,4±75,8	180,0±58,3	139,4±41,5	94,3±32,1	130,1±36,7
OVX	417,3±89,9	257,0±80,5	172,9±67,3	106,9±48,3	38,1±33,4	139,1±42,2
LaCO	457,0±104,7	349,8±72,7	191,7±51,2	161,8±51,4	165,4±38,8	118,5±45,4
LaCo+VD	453,3±132,6	383,5±97,8	215,9±61,3	224,8±54,2	139,4±42,2	149,6±44,6
REE-Citrat	549,1±152,8	370,9±117,1	168,2±64,6	159,5±62,0	118,2±48,7	100,0±49,3
REE-Citrat +VD	420,2±181,6	281,7±130,3	174,8±67,3	135,2±63,5	149,6±49,9	99,3±46,1

Tabelle 4.5: Statistische Auswertung der Flächen unter der Kurve (AUC) der Osteocalcinkonzentration im Serum (MW±ST) in den Therapie- und Kontrollgruppen im Verlauf

	AUC Osteocalcin MW±SD
SHAM	643,3,3±147,4
OVX	653,2,6±219,1
LaCO	902,2±218,7***###
LaCo+VD	1057,6±310,5***###
REE-Citrat	1016,3±300,5***###
REE-Citrat +VD	876,7±166,5***###

\* (p <0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001) vs OVX

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

Bei der Auswertung der Fläche unter der Kurve für den Knochenformationsmarker Osteocalcin gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen SHAM und OVX. Die Osteocalcinwerte aller Therapiegruppen waren hochsignifikant gegenüber OVX und SHAM erhöht.

## Collagencrosslinks: PYD/Crea und DPD/Crea

Die Bestimmung der Konzentrationen der beiden Knochenresorptionsmarker erfolgte aus dem Urin. Die Konzentration der Collagencrosslinks wurde aufgrund des unterschiedlich konzentrierten Urins auf Creatinin normiert.

Die Tabellen 4.6 und 4.7 geben die mittlere Konzentration der Pyridinolin- und der Desoxypyridinolinausscheidung (MW $\pm$ SD) zu den jeweiligen Probeentnahmezeitpunkten in den Wochen 0, 4, 8, 12, 16 und 20 wieder.

Um eine Vergleichbarkeit der Ausscheidung von PYD und DPD zu ermöglichen, wurde von jedem Tier zunächst die Fläche unter der Kurve (AUC) und daraufhin der Mittelwert der AUC der Tiere einer Gruppe ermittelt.

Tabelle 4.6: Mittlere Konzentration (MW $\pm$ ST) der Pyridinolin-Ausscheidung im Urin (nmol/mmol Creatinin) in den Therapie- und Kontrollgruppen: Woche 0, 4, 8, 12, 16 und 20 post interventionem.

	Woche 0 MW $\pm$ SD	Woche 4 MW $\pm$ SD	Woche 8 MW $\pm$ SD	Woche 12 MW $\pm$ SD	Woche 16 MW $\pm$ SD	Woche 20 MW $\pm$ SD
SHAM	24,9 $\pm$ 6,4	29,3 $\pm$ 12,6	21,7 $\pm$ 14,8	18,2 $\pm$ 11,9	12,5 $\pm$ 4,6	30,1 $\pm$ 10,6
OVX	41,4 $\pm$ 0,4	42,0 $\pm$ 12,9	31,5 $\pm$ 13,3	23,0 $\pm$ 10,4	39,9 $\pm$ 0,1	27,4 $\pm$ 10,0
LaCO	61,9 $\pm$ 6,1	49,0 $\pm$ 22,9	44,2 $\pm$ 3,1	24,9 $\pm$ 11,4	24,9 $\pm$ 3	24,0 $\pm$ 15,9
LaCo+VD	37,2 $\pm$ 5,4	35,7 $\pm$ 13,4	22,5 $\pm$ 8,7	21,7 $\pm$ 12,1	15,2 $\pm$ 9	20,0 $\pm$ 67,0
REE-Citrat	41,3 $\pm$ 8,6	47,5 $\pm$ 13,4	27,0 $\pm$ 2,8	22,0 $\pm$ 5,9	31,4 $\pm$ 7	15,0 $\pm$ 86,3
REE-Citrat +VD	40,5 $\pm$ 1,7	26,0 $\pm$ 98,6	21,2 $\pm$ 3,1	18,0 $\pm$ 6,9	25,2 $\pm$ 4	17,0 $\pm$ 53,8

Die Therapiegruppen LaCo+VD, REE-Citrat und REE-Citrat+VD sowie die Kontrollgruppe SHAM wiesen signifikant niedrigere Ausscheidungen an Pyridinolin auf, als die OVX-Kontrollgruppe.

LaCo zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu OVX. Dagegen wiesen LaCo und die OVX-Kontrollgruppe signifikant erhöhte Konzentrationen an Pyridinolin im Vergleich zu SHAM auf. Bei den drei Therapiegruppen LaCo+VD, REE-Citrat und REE-Citrat+VD waren keine signifikanten Unterschiede zu SHAM festzustellen.

Tabelle 4.7: Mittlere Konzentration (MW±ST) der Desoxy pyridinolinausscheidung im Urin (nmol/mmol Creatinin) in den Therapie- und Kontrollgruppen: Woche 0, 4, 8, 12, 16, und 20 post interventionem.

	Woche 0 MW±SD	Woche 4 MW±SD	Woche 8 MW±SD	Woche 12 MW±SD	Woche 16 MW±SD	Woche 20 MW±SD
SHAM	8,2± 3,7	7,9± 4,4	6,8±3,4	2,5±1,6	5,2 ±1,9	5,7±2,3
OVX	22,2± 7,7	21,7± 8,3	14,6±6,8	17,1±4,9	19,9±4,8	14,8±5,2
LaCO	29,6±19,0	27,5±20,0	25,9±18,5	13,5±14,2	12,7±10,7	11,7±7,9
LaCo+VD	16,0±15,0	22,0±17,0	12,2±7,0	12,1±13,6	7,6±8,7	9,6±8,6
REE-Citrat	26,0±14,0	19,2±9,5	10,0±4,0	10,7±7,5	12,9±7,3	6,5±3,1
REE-Citrat +VD	19,1±9,7	13,5±7,2	12,6±13,5	7,2±3,9	10,5±8,2	6,2±1,9

Tabelle 4.8: Statistische Auswertung der Flächen unter der Kurve (AUC) der Konzentration von Pyridinolin im Urin (MW±ST) mit Bezug auf die Creatininausscheidung der Therapie- und Kontrollgruppen im Verlauf

	AUC PYD MW±SD
SHAM	124,6±25,9*
OVX	192,4±14,7 <sup>#</sup>
LaCO	187,3±5,6 <sup>#</sup>
LaCo+VD	140,5±26,5*
REE-Citrat	160,3±31,3*
REE-Citrat +VD	131,7±22,1*

\* (p <0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001) vs OVX

<sup>#</sup> (p <0,05), <sup>##</sup> (p<0,01), <sup>###</sup> (p<0,001) vs SHAM

Bei den Konzentrationen von DPD (Tabelle 4.9) bestand zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe OVX kein signifikanter Unterschied. Gegenüber SHAM wies die OVX-Kontrollgruppe und die Gruppen LaCo, LaCo+VD und REE-Citrat eine signifikant erhöhte Konzentration an DPD im Urin auf. Zwischen REE-Citrat+VD und SHAM gab es keinen signifikanten Unterschied in der DPD-Konzentration im Urin.

Tabelle 4.9: Statistische Auswertung der Flächen unter der Kurve (AUC) der Konzentration von Desoxypyridinolin im Urin (MW±ST) mit Bezug auf die Creatininausscheidung der Veruchs- und Kontrollgruppen im Verlauf

	AUC DPD MW±SD
SHAM	30,37±10,0*
OVX	79,73±10,61 <sup>#</sup>
LaCO	100,31±58,21 <sup>#</sup>
LaCo+VD	68,92±33,0 <sup>#</sup>
REE-Citrat	66,00±28,4 <sup>#</sup>
REE-Citrat +VD	56,73±22,7

\* (p <0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001) vs OVX

<sup>#</sup> (p <0,05), <sup>##</sup> (p<0,01), <sup>###</sup> (p<0,001) vs SHAM

## 4.2.2. Calciumstoffwechsel

### Serumcalciumgehalt

Der Calciumgehalt des Serums wurde zu den Zeitpunkten 0, 10, und 18 Wochen post interventionem gemessen.

Tabelle 4.10: Serumcalciumgehalt in mmol/l (MW±ST) der Therapie- und Kontrollgruppen während des Zeitraumes: Woche 0, 10, 18 Wochen post interventionem

	Woche0 MW±SD	Woche10 MW±SD	Woche18 MW±SD
SHAM	2,96±0,18	3,03±0,12	2,75±0,14
OVX	2,95±0,16	3,02±0,15	2,78±0,19
LaCO	3,06±0,33	3,4±0,41	3,11±0,38
LaCo+VD	3,15±0,44	3,30±0,84	3,12±0,33
REE-Citrat	3,32±0,54	2,86±0,49	2,97±0,23
REE-Citrat +VD	3,00±0,56	3,04±0,33	2,90±0,24

Tabelle 4.11: Statistische Auswertung der Fläche unter der Kurve (AUC) des Calciumgehaltes im Serum ( $MW \pm ST$ ) in den Therapie- und Kontrollgruppen im Verlauf

	AUC DPD $MW \pm SD$
SHAM	11,8 $\pm$ 0,2
OVX	11,8 $\pm$ 0,4
LaCO	10,7 $\pm$ 2,7
LaCo+VD	8,9 $\pm$ 4,7
REE-Cit	10,9 $\pm$ 2,5
REE-Citrat +VD	10,93 $\pm$ 3,0

\* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) vs OVX

# ( $p < 0,05$ ), ## ( $p < 0,01$ ), ### ( $p < 0,001$ ) vs SHAM

Es zeigten sich keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Therapie- und den Kontrollgruppen.

## 4.3. Knochenparameter

### 4.3.1. Knochenlänge

Die Länge von Femur und Tibia der Tiere wurden zunächst in ihrer absoluten Länge miteinander verglichen. Die Femurknochen wiesen eine durchschnittliche Länge von 36,8 mm bei einer Standardabweichung von 0,44 mm auf, während die Länge der Tibiae bei den Therapiegruppen im Durchschnitt bei 40,6 mm mit einer Streuung von 0,56 mm lag. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den absoluten Knochenlängen der Therapiegruppen untereinander. Anders gestaltete sich der Vergleich der absoluten Knochenlängen zwischen den Therapie- und den Kontrollgruppen. Zwar konnten bei der absoluten Länge der Femurknochen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, aber sowohl die LaCo+VD- Gruppe, als auch die REE-Citrat und die REE-Citrat+VD- Gruppen hatten signifikant ( $p < 0,05$ ) längere Tibiae, als es bei den Tieren aus der SHAM-Gruppe der Fall war. Die Knochenlängen der Tibiae differierten zwischen der SHAM-Gruppe und der LaCo+VD Gruppe um 4,9%, beziehungsweise um 4,6% bei der REE-Citrat-Gruppe und 4,2% bei der REE-Citrat+VD Gruppe.

Tabelle 4.12: Absolute Länge des rechten Femurs und der rechten Tibia in mm mit (MW±ST) in den Kontroll- und Therapiegruppen

Länge <sub>abs.</sub> (mm)	Femur MW±SD	Tibia MW±SD
SHAM	36,1±1,0	39,0±1,6
OVX	35,8±1,1	40,4±1,5
LaCO	37,4±2,1	39,8±1,7
LaCo+VD	36,8±0,6	41,0±0,6 <sup>#</sup>
REE-Citrat	36,9±0,6	40,9±0,8 <sup>#</sup>
REE-Citrat +VD	36,3±0,8	40,7±0,6 <sup>#</sup>

\* (p <0,05), \*\* (p <0,01), \*\*\* (p <0,001) vs OVX

<sup>#</sup> (p <0,05), <sup>##</sup> (p <0,01), <sup>###</sup> (p <0,001) vs SHAM

Um nun Körpergewicht und Körperlänge in Relation zu setzen, wurden die Knochenlängen ins Verhältnis zum Körpergewicht gesetzt. Bei der relativen Knochenlänge unterschieden sich alle Therapiegruppen, und auch die OVX-Kontrollgruppe hoch signifikant durch eine niedrigere relative Knochenlänge zu SHAM. Die durchschnittlichen relativen Knochenlängen waren beim Femur um 18,4 % und bei der Tibia um 16,8% niedriger als bei der SHAM-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied zwischen der OVX-Gruppe und den Therapiegruppen bestand nicht.

Tabelle 4.13: Relative Knochenlänge des rechten Femurs und der rechten Tibia in mm bezogen auf 100 g Körpergewicht mit (MW±ST) in den Kontroll- und Therapiegruppen

Länge <sub>rel.</sub> (mm/100 g KM)	Femur MW±SD	Tibia MW±SD
SHAM	11,1±1,1 <sup>***</sup>	12,6±1,3 <sup>***</sup>
OVX	9,7±1,1 <sup>###</sup>	11,0±1,4 <sup>###</sup>
LaCO	9,9±1,1 <sup>###</sup>	10,54±0,9 <sup>###</sup>
LaCo+VD	9,5±0,8 <sup>###</sup>	10,6±0,9 <sup>###</sup>
REE-Citrat	9,5±0,6 <sup>###</sup>	10,5±0,9 <sup>###</sup>
REE-Citrat +VD	9,3±1,0 <sup>###</sup>	10,4±1,2 <sup>###</sup>

\* (p <0,05), \*\* (p <0,01), \*\*\* (p <0,001) vs OVX

<sup>#</sup> (p <0,05), <sup>##</sup> (p <0,01), <sup>###</sup> (p <0,001) vs SHAM

### 4.3.2. Knochengewicht

Das absolute Knochengewicht des Femurs der Therapiegruppen LaCo+VD, REE-Citrat und REE-Citrat+VD wies ein signifikant höheres Gewicht auf, als die Femurknochen der OVX-Kontrollgruppe. Desweiteren wiesen die Femurknochen der Gruppen LaCo+VD und REE-Citrat ein signifikant ( $p < 0,05$ ) höheres Gewicht auf, als die Knochen der Tiere aus der SHAM-Gruppe.

Die LaCo+VD-Gruppe hatte ein absolutes Femurknochengewicht, das um 15,5% über dem der SHAM-Gruppe lag. REE-Citrat und REE-Citrat+VD wiesen Femurknochen auf, die 14,6%, beziehungsweise 13,3 % schwerer waren, als die Knochen der SHAM-Gruppe.

Die Tibiae der Gruppen REE-Citrat und REE-Citrat+VD wiesen ein signifikant höheres Gewicht auf, als die Tibiae der OVX-Gruppe.

Tabelle 4.14: Die absolute Gewichtsmasse des rechten Femurs und der rechten Tibia in mg (MW±ST) in den Kontroll- und Therapiegruppen

Masse <sub>abs.</sub> (mg)	Femur MW±SD	Tibia MW±SD
SHAM	829,4±78,1	699,1±79,0
OVX	718,3±106,4	668,6±60,0
LaCO	821,4±78,6	727,1±71,1
LaCo+VD	957,8±50,4*#	751,1±79,5
REE-Citrat	950,4±58,8*#	761,1±52,0*
REE-Citrat+VD	939,9±50,6*	760,0±65,7*

\* ( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) vs OVX

# ( $p < 0,05$ ), ## ( $p < 0,01$ ), ### ( $p < 0,001$ ) vs SHAM

Beim Bezug der Knochengewichte auf 100 g KG der Therapie- und Kontrollgruppen wies OVX eine hochsignifikant verringerte Knochenmasse im Vergleich zu SHAM auf. Zwischen der Therapiegruppe LaCo und der OVX-Gruppe gab es keine signifikanten Unterschiede, während LaCo im Vergleich mit der SHAM-Gruppe ein hochsignifikant niedrigeres relatives Femurknochengewicht aufwies.

Anders gestaltet sich der Zusammenhang bei den Gruppen LaCo+VD und REE-Citrat; beide Gruppen wiesen ein hoch signifikant höheres Femurknochengewicht als die OVX-Gruppe auf. Die REE-Citrat+VD-Therapiegruppe hatte ein signifikant höheres Knochengewicht als OVX.

Das relative Gewicht der Tibiae aller Therapiegruppen und der Kontrollgruppe OVX war hoch signifikant niedriger als die Tibiae der SHAM-Kontrollgruppe.

Tabelle 4.15: Relative Knochengewichte des rechten Femurs und der rechten Tibia in mg bezogen auf 100 g KG mit (MW±ST) in den Kontroll- und Therapiegruppen

Masse <sub>rel.</sub> (mg)	Femur MW±SD	Tibia MW±SD
SHAM	267,6±32,0 <sup>***</sup>	225,7±30,5 <sup>***</sup>
OVX	195,4±38,1 <sup>###</sup>	181,4±25,5 <sup>###</sup>
LaCO	217,3±74,7 <sup>###</sup>	192,1±26,0 <sup>###</sup>
LaCo+VD	247,8±19,9 <sup>***</sup>	194,8±22,5 <sup>###</sup>
REE-Citrat	244,3±16,1 <sup>***</sup>	195,7±15,3 <sup>###</sup>
REE-Citrat+VD	239,2±23,6 <sup>*</sup>	193,6±25,6 <sup>###</sup>

\* (p <0,05), \*\* (p <0,01), \*\*\* (p <0,001) vs OVX

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

### 4.3.3. Knochenasche

Zur Ermittlung des Knochenaschegehaltes wurde die rechte Tibia der Tiere untersucht.

Der Knochenaschegehalt wurde auf die ursprüngliche Substanz des Knochens bezogen.

Beim Bezug auf die US gab es keinerlei signifikante Unterschiede.

Tabelle 4.16: Knochenaschegehalt der Knochen in % von der US der rechten Tibia (MW±ST) in den Kontroll- und Therapiegruppen

	%Asche US MW±SD
SHAM	46,2±2,9
OVX	44,9±2,1
LaCO	45,3±2,7
LaCo+VD	44,8±2,5
REE-Citrat	43,6±1,7
REE-Citrat +VD	44,2±2,0

\* (p <0,05), \*\* (p <0,01), \*\*\* (p <0,001) vs OVX

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

### Knochencalciumgehalt

Bei der Messung des Knochencalciumgehaltes unterschieden sich die beiden Kontrollgruppen SHAM und OVX signifikant (p <0,05) voneinander. Der Knochencalciumgehalt der OVX-Gruppe war 16% geringer, als der Gehalt bei der SHAM-Gruppe.

Auch alle Versuchsgruppen (LaCo, LaCo+VD, REE-Citrat, REE-Citrat+VD) unterschieden sich durch signifikant erhöhte Konzentrationen von Calcium in der Knochenasche von der OVX-Kontrollgruppe.

Tabelle 4.17: Calciumgehalt der Knochen (mg/g Asche) der rechten Tibia der Tiere (MW±ST) in den Kontroll- und Therapiegruppen.

Ca (mg/g)	Tibia MW±SD
SHAM	430,7±28,8*
OVX	361,2±41,1 <sup>#</sup>
LaCO	432,5±64,4*
LaCo+VD	430,6±38,9*
REE-Citrat	433,89±12,3*
REE-Citrat+VD	433,56±10,6*

\* (p <0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001) vs OVX

<sup>#</sup> (p <0,05), <sup>##</sup> (p<0,01), <sup>###</sup> (p<0,001) vs SHAM

## Knochenphosphorgehalt

Beim Gehalt des Knochens an Phosphor gab es keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 4.18: Phosphorgehalt der Knochen (mg/g Asche) der rechten Tibia der Tiere (MW±ST) in den Kontroll- und Therapiegruppen.

P(mg/g)	Tibia MW±ST
SHAM	164,48±10,5
OVX	173,34±7,5
LaCO	171,01±4,8
LaCo+VD	163,98±15,3
REE-Citrat	171,59±5,1
REE-Citrat +VD	167,23±12,0

\* (p <0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001) vs OVX

<sup>#</sup> (p <0,05), <sup>##</sup> (p<0,01), <sup>###</sup> (p<0,001) vs SHAM

## Knochenmagnesiumgehalt

Beim Gehalt des Knochens an Magnesium gab es keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 4.19: Magnesiumgehalt der Knochen (mg/g Asche) der rechten Tibia der Tiere (MW±ST) in den Kontroll- und Therapiegruppen.

Mg(mg/g)	Tibia MW±SD
SHAM	6,75±0,3
OVX	6,75±0,2
LaCO	6,71±0,1
LaCo+VD	6,56±0,2
REE-Citrat	6,68±0,2
REE-Citrat +VD	6,73±0,3

\* (p <0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001) vs OVX

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

### 4.3.4. Knochendichtemessung durch das pQCT-Verfahren

Die Knochendichte BMD (Bone Mineral Density) wurde im Rahmen einer interdisziplinären Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. F. Eckstein des Instituts für Anatomie und Muskuloskelettale Forschung der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität, Salzburg, Österreich, und des Anatomischen Instituts der Medizinischen Universität München von Frau (M.sc.) Maiko Matsuura mittels pQCT gemessen. Die Knochendichte ist in g/cm<sup>3</sup> angegeben.

Für die Dichtemessung wurde die linke Tibia jedes Tieres verwendet, wobei als Bereich der Messung ein für den Komplex der Osteoporose relevanter Bereich der Tibia ausgewählt wurde, der auch als "Region of Interest" (ROI) bezeichnet wird. Diese ROI lag bei den Tibiae der Ratten in einer Ebene von 12,5% der Gesamttibiallänge distal des Tibiplateaus.

### Gesamtdichte

Bei der Messung der Gesamtdichte zeigte OVX eine signifikant niedrigere Knochendichte als SHAM.

REE-Citrat, REE-Citrat+VD wiesen ebenfalls signifikant niedrigere Werte der Gesamtdichte des Knochens auf als SHAM. Die Gruppen LaCo und LaCo+VD wiesen keine signifikanten Unterschiede zu SHAM auf.

Gegenüber OVX zeigte keine der Therapiegruppen signifikante Unterschiede.

Tabelle 4.20: Gesamtdichte der ROI der rechten Tibia bei 12,5% distal des Tibiaplateaus ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) der Tiere (MW $\pm$ ST )der Therapie- und Kontrollgruppen

( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )	Gesamtdichte MW $\pm$ SD
SHAM	865,0 $\pm$ 42,7*
OVX	685,8 $\pm$ 32,8#
LaCO	757,0 $\pm$ 99,7
LaCo+VD	729,5 $\pm$ 48,0
REE-Citrat	693,3 $\pm$ 46,9#
REE-Citrat+VD	650,5 $\pm$ 58,9#

\* (p <0,05), \*\* (p <0,01), \*\*\* (p <0,001) vs OVX

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

### Trabekuläre Dichte

SHAM wies eine hoch signifikant höhere trabekuläre Dichte auf als OVX und alle Therapiegruppen.

Die Therapiegruppen REE-Citrat und REE-Citrat+VD unterschieden sich durch eine hoch signifikant höhere Trabekuläre Dichte im Vergleich zur OVX-Gruppe. LaCo+VD zeigte eine signifikant höhere Trabekuläre Dichte als OVX. LaCo wies keinerlei signifikante Unterschiede zu OVX auf.

Tabelle 4.21: Trabekuläre Dichte der ROI der rechten Tibia bei 12,5% distal des Tibiaplateaus ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) der Tiere (MW $\pm$ ST ) der Therapie- und Kontrollgruppen

( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )	Trabekuläre Dichte MW $\pm$ SD
SHAM	469,5 $\pm$ 37,0***
OVX	222,8 $\pm$ 58,5###
LaCO	227,4 $\pm$ 68,1###
LaCo+VD	337,4 $\pm$ 82,9####
REE-Citrat	310,4 $\pm$ 82,1#####
REE-Citrat+VD	338,8 $\pm$ 54,6#####

\* (p <0,05), \*\* (p <0,01), \*\*\* (p <0,001) vs OVX

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

## Kortikale Dichte

Zwischen SHAM und OVX gab es keine signifikanten Unterschiede. REE-Citrat +VD wies signifikant niedrigere Werte der Kortikalis auf als OVX.

Im Vergleich zu SHAM hatte die Therapiegruppe LaCo eine signifikant höhere und REE-Citrat+VD eine signifikant niedrigere Kortikale Dichte. Zwischen SHAM und den Therapiegruppen LaCo+VD und REE-Citrat, sowie der Kontrollgruppe OVX bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 4.22: Kortikale Dichte der ROI der rechten Tibia bei 12,5% distal des Tibiaplateaus ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) der Tiere (MW $\pm$ ST ) der Therapie- und Kontrollgruppen

( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )	Kortikale Dichte MW $\pm$ SD
SHAM	1195,6 $\pm$ 74,0
OVX	1255,2 $\pm$ 47,8
LaCO	1279,6 $\pm$ 81,6 <sup>#</sup>
LaCo+VD	1224,8 $\pm$ 81,7
REE-Citrat	1191,8 $\pm$ 103,4
REE-Citrat+VD	1130,6 $\pm$ 104,2 <sup>**#</sup>

\* (p <0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001) vs OVX

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

## 4.4. Organparameter

### 4.4.1. Organgewichte

#### Gewichte der Uteri

Den Versuchstieren wurden am Ende der Studie Herz, Lunge, Leber und Niere, und die Uteri entnommen und als ursprüngliche Substanz gewogen.

Alle Versuchstiere mit Ausnahme der SHAM-Gruppe waren ovariectomiert.

Die durchschnittlichen Massen der Uteri der Tiere aus den Versuchsgruppen sind in Tabelle 4.23. aufgelistet. Im Mittel wiesen die ovariectomierten Tiere eine Uterusmasse von 146 mg gegenüber der mittleren Uterusmasse der SHAM-Gruppe von 1003 mg auf.

Alle Therapiegruppen und die OVX-Kontrollgruppe zeigten ein signifikant niedrigeres Uterusgewicht als SHAM.

Tabelle 4.23: Gewicht der Uteri in mg US (MW±ST) in den Therapie- und Kontrollgruppen

US (mg)	Uterus MW±SD
SHAM	1002,7±246,2*
OVX	160,9±61,9 <sup>#</sup>
LaCO	133,0±38,3 <sup>#</sup>
LaCo+VD	178,1±174,1 <sup>#</sup>
REE-Citrat	133,9±41,8 <sup>#</sup>
REE-Citrat+VD	145,7±11,1 <sup>#</sup>

\* (p &lt;0,05), \*\* (p&lt;0,01), \*\*\* (p&lt;0,001) vs OVX

<sup>#</sup> (p <0,05), <sup>##</sup> (p<0,01), <sup>###</sup> (p<0,001) vs SHAM

### Gewicht von Herz und Lunge

Bei den Herzgewichten gab es keine signifikanten Unterschiede, jedoch waren die Lungen der OVX-Gruppe signifikant schwerer, als die der SHAM-Gruppe.

Tabelle 4.24: Gewicht von Herz und Lunge in mg US (MW±ST) in den Therapie- und Kontrollgruppen

US (mg)	Herz MW±SD	Lunge MW±SD
SHAM	868,1±107,3	1820,2±285,1*
OVX	899,2±109,6	2444,5±638,7 <sup>#</sup>
LaCO	840,6±53,7	2061,5±514,2
LaCo+VD	843,8±60,2	2121,4±434,5
REE-Citrat	895,8±100,9	2134,8±216,9
REE-Citrat +VD	874,9±57,6	1890,9±172,6

\* (p &lt;0,05), \*\* (p&lt;0,01), \*\*\* (p&lt;0,001) vs OVX

<sup>#</sup> (p <0,05), <sup>##</sup> (p<0,01), <sup>###</sup> (p<0,001) vs SHAM

### Gewicht von Leber und Niere

Die Gruppe REE-Citrat hatte hoch signifikant höhere Lebergewichte als SHAM und OVX und die REE-Citrat+VD-Gruppe wies signifikant höhere Gewichte der Lebern auf als SHAM. Bei den weiteren Therapiegruppen gab es keine Signifikanzen der Leber und Nierengewichte untereinander oder gegenüber SHAM und OVX.

Tabelle 4.25: Gewicht von Leber und Niere in mg US (MW±ST) in den Therapie- und Kontrollgruppen

US (mg)	Leber MW±SD	Niere MW±SD
SHAM	9980,7±1424,6	1865,7±246,1
OVX	10787,6±1413,2	1872,9±240,5
LaCO	9967,9±804,8	1750,6±113,1
LaCo+VD	10748,8±1163,0	1799,91±124,2
REE-Citrat	12008,0±1306,0 <sup>***</sup>	1885,3±144,7
REE-Citrat+VD	11444,9±1414,5 <sup>#</sup>	1863,9±159,7

\* (p &lt;0,05), \*\* (p&lt;0,01), \*\*\* (p&lt;0,001) vs OVX

<sup>#</sup> (p <0,05), <sup>##</sup> (p<0,01), <sup>###</sup> (p<0,001) vs SHAM

#### 4.4.2. Phosphorgehalt Organe

##### Phosphorgehalt der Herzen

Der Phosphorgehalt der Herzen zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 4.26: Phosphorgehalt der Herzen in mg/g TS (MW±ST) in den Therapie- und Kontrollgruppen

P (mg/g)	Herz MW±SD
SHAM	10,0±1,3
OVX	10,3±0,7
LaCO	10,6±0,4
LaCo+VD	10,6±0,5
REE-Citrat	10,7±0,4
REE-Citrat+VD	10,7±0,6

\* (p &lt;0,05), \*\* (p&lt;0,01), \*\*\* (p&lt;0,001) vs OVX

<sup>#</sup> (p <0,05), <sup>##</sup> (p<0,01), <sup>###</sup> (p<0,001) vs SHAM

##### Phosphorgehalt der Lebern

Die Therapiegruppen LaCo, REE-Citrat und REE-Citrat+VD hatten signifikant niedrigere Werte als OVX, lediglich LaCo+VD zeigte keine signifikant verringerte Konzentration an Phosphor auf. SHAM und OVX zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Alle Therapiegruppen zeigten signifikant niedrigere Konzentrationen an Phosphor in der Leber als SHAM.

Tabelle 4.27: Phosphorgehalt der Lebern in mg/g TS (MW±ST) in den Therapie- und Kontrollgruppen

P(mg/g)	Leber MW±SD
SHAM	7,9±2,7
OVX	6,1±1,9
LaCO	3,1±0,4 <sup>**</sup>
LaCo+VD	3,4±0,2 <sup>#</sup>
REE-Citrat	3,2±0,2 <sup>#</sup>
REE-Citrat+VD	3,2±0,2 <sup>#</sup>

\* (p <0,05) vs OVX; \*\* (p<0,01) vs OVX; \*\*\* (p<0,001) vs OVX

# (p <0,05) vs SHAM; ## (p<0,01) vs SHAM; ### (p<0,001) vs SHAM

#### 4.4.3. Calciumgehalt der Organe

Der Calciumgehalt der Organe bezieht sich, wie auch der Gehalt an Phosphor, auf die Trockensubstanz.

##### Calciumgehalt der Herzen

Die Therapiegruppen LaCo und LaCo+VD hatten signifikant niedrigere Calciumkonzentrationen im Herz als OVX und SHAM.

Tabelle 4.28: Calciumgehalt der Herzen in mg/g TS (MW±ST) in den Therapie- und Kontrollgruppen

Ca(mg/g)	Herz MW±SD
SHAM	0,40±0,1
OVX	0,44±0,2
LaCO	0,26±0,1 <sup>#</sup>
LaCo+VD	0,25±0,1 <sup>#</sup>
REE-Citrat	0,28±0,1
REE-Citrat+VD	0,27±0,1

\* (p <0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001) vs OVX

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

## Calciumgehalt der Lebern

Alle Therapiegruppen (LaCo, LaCo+VD, REE-Citrat und REE-Citrat+VD) wiesen signifikant geringere Konzentrationen an Calcium in der Leber auf, als die Kontrollgruppen SHAM und OVX.

Tabelle 4.29: Calciumgehalt der Lebern in mg/g TS (MW±ST) in den Therapie- und Kontrollgruppen

Ca(mg/g)	Leber MW±SD
SHAM	0,11±0,1
OVX	0,11±0,1
LaCO	0,05±0,1 <sup>#</sup>
LaCo+VD	0,06±0,1 <sup>#</sup>
REE-Citrat	0,06±0,1 <sup>#</sup>
REE-Citrat+VD	0,05±0,1 <sup>#</sup>

\* (p <0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001) vs OVX

<sup>#</sup> (p <0,05), <sup>##</sup> (p<0,01), <sup>###</sup> (p<0,001) vs SHAM

### 4.4.4. Konzentrationen von Seltenen Erden in der Leber

Um Rückschlüsse auf eine mögliche Akkumulation der Seltenen Erden in der Leber schliessen zu können, wurden 2 Lebern der Tiere aus den Therapiegruppen und als Vergleich eine Leber aus der Kontrollgruppe SHAM auf die darin enthaltene Menge an Lanthan und Cer untersucht. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Therapie- und Kontrollgruppen.

Tabelle 4.30: Konzentration an Lanthan und Cer in µg/kg TS der Therapiegruppen und der SHAM-Gruppe

Futterart	La	Ce
SHAM	18,8 µg/kg	14,5 µg/kg
LaCo+VD	38,5 µg/kg	11,5 µg/kg
REE-Citrat+VD	20 µg/kg	12,5 µg/kg

## 4.5. Weender–Analyse und Mineralstoffgehalt Futter

### 4.5.1. Weender–Analyse des Futters

Mit Hilfe der Weender-Analyse wurde die Futterzusammensetzung untersucht. Dabei wurde die Trockensubstanz (TS), der Rohproteingehalt (Rpr), der Rohfettgehalt (Rf), der Rohfaser-, sowie der Rohaschegehalt bestimmt.

Die Gehalte in % sind in Tabelle 4.31 dargestellt und entsprechen weitgehend den Herstellerangaben.

Die Kontrollgruppen SHAM und OVX erhielten das gleiche Standarderhaltungsfutter für Nager, so dass die Nährstoffgehalte sowie die Mineralgehalte hier zu einem Wert zusammengefasst werden können.

Tabelle 4.31: Nährstoffgehalte im Futter nach Weenderanalyse

Futterart	TS (%)	Rpr(%)	Rfe (%)	Rfa (%)	Ra (%)
SHAM/OVX	87,9	16,4	2,9	4,0	6,7
LaCo	87,0	17,9	3,4	3,9	5,8
LaCo+VD	88,0	18,4	5,8	3,3	5,8
REE-Citrat	88,6	18,1	3,2	3,6	6,4
REE-Citrat+VD	87,7	17,9	3,3	3,4	6,3

### 4.5.2. Mineralstoffgehalt des Futters

Von den fünf verschiedenen Futterarten der Tiergruppen wurde der Magnesiumgehalt in g/kg Futter bestimmt, die in Tabelle 4.32 dargestellt sind.

Tabelle 4.32: Gehalt an Ca, P und Mg im Futter

Futterart	Ca (g/kg)	P (g/kg)	Mg (g/kg)
SHAM/OVX	12,0	7,5	2,3
LaCo	10,5	8,0	1,8
LaCo+VD	10,5	8,0	1,8
REE-Citrat	10,5	8,0	1,9
REE-Citrat+VD	10,5	8,0	1,9

## 5 Diskussion

### 5.1.Kritik der Methoden

#### 5.1.1. Wahl des Tiermodells

Es gibt eine Reihe von Tierarten, welche als Tiermodelle für den postmenopausalen Östrogenmangel und den dadurch ausgelösten Knochenverlust geeignet sind. Neben der ovariectomierten Ratte werden auch Maus, Hund, Schwein und Schaf, sowie der nicht-humane Primat als Versuchstiere in Studien über die Osteoporose eingesetzt. Die ovariectomierte Ratte stellt das am weitesten verbreitete Tiermodell dar (JEREON et al., 1996).

In der vorliegenden Studie wurde die Ratte als Tiermodell gewählt, da die nach der Ovariectomie ablaufenden Reaktionen im Knochenstoffwechsel der Ratte grosse Ähnlichkeiten zu den Veränderungen des Knochenstoffwechsels der postmenopausalen Frau aufweisen. Da Ratten seit langem in Tierversuchen eingesetzt werden, sind eine Reihe von gesicherten Erkenntnissen bezüglich des Mineralstoffwechsels (Calcium und Phosphor), der Knochenmarker, und der histomorphometrischen Messungen vorhanden.

Die Reaktionen auf therapeutisch wirksame Agenzien weisen viele Gemeinsamkeiten zwischen der Ratte und der postmenopausalen Frau auf. So konnte die Wirkung von Östrogenen (LINDSAY, 1988), Bisphosphonaten (STORM et al., 1990), Parathormon (HORI et al., 1988) und Calcitonin (MACINTYRE et al., 1988) erfolgreich an der Ratte geprüft werden. Ratten sind relativ kostengünstig in adäquater Menge verfügbar und können unter standardisierten Bedingungen gehalten werden. Somit können auch statistisch relevante Aussagen getroffen werden (BELLINO, 1999).

Die Ratte als Tiermodell besitzt allerdings auch einige Nachteile. Zu nennen sind die kurze Lebensdauer, die hohe metabolische Grundaktivität und die geringe Körpergrösse. Die kurze Lebensdauer verhindert zwar Langzeitversuche, aber da es sich in der vorliegenden Studie um die erste Studie über mögliche knochenprotektive Effekte von Seltenen Erden handelt, genügte eine kürzere Studiendauer.

In der vorliegenden Studie wurden junge Ratten als „mature rat model“ eingesetzt, da junge Tiere einen intensiveren Stoffwechsel aufweisen. Die Stoffwechselforgänge laufen während des Wachstums in einer wesentlich höheren Intensität ab, als es bei ausgewachsenen Tieren der Fall ist. Die Auswirkungen des durch die Ovariectomie veränderten Hormonhaushaltes in Kombination mit den physiologischen Wachstumsvorgängen führen zu einer erhöhten Knochenumsatzrate (WRONSKI et al., 1991). Aus diesem Grund kommt es zu stärkeren Reaktionen auf die zu testenden Agenzien. Die erhöhte Knochenumsatzrate

weist in Bezug auf den Knochenverlust allerdings ähnliche Charakteristika wie bei der 12 Monate alten Ratte des „aged rat models“ auf (KALU et al., 1989).

Ein Nachteil am in dieser Studie gewählten „mature rat model“ ist die nur bedingte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen. Zwar entsteht auch bei der Ratte des „mature aged model“ ein erhöhter Knochen turnover aufgrund des stetigen Knochenwachstums, jedoch tritt die Osteoporose der postmenopausalen Frau erst nach der skelettalen Reife ein. Dies ist bei der jungen Ratte mit Ihrem unausgereiften, sich weiter im Wachstum befindlichen Skelett, nicht der Fall.

So können wachstumsbedingte Veränderungen am Knochen der jugendlichen Ratte die Ergebnisse verzerren (KALU, 1991).

Es sprechen aber dennoch viele Kriterien für die Verwendung des „mature rat models“. Bei 12 Monate alten Ratten muß eine wesentlich längere Zeitdauer eingeplant werden, bis sich im Anschluss an die Ovariectomie biochemische und histologische Veränderungen zeigen. Ihre Anschaffung ist wesentlich schwieriger und die Verfügbarkeit limitiert. Bei den jungen Ratten lassen sich hingegen die Auswirkungen der Ovariectomie bereits nach ca. einem Monat nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die in diesem Alter physiologisch ablaufenden Stoffwechselforgänge anhand einer nicht ovariectomierten, nicht therapierten Positivkontrollgruppe (SHAM) verfolgt. Weiterhin wurde zusätzlich eine nicht therapierte, ovariectomierte Negativkontrollgruppe (OVX) eingesetzt, anhand derer die durch die Ovariectomie bedingten Veränderungen, sowie die Unterschiede zu den therapierten Gruppen verglichen werden sollten.

Die Unterschiede der Knochenmasse und Struktur zwischen der Positivkontrolle (SHAM) und der Negativkontrolle (OVX) erwiesen sich als signifikant. Dieses ist deutlich in der Abbildung 5.1 zu erkennen. Damit ist der Versuchsaufbau und die Verwendung des „mature rat models“ richtig gewählt worden.

Die US Food and Drug Administration (US FDA, 1994) gab Richtlinien für Studien heraus, bei denen Medikamente für die Behandlung und Prophylaxe der Osteoporose untersucht werden (siehe Kap. 2.3. „Zulassungsbestimmungen für Medikamente, die zur Prävention oder Therapie der Postmenopausalen Osteoporose eingesetzt werden“).

Danach müssen präklinische Studien zuerst an einem „Small Animal Model“ und nachfolgend an einem „Large Animal Model“ untersucht werden.

1994 wurden als „Large Animal Model“ das Mutterschaf, das Schwein und der Primat zugelassen. Als „Small animal model“ wurde als einzige Tierart die ovariectomierte Ratte eingesetzt.

Zur Verdeutlichung der Unterschiede in der Dichte der Knochenstruktur sind nachfolgend in Abbildung 5.1 zwei Querschnitte durch repräsentative rechte Femurknochen aus den beiden Kontrollgruppen (SHAM und OVX) mit Hilfe des  $\mu$ CT-Verfahrens und des pQCT-Verfahrens dargestellt: Der Verlust an Knochenmasse ist deutlich zu erkennen.

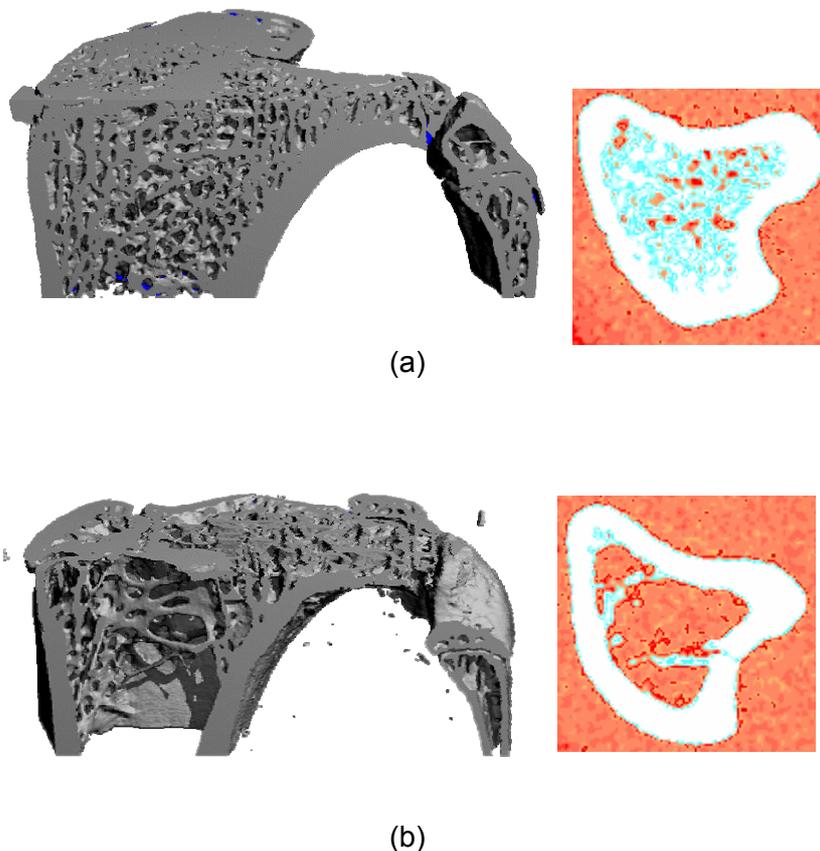


Abbildung 5.1: Rechte Tibia und Femur von Tieren aus der SHAM- und OVX-Gruppe: (a) OVX, (b) SHAM

### 5.1.2. Fütterung und Wirkstoffaufnahme der Tiere

Während des gesamten Zeitraums wurde den Ratten das Futter in pelletierter Form ad libitum angeboten. Das Futter war bereits mit den Seltenen Erden versetzt. Der Vorteil der Futterverabreichung in pelletierter Form lag darin, dass die Wirksubstanzen sich nachfolgend nicht mehr entmischen können. Daneben war durch die Verwendung des pelletierten Futters sichergestellt, dass die Ratten ihr Bedürfnis zu Nagen befriedigen konnten und es im gesamten Verlauf des Versuches zu keinen erkennbaren Zahnanomalien bei den Versuchstieren kam. Auch die Ermittlung der Futteraufnahme wurde durch das unkomplizierte Handling der Pellets vereinfacht. Die Lanthandosierungen in unserer Fütterungsstudie orientierten sich an Studien von D' HAESE et al. (2003) und SWAINSTON HARRISON und SCOTT (2004), bei denen 3,75 g beziehungsweise 9,0 g Lanthancarboxat

bei Humanpatienten mit Niereninsuffizienz als Phosphatfänger eingesetzt wurden (siehe Kap. 3.4 „Tierfutter“).

In unserer Untersuchung wurden die Wirkstoffverbindungen Lanthancarbonat und REE-Citrat eingesetzt. Die Wirkstoffverbindung REE-Citrat enthält neben Lanthan auch eine hohe Menge an Cer. Die Zusammensetzungen der Futterzusätze Lanthancarbonat und REE-Citrat sind im Kapitel 3.5.1. „Gruppeneinteilung“ beschrieben.

Lanthancarbonat enthält im Durchschnitt eine 4-fach höhere Konzentration an Lanthan als die ebenfalls verfütterte REE-Citrat-Mischung. Daher wurde die REE-Citrat-Mischung in einer 4-fach höheren Dosierung eingesetzt.

Vitamin D soll die Aufnahme von Calcium in den Knochen unterstützen und wurde daher supplementiert. Der Dosierung lagen die Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung zur Prophylaxe der postmenopausalen Osteoporose zugrunde.

Allerdings ist bei der Dosierung zu bedenken, dass die Tiere aus den Therapiegruppen durch die Zunahme des Körpergewichtes im Laufe des Versuches trotz steigender Futtermenge eine niedrigere Dosierung an Seltenen Erden pro Kilogramm Körpermasse aufgenommen haben. Die Tiere aus der Lanthancarbonat-Therapiegruppe (LaCo) erhielten 1,74 g Lanthancarbonat pro Kilogramm Futter. Zu Beginn des Versuches (Woche 0) lag die durchschnittliche Futtermenge der Tiere dieser Gruppe bei 137 g und die Tiere wogen im Durchschnitt 302 g. Das entspricht einer Dosis von 0,78 g pro Kilogramm Körpergewicht der Ratten. Bis Woche 6 stieg der Futtermengeverbrauch zunächst an, so dass die Tiere in Woche 6 eine höhere Konzentration von 1,27 g/kg Körpergewicht Lanthancarbonat aufnahmen. Im Zeitraum bis Woche 14 fiel die aufgenommene Futtermenge und damit die Lanthancarbonatmenge auf 1,1 g/kg Körpergewicht um schließlich zum Ende des Fütterungsversuches in Woche 22 wieder auf ein ähnlich tiefes Niveau wie zu Beginn der Studie zu sinken (0,98 g/kg Körpergewicht). Einen ähnlichen Verlauf weist auch die Therapiegruppe auf, die zusätzlich Vitamin D zum Lanthancarbonat erhielt.

Die Gruppen REE-Citrat und REE-Citrat+VD wurden mit einer höheren Dosierung der REE-Citrat-Mischung behandelt: Pro Kilogramm Futter wurden hier 8 g eingemischt, da die eingesetzte REE-Citrat-Futtermischung eine 4-fach niedrigere Konzentration an Lanthan aufweist, als die der Gruppen LaCo und LaCo+VD. Auch hier zeigte sich ein vergleichbarer Verlauf der Futtermengeaufnahme und damit auch der Aufnahme an Seltenen Erden in Korrelation zum Körpergewicht der Tiere aus den Therapiegruppen.

Die mittlere Aufnahme der Tiere aus der LaCo-Gruppe und der LaCo+VD-Gruppe lag bei 1,1 g/kg. Die beiden REE-Citrat-Gruppen nahmen durchschnittlich 5,0 g/kg der Seltenen Erden-Mischung auf. Alle Tiere aus den Therapiegruppen nahmen damit zu den unterschiedlichen Versuchszeitpunkten vergleichbare Mengen an Lanthan auf.

Tabelle 5.1: Menge an aufgenommenen Seltenen Erden (MW±SD) in g/kg KG der Kontrollgruppen und Tiere aus den Therapiegruppen (n=10 Tiere/Gruppe) in den Wochen 0, 6, 14, 22

Zeitraum	0	6	14	22
LaCo	0,78	1,27	1,10	0,98
LaCo+VD	0,81	1,29	1,20	0,97
REE-Citrat	3,73	5,72	5,63	4,95
REE-Citrat+VD	4,02	6,05	5,56	4,53

### 5.1.3. Messmethoden

#### Die Bestimmung der Knochendichte mittels pQCT

Die Technik basiert auf der physikalischen Eigenschaft des Knochens Photonen zu absorbieren (GOWIN und FELSEBERG, 1996).

Im Gegensatz zu linearen Absorptionsmethoden beschreibt die pQCT-Messung eine wirkliche volumetrische Mineraleichte und unterscheidet zwischen Kortikalis und Spongiosa. Aufgrund dessen können anhand des pQCT-Verfahrens exakte volumetrische Werte der Knochendichte, sowie der Geometrie unterschiedlicher Parameter des Knochens bestimmt werden (BAGI et al., 2006).

Neben der Anwendung zur Osteoporosediagnostik eignet sich das pQCT-Verfahren ausgezeichnet, um die Knochendichte und -masse an der Ratte oder anderen „Small animal models“ zu bestimmen. Inzwischen stellt das pQCT eine etablierte Methode dar um die Knochendichte bei Ratten, Mäusen und anderen Versuchstieren zu messen (MAKAN et al., 1997; FERRETI et al., 1998).

ECKSTEIN et al. (2004) verwendeten das pQCT um sowohl die Dichte, als auch die kortikale Struktur der longitudinalen Knochens von transgenen Mäusen in vivo darzustellen. Auch GASSER (1995) beschreibt, dass das pQCT-Verfahren für Messungen an Ratten geeignet ist, und dass diese sensitive, reproduzierbare und nicht invasive Methode Unterschiede in Knochenmasse, Knochendichte und der Geometrie des Knochens darzustellen vermag. Die „small animal Software“ des eingesetzten pQCT-Verfahrens wurde mit Hilfe von biochemischen Analysen validiert.

Das pQCT-Verfahren erfasst sowohl den kortikalen, als auch den spongiösen Anteil des Knochens, wobei beide Anteile getrennt voneinander erfasst werden können. Dies ist gerade bei der Ratte wichtig, da hier das Verhältnis trabekulärer Masse kleiner der kortikalen Masse ist, und die osteoporotischen Veränderungen vor allem die trabekulären Anteile des Knochens betreffen. Somit ist die Knochendichtemessung mittels pQCT in diesem Versuche eine sinnvolle Methode.

## 5.1.4. Knochenstoffwechsel

### Osteocalcin als Marker für die Knochenformation

Die Konzentrationskurve des Osteocalcins der im Versuch eingesetzten, jungen Ratten verhält sich vergleichbar einer Konzentrationskurve von sich noch im Wachstum befindlichen Kindern und Jugendlichen, bei denen es zu einem erhöhten Knochen turnover mit einer gesteigerten Knochenneubildung kommt (TARALLO et al., 1990; CALVO et al., 1996; SZULE et al. 2000). Beim erwachsenen, ausgewachsenen Individuum ist diese Steigerung der Osteocalcinkonzentrationen nicht mehr vorhanden und folglich sinkt auch die Osteocalcinkonzentration im Serum. Dieser kontinuierliche Abfall ist auch bei den Tieren der SHAM-Gruppe zu beobachten (siehe Abb 5.2).

Es kommt allerdings durch die Ovariectomie zu einer Überlagerung des altersbedingten Abfalls und einer ovariectomie-bedingten Erhöhung des zirkulierenden Osteocalcins. Dies muss bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Die folgende Abbildung 5.2 stellt den Verlauf der Osteocalcinkonzentration der SHAM- und OVX-Gruppe über den Versuchszeitraum dar:

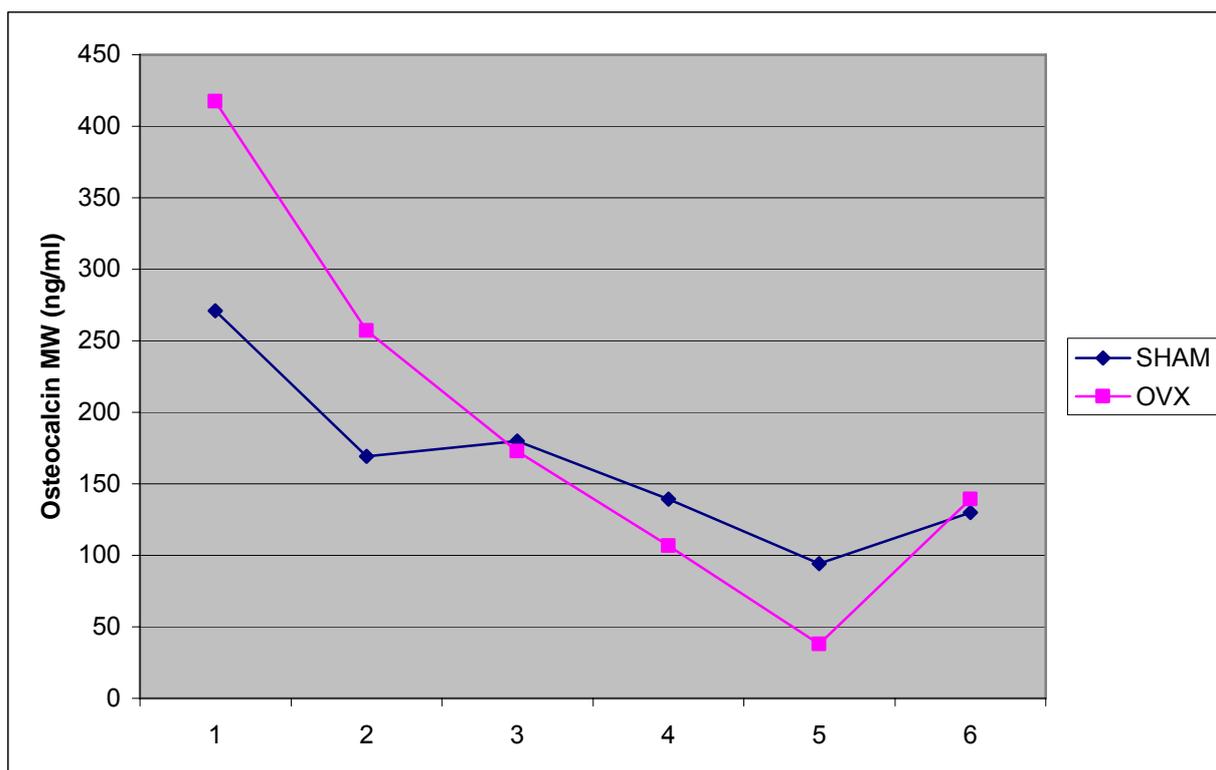


Abbildung 5.2: Osteocalcinkonzentration (MW $\pm$ SD) der SHAM (n=10 Tiere/Gruppe) und OVX-Gruppe (n=10 Tiere/Gruppe) in ng/ml zu den Bestimmungszeitpunkten 1, 2, 3, 4, 5 und 6

## Bestimmungsmethode des Osteocalcins

Der hier verwendete Rat-MID® Osteocalcin ELISA verfügt über eine Besonderheit: Im Gegensatz zu anderen ELISAs, die zur Detektion von Rattenosteocalcin eingesetzt werden, besitzt der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte ELISA einen primären Antikörper, der gegen humanes Osteocalcin gerichtet ist und an die MID-regionale Struktur des Osteocalcinmoleküls an die Aminosäuren 21 bis 29 bindet. Denn gerade dieser Teil des humanen Osteocalcinmoleküls weist eine Parallelität zum Osteocalcinmolekül der Ratte auf. Die Bindung des Antikörpers kann also an beiden Molekülen erfolgen. Aus diesem Zusammenhang ergibt sich ein Vorteil in der Herstellung und späteren Verwertbarkeit des Assaykits. Für die Standardisierung kann synthetisch hergestelltes, humanes Osteocalcin verwendet werden, welches hohe Sicherheit und kontinuierliche Qualität gewährleistet.

Der verwendete Rat-MID® Osteocalcin ELISA benötigt ein nur geringes Probenvolumen von 20 µl Serum, was vor dem Hintergrund der technischen Möglichkeiten einer kontinuierlichen Blutentnahme bei der Ratte äußerst wichtig ist. Einer Ratte mit einem Gewicht von 200 g sollte nicht mehr als 1 ml Blut pro Monat entnommen werden (HENKE, 2005); dies war in diesem Versuch problemlos möglich.

Aufgrund der bereits beschriebenen tageszeitlichen Schwankungen des Osteocalcinspiegels (HEUCK et al., 1998) (siehe Kap. 2.2.4. „Die biochemischen Marker des Knochenstoffwechsels“) können die gemessenen Werte bei tageszeitlich unterschiedlichen Blutentnahmen an Humanpatienten bis zu 15% differieren (SEIBEL und RAUE, 1996). Hierbei handelt es sich jedoch nur um intraindividuelle Schwankungen, es müssen jedoch auch die interindividuellen Schwankungen berücksichtigt werden. So zeigten sich in den Kontrollgruppen Schwankungen um 30%. Die Schwankungen innerhalb der REE-Citratgruppe waren mit bis zu 35 % am höchsten. Die LaCo+VD-Gruppe wies Schwankungen von 30% die Gruppen REE-Citrat und LaCo lediglich 23% auf.

Aufgrund des Versuchsaufbaus und der großen Zahl der Versuchstiere war es nicht möglich, die gesamten Blutentnahmen zu einem einheitlichen Zeitpunkt vorzunehmen, um damit eventuelle Schwankungen auszuschließen.

Daher wurde zu Beginn der Studie die bereits in Material und Methoden beschriebene Reihenfolge der Blutentnahme bei den Tieren festgelegt. Außerdem wurden die Blutentnahmen lediglich in den Vormittagsstunden durchgeführt, um die tageszeitlichen Schwankungen zu minimieren.

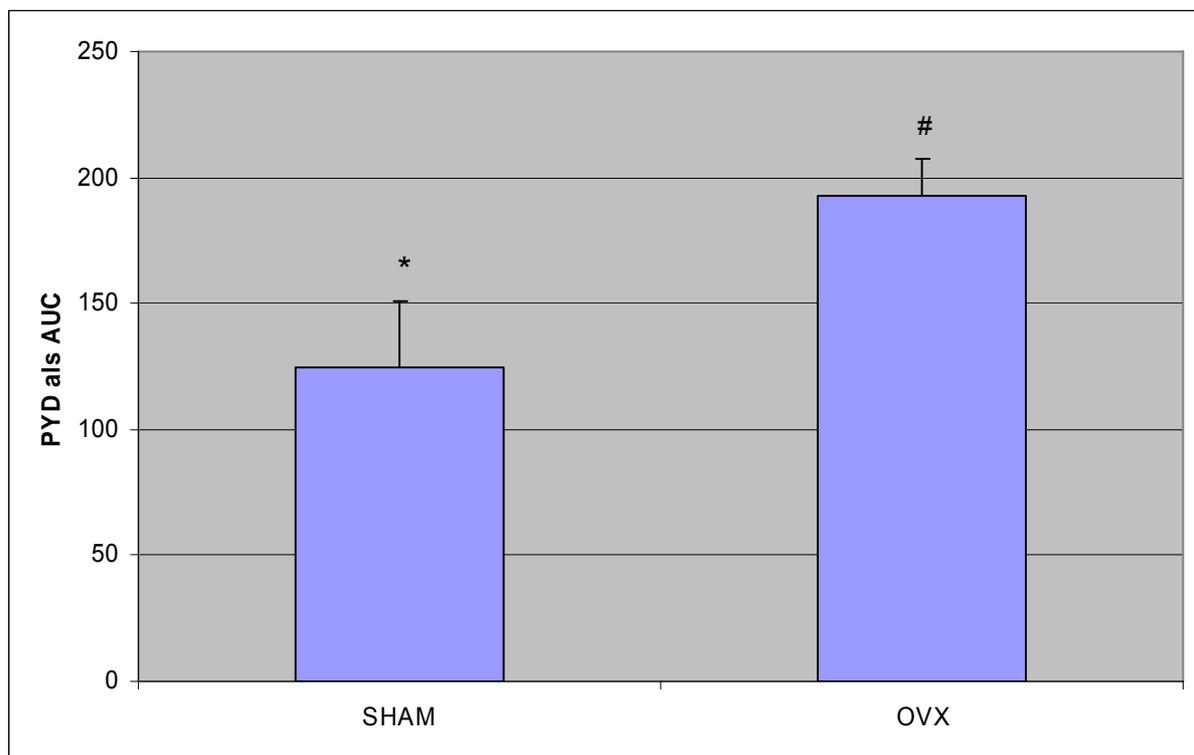
## PYD und DPD als Marker für die Knochenresorption

Ebenso wie beim Osteocalcin kommt es auch bei den Resorptionsmarkern PYD und DPD durch das langsamer werdende Wachstum zu einer Verringerung der PYD und DPD

Konzentrationen im Urin. Durch die Ovariectomie wird allerdings der Knochenturnover erhöht, so dass auch die Resorptionsmarker wieder ansteigen.

Bei dem in dieser Studie gewählten „mature rat model“ tritt die bereits beschriebene Überlagerung des altersbedingten Abfalls und der ovariectomie-bedingten Erhöhung der Resorptionsparamtern in Erscheinung, die aber aus den in Kap. 5.1.1 „Wahl des Tiermodells“ genannten Gründen in Kauf genommen wurde. Trotz dieses Effektes war die Fläche unter der Kurve bei den OVX-Tieren wesentlich höher als bei der SHAM-Gruppe.

Die Abbildung 5.3 zeigt die PYD Ausscheidung der SHAM- und OVX-Gruppe



(p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001) vs OVX  
 # (p < 0,05), ## (p < 0,01), ### (p < 0,001) vs SHAM

Abbildung 5.3: Collagencrosslinks PYD (MW±ST ) der beiden Kontrollgruppen SHAM und OVX (jeweils n=10 Tiere /Gruppe) als AUC

Bei Raumtemperatur sind PYD und DPD relativ stabil; diese Tatsache ermöglicht die Bestimmung aus dem 24 h-Sammelurin, ohne hierbei verfälschte Ergebnisse durch bereits einsetzende Abbauvorgänge zu erhalten (ABBIATTI et al., 1993).

### Bestimmungsmethode von PYD und DPD

Collagencrosslinks können mittels HPLC oder Immunoassays bestimmt werden (PARVIAINEN et al. 1999), wobei die Immunoassays nur die freien Collagencrosslinks

nachweisen, die nur etwa 40 % der Gesamtkonzentration ausmachen (DELMAS et al., 1991).

In unseren Untersuchungen wurde das HPLC-Verfahren gewählt, da hier die Gesamtausscheidung der Collagencrosslinks nachgewiesen werden kann. Das Nachweisverfahren mittels HPLC erfasst die Exkretion der Collagencrosslinks zudem speziesunabhängig (BLACK et al., 1988), da hierbei während der Probenvorbereitung die peptidgebundenen Anteile von den Collagencrosslinks abgespalten werden. Unsere Arbeitsgruppe modifizierte dabei die nach BLACK et al. (1988) und COLLWELL et al. (1993) beschriebene Methode (WEHR, 1998). Eine verbesserte Probenaufbereitung ermöglicht den Einsatz von wesentlich weniger Material, so dass auch weniger Verunreinigungen in das HPLC-Messgerät gelangen können. Die Folge war eine verbesserte Auswertbarkeit des Chromatogramms, so dass selbst bei niedrigen Konzentrationen eine eindeutige Zuordnung der Peaks möglich war.

Dieses ist gerade vor dem Hintergrund wichtig, dass bei der Ratte nur kleine Urinvolumen zu Verfügung stehen.

## 5.2. Wahl des Wirkstoffes

Es kamen zwei unterschiedliche Seltene Erd-Verbindungen zum Einsatz. Das Lanthancarbonat (LaCo) wurde von der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland bezogen. Es handelt sich dabei um Lanthan III Carbonathydrat, welches zu 99,9% eine chemisch reine Verbindung darstellt. Diese Verbindung weist einen Hydratationsgrad von 2-5 an Kristallwasser auf.

Die zweite Testsubstanz wurde von der Firma Zehentmayer, Berg, Schweiz geliefert. Es handelt sich hier um eine Mischung von Seltenen-Erd-Citrat. Diese ist bereits als Futterzusatzstoff in Form der Futtermischung „Lancer“ der Firma Zehentmayer in der Schweiz zugelassen.

Lanthancarbonat und die REE-Citratmischung wurden zusätzlich mit Vitamin D supplementiert, um zu untersuchen, ob die möglichen knochenprotektiven Eigenschaften der beiden Substanzen durch die Supplementierung von Vitamin D gesteigert werden können.

### 5.2.1. Lanthancarbonat

Der Wirkstoff Lanthancarbonat wird unter dem Handelsnamen „fosrenol“® der Firma SHIRE als Phosphatfänger eingesetzt. Der Einsatzbereich ist die Niereninsuffizienz und die daraus entstehende Hyperphosphatämie und Osteodystrophie. Etablierte Phosphatbinder wie Calciumcarbonat und aluminiumhaltige Phosphatbinder können zu starken Nebenwirkungen führen, so dass weiterhin nach einem geeigneten Alternativtherapeutikum gesucht wird.

Lanthancarboxat stellt mit seinen geringen Nebenwirkungen und seinem hohen Phosphatbindungsvermögen daher eine geeignete Alternative zu den etablierten Präparaten dar. Daneben konnten D`HAESE et al. (2003) in einer Studie beobachten, dass bei 80 % der Patienten während der Einnahme von Lanthancarboxat der erhöhte Knochen turnover normalisiert werden konnte. Diese Beobachtung war für unsere Arbeitsgruppe der Grund, diese positive Wirkung unter kontrollierten Bedingungen am Tiermodell gegen eine Kontrollgruppe zu vergleichen.

## 5.2.2 REE-Citrat

Vor dem Hintergrund, dass Lanthan die bereits beschriebenen positiven Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel aufweist, stellte unsere Arbeitsgruppe Überlegungen an, ob auch ein Gemisch von Seltenen Erden positive Einwirkungen auf den Knochenstoffwechsel aufweisen könnte. REE-Citrat wurde ausgewählt, da es bereits positive Daten über die Verträglichkeit gab und die REE-Citrat-Mischung bereits in Fütterungsversuchen zu leistungssteigernden Effekten von unserer Arbeitsgruppe verwendet worden ist.

## 5.2.3. Einfluss der Seltenen Erden auf die Entwicklung des Körpergewichtes

Die Gewichtszunahme aller Tiere während des Untersuchungszeitraums ist auf das Wachstum in diesem Altersabschnitt zurückzuführen.

Das Gewicht der SHAM-Gruppe stieg während des Versuches um 42 %. Dieses stellt eine durchschnittliche, alters- und wachstumsabhängige Gewichtszunahme für Laborratten dieses Altersabschnittes dar. Zum Ende des Versuches hatten die Tiere ein durchschnittliches Körpergewicht, welches im oberen Referenzbereich für Laborratten anzusiedeln ist (VERVUERTH, 1999).

Der Unterschied der Körpergewichte zwischen SHAM und OVX zeigte sich in einem um 7% höheren Körpergewicht der OVX-Gruppe bereits zu Beginn der Studie. 10 Tage post interventionem zeigten die Tiere aus der OVX-Gruppe bereits ein um 22% höheres Körpergewicht als SHAM. Während des gesamten Versuches wiesen die Tiere der SHAM-Gruppe ein signifikant niedrigeres Körpergewicht auf als die Tiere aus der OVX-Gruppe. Allerdings war die Untersuchung der leistungssteigernden Effekte nicht das Ziel dieser Studie. Um einen signifikanten leistungssteigernden Effekt zu erhalten, waren die gewählten Konzentrationen der eingesetzten Seltenen Erden zu hoch. Die vorgefundenen Leistungssteigerungen in der Gewichtszunahme stellen also nur ein „Byprodukt“ der

Ergebnisse dar. Die Abbildung 5.4 zeigt die Körpergewichte der Therapie- und Kontrollgruppen in den Wochen 0, 4, 8, 14, 20 und 26 post interventionem.

Durch den Abfall des Östrogenspiegels kommt es zu einer Zunahme des Körpergewichtes bei den ovariectomierten Ratten (LINDGREN und LINDHOLM, 1979; LI et al., 2001). Dieser Zusammenhang stellt sich sowohl bei einer ad libitum Fütterung, wie in der vorliegenden Studie, als auch bei restriktiver Fütterung dar (WRONSKI et al., 1987). Es kommt durch den Mangel an Östrogenen zu einer vermehrten Ablagerung von Fett, wobei Tiere, die im Alter zwischen acht und vier Wochen ovariectomiert worden sind, zu besonders hohem Fettansatz neigen. Aufgrund der verminderten Östrogenspiegel kommt es auch bei der peri- oder postmenopausalen Frau zu einer vermehrten Ablagerung von Fett (LEY et al., 1992). Da dieser, durch die Ovariectomie bedingte Gewichtszunahme, Rechnung getragen werden muss, wurden die Tiere aus den Therapiegruppen nur mit der OVX-Gruppe verglichen.

Die Entwicklung des Körpergewichtes der Therapiegruppen sprach zwar für einen tendenziell leistungssteigernden Effekt der Seltenen Erden, aber nur die Therapiegruppe REE-Citrat (+7%) wies ein signifikant höheres Körpergewicht als OVX auf. Die Steigerungen der Körpergewichte der anderen Therapiegruppen lagen bei LaCo +4,6%, LaCo+VD +6% und REE-Citrat+VD +4,4%.

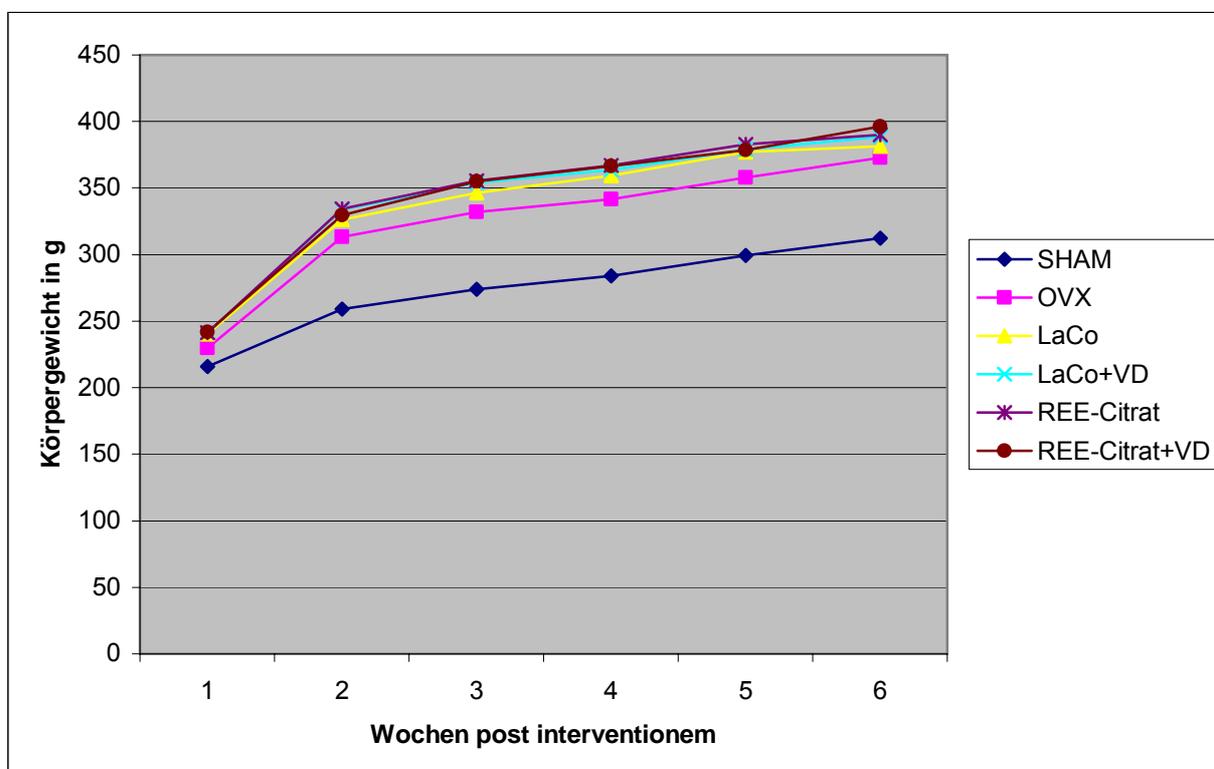


Abbildung 5.4: Entwicklung der durchschnittlichen Körpermasse MW±SD der Tiere aus den Therapiegruppen (n=10 Tiere pro Gruppe) in den Wochen 0, 4, 8, 14, 20 und 26 post interventionem

Der genaue Wirkmechanismus des leistungssteigernden Effektes der Seltenen Erden ist nach wie vor noch nicht geklärt. In der chinesischen Literatur werden vor allem zwei verschiedene Wirkmechanismen diskutiert: Auf der einen Seite könnten die Seltenen Erden lokal im Intestinaltrakt zu einem ergotropen Effekt führen, und auf der anderen Seite wird Ihnen eine Wirkung auf den Intermediärstoffwechsel zugeschrieben. Da die Seltenen Erden einer äusserst geringen Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt unterliegen (DURBIN, 1956; JI, 1985; EVANS, 1990), erscheint die lokale Wirkung im Darm als schlüssigere Erklärung. LI et al. (1992) und XU et al. (1998) berichten über die verbesserte Verdaulichkeit und Verfügbarkeit von Nährstoffen berichtet.

BÖHME et al. (2002) konnten diese Theorie bei einem Fütterungsversuch unter westlichen Tierhaltungs- und Mastbedingungen allerdings nicht bestätigen.

Sicher ist, dass Seltenen Erden in vitro konzentrationsabhängig einen Einfluss auf das Wachstum von Bakterien aufweisen. Bei niedrigen Konzentrationen kommt es zu einer Förderung des bakteriellen Wachstums, während bei hohen Konzentrationen ein bakteriostatischer Effekt zu beobachten ist (MUROMA, 1958).

Für die Beeinflussung des Intermediärstoffwechsels sprechen die Studien von BORGER (2003) und EISELE (2003). Aber auch hier gibt es bislang keine eindeutigen Ergebnisse, und die Studienergebnisse aus dem chinesischen Raum widersprechen den westlichen Untersuchungen: BORGER (2003) und EISELE (2003) dokumentierten signifikant erniedrigte Trijodthyroninspiegel, während HE et al. (2003) und XIE et al. (1995) erhöhte Trijodthyroninspiegel bei einer ebenfalls erhöhten Gluthationperoxidasaktivität und erhöhten Wachstumshormonspiegeln beschreiben.

## 5.3. Wirkung auf die Organparameter

### 5.3.1. Uterusgewichte

Die Gewichte der Uteri dienen als Kontrollparameter für eine erfolgte Ovariectomie, da sich der Uterus unter dem fehlenden Einfluss der Östrogene zurückbildet.

Am Versuchsende wurden die Uterusgewichte der Tiere bestimmt. Die Uteri der Tiere aus der SHAM-Gruppe waren um durchschnittlich 0,84 g beziehungsweise um 90% schwerer, als die der ovariectomierten Tiere.

Dieser hoch signifikante Unterschied der Uterusgewichte ist auf die verringerte Konzentration an Östrogenen als Folge der Ovariectomie zurückzuführen. Durch die Östrogene kommt es zu einer Anregung des Zellstoffwechsels, der Zellteilung, des Wachstums, der Durchblutung und der Flüssigkeitsaufnahme der glatten Muskulatur des Uterus. Ausserdem wird zudem die Motilität gefördert. Die Folge der Ovariectomie und der verringerten Konzentration an Östrogenen ist eine Involution des Uterus (TANSEY et al., 1998).

Die eingesetzten Seltenen Erden wiesen in dieser Studie keinen Einfluss auf den Geschlechtsapparat der OVX-Tiere auf, da es keine signifikanten Unterschiede bei den Uterusgewichten zwischen den Therapiegruppen und der OVX-Gruppe gab. Dieser Zusammenhang ist als positiv zu bewerten, da Nebenwirkungen auf die Geschlechtsorgane, wie sie bei der Hormonersatztherapie mit Östrogenen entstehen können, unerwünschte Begleiterscheinungen der Osteoporosetherapie darstellen.

### 5.3.2. Gewichte von Lunge, Herz, Leber und Niere

Die Lungen der SHAM Tiere waren signifikant leichter als die Lungengewichte der OVX-Gruppe. Auch gegenüber den Therapiegruppen zeigte OVX signifikant schwerere Lungen. Zwischen SHAM und den Therapiegruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Die signifikant schwereren Lungen der OVX-Tiere könnten auf einen mangelnden Ausblutungsgrad der Lungen zurückzuführen sein, denn durch die Ovariectomie dürften keine Auswirkungen auf das Lungengewicht zu erwarten sein.

Die Herzgewichte ergaben keine signifikanten Unterschiede.

Bei den Lebergewichten wiesen SHAM und OVX keine signifikanten Unterschiede auf. Die Lebergewichte der REE-Citrat und REE-Citrat+VD Gruppen waren signifikant höher als die Lebergewichte der SHAM Tiere. Gegenüber OVX zeigte REE-Citrat signifikante Unterschiede beim Gewicht der Leber.

Da es aufgrund der Ovariectomie zu einer vermehrten Ablagerung von Fettgewebe kommt, und die Leber eines der zentralen Organe des Fettstoffwechsels darstellt, ist mit der Zunahme an Körpergewicht und Fettgewebe auch die Gewichtszunahme der Leber zu erklären.

Die REE-Citrat-Gruppe stellt die Therapiegruppe mit den höchsten Tiergewichten dar. Das durchschnittliche Körpergewicht lag um 6% höher, insofern ist auch das höhere Gewicht der Lebern zu erklären.

### 5.3.3. Mineralstoffgehalt und Konzentration von Seltenen Erden in den Organen

Der Calciumgehalt der Herzen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen SHAM und OVX.

Alle Versuchstiergruppen wiesen signifikant niedrigere Calciumwerte des Herzens auf als die beiden Kontrollgruppen SHAM und OVX.

Bei den Calciumkonzentrationen der Lebern zeigte sich das gleiche Ergebnis. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen SHAM und OVX, während alle Tiere aus den

Therapiegruppen signifikant niedrigere Calciumkonzentrationen aufwiesen als die beiden Kontrollgruppen.

Die Phosphorkonzentration der Herzen zeigte keine signifikanten Unterschiede. Zwischen SHAM und OVX bestand auch bei den Lebern kein signifikanter Unterschied in der Phosphorkonzentration, während alle Tiere aus den Therapiegruppen signifikant verringerte Konzentrationen im Vergleich zu OVX und SHAM zeigten.

Man kann jedoch nach diesen Ergebnissen davon ausgehen, dass REE den Calciumstoffwechsel beeinflussen.

YUGUI et al. (1990) wiesen in Ihrem Versuch ebenfalls erniedrigte Calciumwerte bei mit Seltenen Erden supplementierten Hühnern nach. Allerdings handelte es sich um eine Ganzkörperanalyse, so dass Rückschlüsse auf die Verteilung in den verschiedenen Organen nicht möglich sind. Allerdings gibt es auch Studien aus der chinesischen Literatur, bei denen eine Erhöhung der Calciumkonzentrationen nachgewiesen wurde: JIANHUA et al. (1988) veröffentlichten eine Studie, die bei Ganzkörperanalysen von Hühnern Ergebnisse lieferten, bei denen die Calciumkonzentrationen um das doppelte in Bezug auf die Kontrollgruppe erhöht waren. Insofern widersprechen sich die Angaben über die Auswirkungen der Supplementierung von Seltenen Erden und Ihrem Einfluss auf die Calciumkonzentrationen im Körper und den Organen. Die Phosphorkonzentrationen der Ganzkörperanalysen der beiden zitierten Studien zeigten keine Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Auch weitere chinesische Veröffentlichungen beschreiben keine Veränderungen in den Phosphorkonzentrationen der Organe oder des Gesamtkörpers.

Ein Erklärungsansatz für die verringerten Calciumkonzentrationen scheint zunächst die Möglichkeit zu sein, dass Seltene Erden mit Calciumrezeptoren und anderen Calciumbindungsstellen im Körper in Wechselwirkung treten können (siehe Kapitel 2.1.3 „Chemische und Physikalische Eigenschaften der Seltenen Erden“), und es auf diesem Weg zu einer Verdrängung von Calcium und damit auch zu einer Verringerung der Konzentration im betroffenen Gewebe kommt. Allerdings sprechen einige Tatsachen gegen diesen Erklärungsansatz: Zum einen unterliegen die Seltenen Erden nur einer sehr geringen Resorption aus dem Verdauungstrakt (DURBIN, 1956; JI, 1985; EVANS, 1990), so dass die in dieser Studie eingesetzten Konzentrationen nicht ausreichend gewesen sein dürften, um eine Verdrängung von Calcium in diesem Maße zu erklären. Desweiteren beschreiben BEHETS et al. (2004), dass der Austausch von Calcium gegen Lanthan nur in einem Verhältnis von 50.000:1 stattfindet, so dass es nur zu einer äusserst geringen Ablagerung von Lanthan im Knochen kommt. Falls diese Grössenordnung auch auf Organe Anwendung findet, können die verringerten Calciumkonzentrationen nicht in dieser Weise erklärt werden.

Somit können weder die Ursachen für die Verringerung der Calciumkonzentrationen, noch der verringerten Phosphorkonzentrationen anhand unserer Ergebnisse eindeutig geklärt werden.

### Konzentration von Lanthan und Cer in der Leber

Es wurde jeweils eine Leber aus den Therapiegruppen LaCo+VD und REE-Citrat +VD und aus der Kontrollgruppe SHAM untersucht. Es gab keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Gehaltes an Lanthan und Cer zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen. Dieser Zusammenhang spricht für eine geringe intestinale Resorption der Seltenen Erden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Studien von SCHULLER (2001) und HALLE (2002), sowie von D'HAESE et al. (2003), SWAINSTON HARRISON und SCOTT (2004) und BEHETS et al. (2004) überein und widersprechen FLECKENSTEIN et al. (2004). Bei den letztgenannten Studien wurden erhöhte Konzentrationen in der Leber und im Brustmuskel festgestellt. In der vorliegenden Studie konnte keine Zunahme der Gehalte in den Organen nachgewiesen werden, obwohl die gewählten Konzentrationen wesentlich höher waren als im Versuch von FLECKENSTEIN et al. (2004).

## 5.4. Einfluss auf den Knochen

Um den Einfluss der Seltenen Erden auf den Knochen interpretieren zu können, wurden sowohl Parameter der Knochenstruktur und –zusammensetzung (Länge, Gewicht, Dichte, Knochenasche und Mineralstoffgehalt des Knochens), als auch des Knochenstoffwechsels, wie die Marker der Resorption, der Formation und die Calciumkonzentration des Serums bestimmt.

### 5.4.1. Parameter des Knochenstoffwechsels

Bei der Betrachtung der Wirkung auf den Knochenstoffwechsel muss zunächst auf die Supplementierung der Gruppen LaCo+VD und REE-Citrat+VD mit Vitamin D eingegangen werden.

Die Tiere erhielten etwa die doppelte Dosis an Vit D, welche vom National Research Council angegeben wird und bei 1000 I.E. pro kg Futter liegt (Nutrient Requirements of Laboratory Animals, 1995), wobei es sich um eine Minimalempfehlung handelt.

Bei der in dieser Studie eingesetzten Dosierung sind nach KRAMMER (2001) keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den mit Vitamin D supplementierten Tieren aus den Therapiegruppen und den Gruppen LaCo, REE-Citrat, SHAM und OVX in Bezug auf die verschiedenen Parameter des Knochenstoffwechsels zu erwarten.

## Osteocalcin

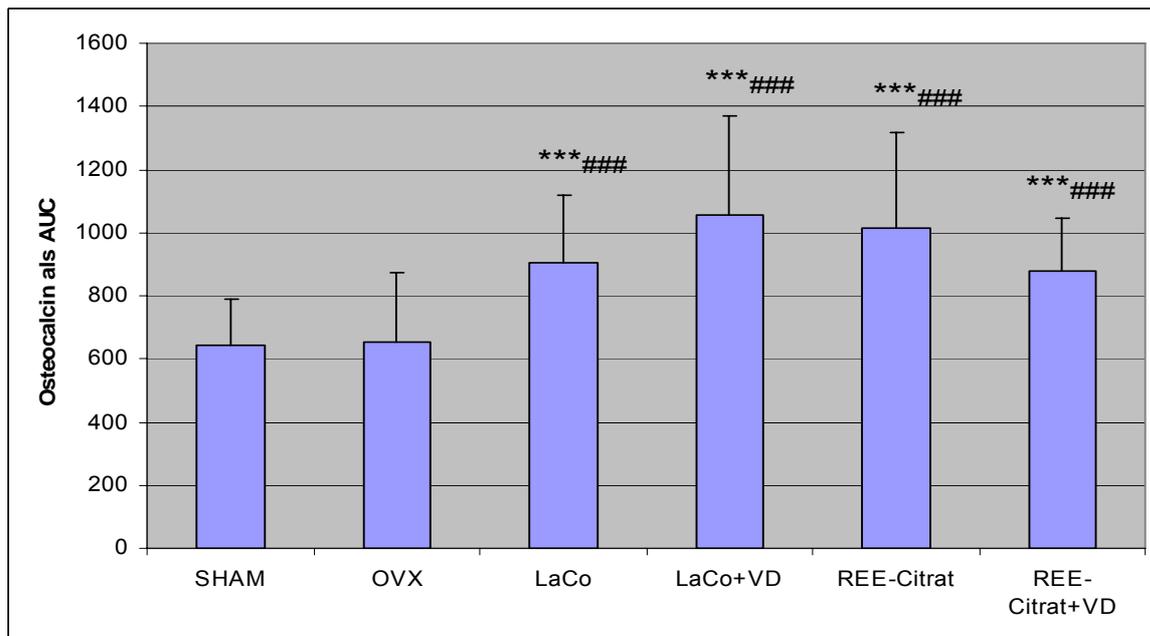
Zu Versuchsbeginn zeigten alle Tiere der Therapiegruppen eine höhere Konzentration von Osteocalcin im Serum als die Tiere der SHAM-Gruppe. Dieses ist in der Abbildung 5.6 zu erkennen.

Bei der Auswertung der Fläche unter der Kurve bestehen zwischen OVX und SHAM keine signifikanten Unterschiede. Alle Therapiegruppen weisen hochsignifikant höhere Osteocalcinkonzentrationen auf als OVX und SHAM. Die Osteocalcinkonzentrationen als Fläche unter der Kurve sind in der Abbildung 5.5 dargestellt.

Die Unterschiede in den Osteocalcinkonzentrationen zu Versuchsbeginn zwischen den ovariectomierten Gruppen sind als physiologische, individuelle Schwankungen zu beurteilen, da sich die Prozesse des Wachstums und des Östrogenverlustes überlagern können.

Die physiologische Verminderung des Knochenturnovers und damit das Absinken der Osteocalcinwerte bis zur 12. Woche zeigte sich bei den Osteocalcinwerten der SHAM-Gruppe. Zum Ende des Versuches war die Osteocalcinkonzentration schliesslich auf 50 % des Ausgangswertes gefallen.

Die Osteocalcinkonzentration der OVX-Gruppe zeigte trotz Ovariectomie einen ähnlichen Abfall wie bei der SHAM-Gruppe. Aufgrund der Ovariectomie wären insgesamt höhere Osteocalcin Werten zu erwarten, da sich ein „high turn over“ des Knochens einstellt. Dieses ist auch bei der postmenopausalen Frau der Fall. Allerdings stellt sich dieses Bild nur im direkten Anschluss an die Ovariectomie dar. So ist die Osteocalcinkonzentration zu Beginn des Versuches direkt im Anschluss an die Ovariectomie bei den ovariectomierten Gruppen im Vergleich zu SHAM stark erhöht. Es folgt jedoch auch in diesen Gruppen aufgrund des langsamer werdenden Wachstums der jungen Ratten ein Abfall der Osteocalcinkonzentration. Das wird durch die Osteocalcinkonzentrationen zu Beginn des Versuches unterstrichen. Der Abfall der Osteocalcinkonzentration ist in Abbildung 5.6 dargestellt. Somit kommt es zu einer Überlagerung des „High bone turnovers“ durch die Ovariectomie und des Abfallens der Osteocalcinwerte durch das langsamere Wachstum der Tiere. Daher zeigt die OVX-Gruppe etwa die gleichen Werte wie die SHAM-Gruppe. Da sich diese beiden Effekte bei der Verwendung von jungen Ratten überlagern, müssen die Ergebnisse unter diesem Aspekt interpretiert werden.



(p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001) vs OVX  
 # (p < 0,05), ## (p < 0,01), ### (p < 0,001) vs SHAM

Abbildung 5.5: Osteocalcin im Serum (MW±ST ) als AUC der Therapie- und Kontrollgruppen (n=10 Tiere/Gruppe)

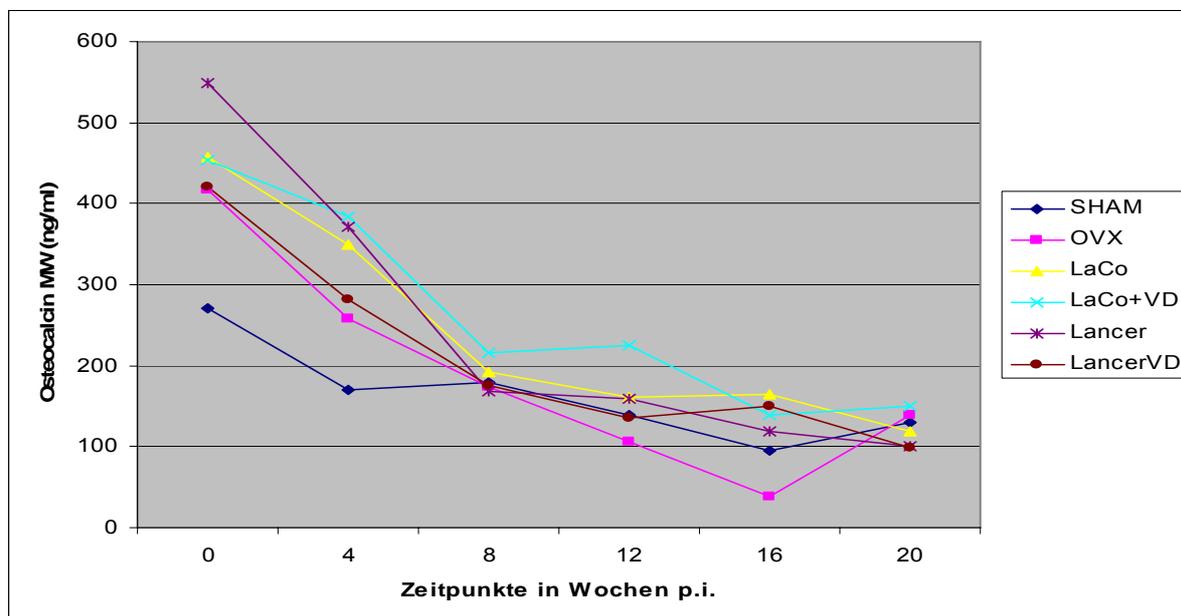


Abbildung 5.6: Osteocalcinkonzentration in ng/ml MW±SD der Therapie- und Kontrollgruppen (n=10 Tiere/Gruppe) zu den Zeitpunkten 0, 4, 8, 12, 16, 20 in Wochen post interventionem

Der Anstieg der Osteocalcinkonzentration der Therapiegruppen kann durch eine Aktivierung der Osteoblasten erklärt werden. Dieses führt zu einem Anstieg der Knochenformation der Therapiegruppen im Vergleich zur OVX-Gruppe.

Die Osteocalcinbildung unterliegt einer Vielzahl von endokrinen und parakrinen Faktoren und wird zudem durch verschiedene Vitamine beeinflusst. Vor allem Vitamin K nimmt eine bedeutende Rolle ein, da die zur Osteocalcinbildung nötigen Carboxylierungsprozesse Vitamin K abhängig sind. Möglicherweise treten die Seltenen Erden in Wechselwirkungen mit einem oder mehreren dieser Faktoren. Einen fördernden Einfluss der Seltenen Erden auf das Wachstumshormon, welcher mit einer gesteigerten Osteocalcinsynthese einhergeht (HOLLOWAY et al., 1994), erscheint unwahrscheinlich. Die Tiere aus den Therapiegruppen zeigten weder bei der Knochenlänge noch bei anderen Parametern signifikant erhöhte Ergebnisse zu den Kontrollgruppen. Dieses steht im Gegensatz zu Studien von XIE et al. (1995), bei denen ein erhöhter Wachstumshormonspiegel nachgewiesen worden ist.

Das Hormon TSH (Thyroidea-stimulating-hormone) fördert den Knochenabbau durch eine Steigerung des Knochenturnovers und möglicherweise kam es zu einer Interaktion der Seltenen Erden mit TSH. BORGER (2003) und EISELE (2003) konnten signifikant erniedrigte Spiegel des TSH abhängigen Schilddrüsenhormons Trijodthyronin bei Ihren Studien feststellen.

Weitere Auswirkungen auf knochenprotektiv wirkende Hormone (Calcitonin, Androgene, Östrogene) der Seltenen Erden sind nicht bekannt. Ferner konnten HUTCHISON et al. (2004) keine Auswirkungen von Lanthancarboxylat auf den Parathormonspiegel feststellen.

## Pyridinolin und Desoxypyridinolin

Die Ausscheidung der Collagencrosslinks zum Zeitpunkt 0 war bei den ovariectomierten Tieren wesentlich höher, als bei der SHAM-Gruppe. Die durchschnittliche Konzentration der Pyridinolinausscheidung lag bei den ovariectomierten Tieren um 22% höher, während die Ausscheidung von Desoxypyridinolin um rund 59% erhöht war. Dies zeigt deutlich die Auswirkungen der Ovariectomie.

Um den Effekt der Ovariectomie, der auch bei den Resorptionsparametern vom langsamer werdenden Wachstum und damit der Abnahme der Ausscheidung im Urin überlagert ist, beurteilen zu können, stellt die Berechnung der Fläche unter der Kurve (AUC) eine geeignete Methode dar. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 5.7 dargestellt.

Zwischen der SHAM- und der OVX-Gruppe besteht ein signifikanter Unterschied in der Ausscheidung der Collagencrosslinks. Die OVX-Gruppe hatte im Durchschnitt eine 35% höhere Ausscheidung als SHAM.

Die erhöhte Ausscheidung ist durch den gesteigerten Knochenabbau infolge der Ovariectomie zu erklären. Infolgedessen war das Therapieziel eine Verringerung der Ausscheidung der Resorptionsparameter.

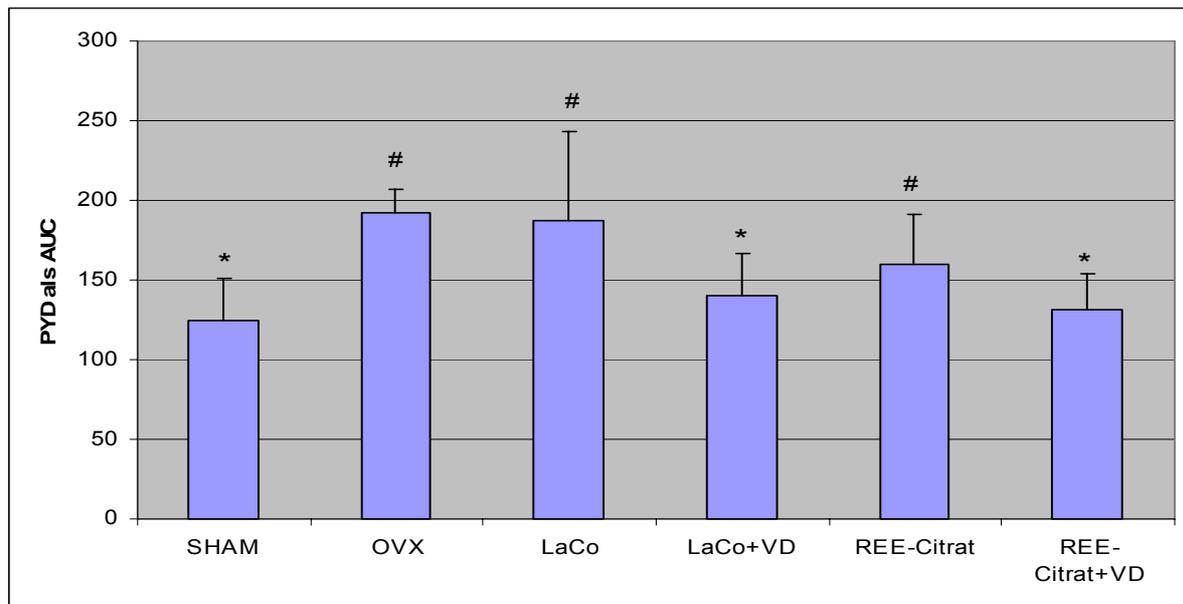
LaCo und REE-Citrat zeigten eine signifikant höhere Ausscheidung an Pyridinolin als die Positivkontrollgruppe SHAM. Gegenüber OVX zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Somit zeigten die Seltenen Erden bei den Gruppen LaCo und REE-Citrat nur einen geringen knochenprotektiven Einfluss in Bezug auf die Ausscheidung des Knochenresorptionsmarkers Pyridinolin, da es keine auffallenden Unterschiede zur unbehandelten OVX-Gruppe gab. Die REE-Citrat Gruppe wies zwar niedrigere Ausscheidungen an Pyridinolin als OVX und LaCo auf, jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant.

Anders gestaltete sich dies bei den Gruppen LaCo+VD und REE-Citrat+VD. Aufgrund der gemessenen Pyridinolinkonzentrationen konnte bei diesen Gruppen ein voller Therapieerfolg verzeichnet werden, da sie sich nicht signifikant von SHAM unterschieden, aber signifikant niedrigere Ausscheidung als OVX aufwiesen. Die REE-Citrat-Gruppe zeigte zwar ebenfalls niedrigere Ausscheidungen an Pyridinolin als OVX und LaCo, jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant.

Möglicherweise beeinflussten die Seltenen Erden den Intermediärstoffwechsels des Knochens, so dass es zu einer Hemmung der osteoklastischen Aktivität kam. Dieses ist beispielsweise über eine Hemmung von Interleukin I oder des RANKL-Rank- Rezeptor Systems möglich. Auch Osteopontin übernimmt wichtige Aufgaben, die für die Differenzierung und das Anlagern der Osteoklasten an die Knochenmatrix nötig sind. Bei Mäusen kam es durch den Ausfall von Interleukin I zu einer Verhinderung des Knochenabbaus (LEE et al. 2006).

Eine Hemmung der Knochenresorption kann ebenfalls über Osteoprotegerin und Wachstumsfaktoren, wie den Tumor Growth Factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), geschehen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Seltenen Erden zu einer Aktivierung der Osteoblasten und Hemmung der Osteoklasten geführt haben. Bei drei der vier Therapiegruppen zeigten die Seltenen Erden antiresorptive Effekte, die zu einer erhöhten Mineralisierung des Knochens und damit zu einer erhöhten Calciumkonzentration in der Knochenasche (siehe Kap. 5.4.3. „Der Knochenaschegehalt“) geführt haben.



(p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001) vs OVX  
 # (p < 0,05), ## (p < 0,01), ### (p < 0,001) vs SHAM

Abbildung 5.7: Collagencrosslinks PYD als AUC (MW±ST) der Therapie- und Kontrollgruppen (n=10 Tiere)

## Serumcalciumgehalt

Der Serumcalciumgehalt der SHAM- und OVX-Gruppe zeigte keine signifikanten Unterschiede. Allerdings wiesen alle Tiere aus den Therapiegruppen einen erhöhten Calciumspiegel gegenüber den beiden Kontrollgruppen auf, jedoch bestand zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied.

Bei den Gruppen LaCo und LaCo+VD zeigte der Serumcalciumgehalt zwar einen leichten Anstieg um 9,6% im Vergleich zu den Werten von SHAM und OVX, jedoch befanden sich alle Serumcalciumgehalte der Tiere aus den Therapiegruppen im physiologischen Referenzbereich der Ratte. Dieser ist von JOHNSON-DELANY (1996) mit einer Spannbreite von 1,7 bis 4,2 mmol/l angegeben.

Bei REE-Citrat und REE-Citrat+VD war der Serumcalciumgehalt um durchschnittlich 2,4% höher als bei SHAM und OVX.

Diese erhöhten Serumcalciumspiegel können ein Hinweis darauf sein, dass die Seltenen Erden in den Calciumstoffwechsel eingegriffen haben. Es kam aber bei keinem der Tiere aus den Therapiegruppen zu Hypercalcämien. Dieses ist gerade vor dem Hintergrund eines therapeutischen Einsatzes der Seltenen Erden besonders hervorzuheben.

## 5.4.2. Knochenlänge und das Knochengewicht

Der Knochen unterliegt zeitlebens Auf- und Abbauvorgängen, da er sich an die sich verändernden Bedingungen anpassen muss (FLEISCH, 1995). Die Körpergröße und das Körpergewicht beeinflussen die Knochenlänge und das Knochengewicht.

Die ovariectomierten Tiere zeigten ein höheres Körpergewicht und daher sind auch die höheren Werte bei den absoluten Knochenlängen und –gewichten zu erklären. Um diesem Zusammenhang Rechnung zu tragen und eine einheitliche Betrachtung der Ergebnisse zu ermöglichen, wurden die Parameter im Verhältnis zum Körpergewicht interpretiert, das heisst auf 100 g Körpergewicht bezogen.

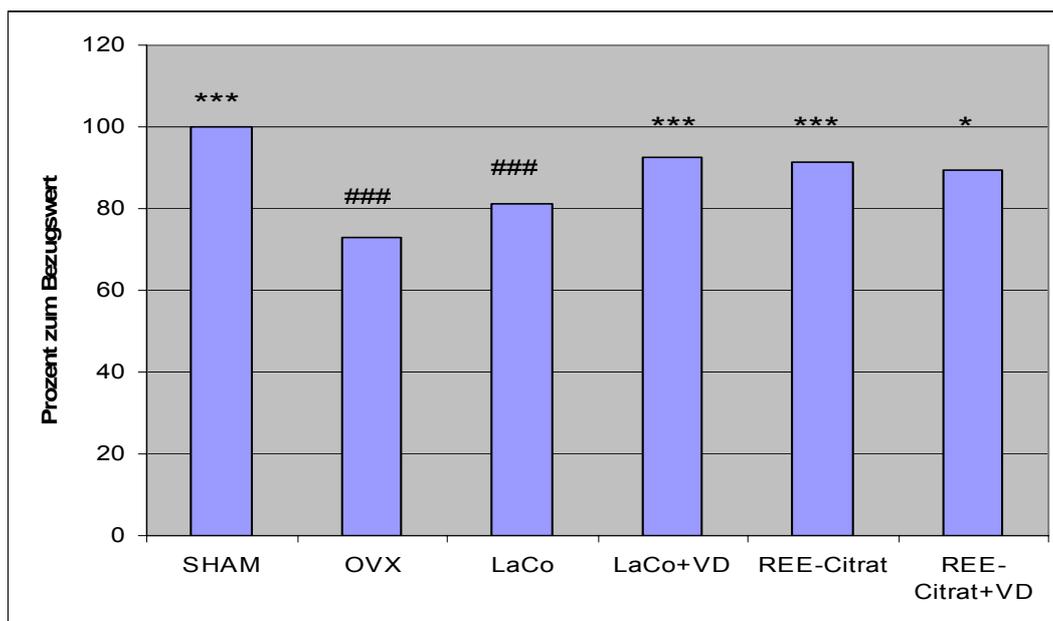
Somit spielen die absoluten Längen des Femurs und der Tibia eine untergeordnete Rolle. Die SHAM-Gruppe wies bei der relativen Knochenlänge hochsignifikant längere Femurknochen und Tibiae auf als die OVX-Gruppe. Dabei waren die Femurknochen um 12,8% und die Tibiae 12,7% länger als bei den Tieren der OVX-Gruppe. Auch alle Tiere aus den Therapiegruppen zeigten eine signifikant niedrigere relative Knochenlänge als SHAM. Im Vergleich zu OVX gab es keine signifikanten Unterschiede bei den Therapiegruppen.

Die Abbildung 5.8 zeigt das relative Knochengewicht der Femurknochen der Therapie- und Kontrollgruppen als Bezugswert in Prozent vs SHAM.

Das relative Knochengewicht von OVX war bei den Femurknochen und den Tibiae hochsignifikant niedriger als von SHAM. Auch LaCo hatte sowohl beim Femur, als auch bei der Tibia ein hochsignifikant niedrigeres Knochengewicht als SHAM und zeigte signifikante Unterschiede zu OVX. Anders gestaltet sich der Vergleich zwischen den Gruppen LaCo+VD, REE-Citrat und REE-Citrat+VD. Die ersten beiden genannten Gruppen konnten ein hochsignifikant höheres Gewicht der Femurknochen im Vergleich zu OVX aufweisen, während REE-Citrat ein signifikant höheres Gewicht zeigte. Keine der drei Gruppen hatte signifikante Unterschiede zu SHAM.

Bei den Tibiagewichten lagen alle Therapiegruppen hochsignifikant unter dem relativen Knochengewicht von SHAM.

Das höhere Knochengewicht der Femurknochen bei den Therapiegruppen LaCo+VD, REE-Citrat und REE-Citrat+VD könnte durch einen höheren Calcifizierungsgrad der Knochen im Vergleich zu OVX erklärt werden.



(p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001) vs OVX  
 # (p < 0,05), ## (p < 0,01), ### (p < 0,001) vs SHAM

Abbildung 5.8: Relatives Gewicht der Femurknochen (MW±ST) in Prozent der Therapie- und Kontrollgruppen (n=10 Tiere/Gruppe) gegen SHAM

### 5.4.3. Knochenaschegehalt

Beim Bezug der Knochenasche auf die US gab es keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Therapie- und Kontrollgruppen. Die Ovariectomie hat also zu keiner signifikanten Verringerung der Knochenasche geführt.

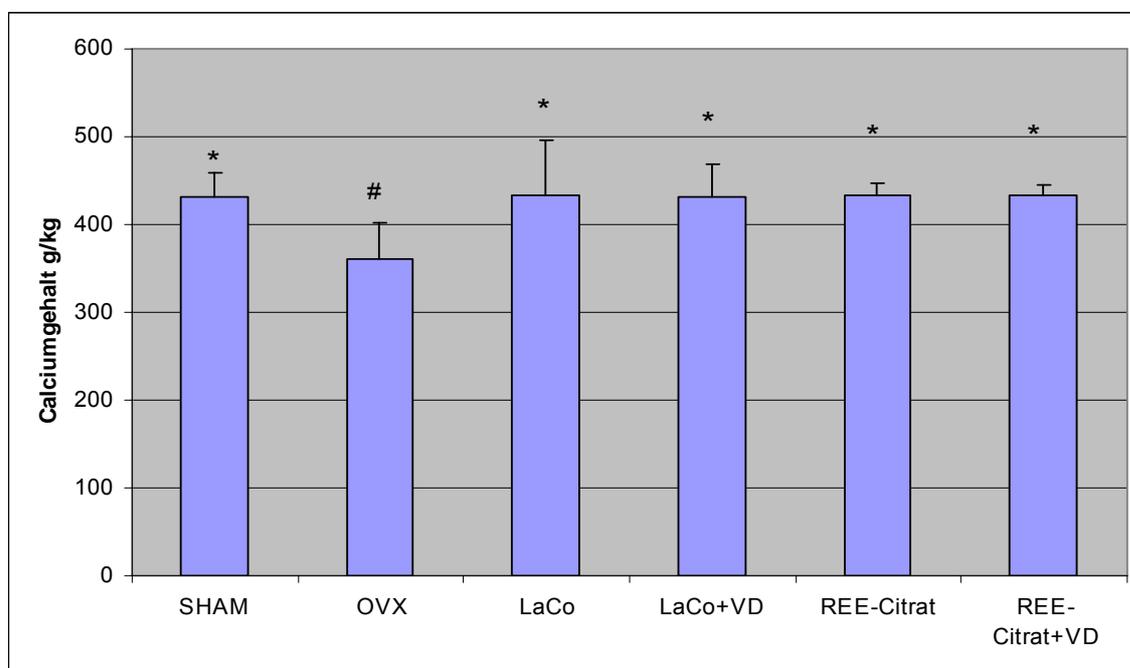
Dieses ist damit zu erklären, dass die kortikalen Anteile etwa 85 % der Knochenmasse ausmachen (BAGI et al., 2006) und so gut wie nicht von der Ovariectomie betroffen sind. Somit kommt es zu keinen signifikanten Unterschieden in der Gesamtheit der Knochenasche, obwohl eine Störung des trabekulären Knochenstoffwechsels induziert worden ist.

### Mineralstoffgehalte an Calcium, Phosphor und Magnesium der Tibiae

Der Calciumgehalt der Knochen war bei der SHAM-Gruppe signifikant höher als bei der OVX-Gruppe. Auch alle Therapiegruppen zeigten einen signifikant höheren Calciumgehalt der Knochen als OVX, während keine Unterschiede zwischen der nicht ovariektomierten SHAM-Gruppe und den Versuchgruppen vorhanden waren. Calcium bildet als Teil des Hydroxylapatits einen wichtigen Baustein der anorganischen Knochenmatrix und bei einer vermehrten Knochenresorption fällt auch die Calciumkonzentration des Knochens.

Da es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Positivkontrolle SHAM und den Therapiegruppen gab, und alle Tiere aus den Therapiegruppen eine signifikant höhere Calciumkonzentration in der Knochenasche aufwiesen als OVX, war dieser Parameter als klarer Therapieerfolg zu bewerten. Die Calciumeinlagerung in den Knochen wird vor allem über durch das in der Schilddrüse synthetisierte Calcitonin forciert, indem es die Osteoblasten aktiviert und die Osteoklasten hemmt (JEE, 1988; MARTIN, 1993). Aber die Auswirkungen der Supplementierung von Seltenen Erden auf den Calcitoninstoffwechsel sind allerdings nicht bekannt. Die Abbildung 5.9 zeigt den Calciumgehalt der Knochenasche der Therapie- und Kontrollgruppen.

Sowohl bei der Konzentration an Phosphor, als auch an Magnesium waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar.



\* (p <0,05), \*\* (p <0,01), \*\*\* (p <0,001) vs OVX

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

Abbildung 5.9: Calciumgehalt der Knochen (MW±SD) der rechten Tibia (g/kg) der Tiere aus den Therapie- und Kontrollgruppen (n=10 Tiere/Gruppe)

#### 5.4.4. Knochendichte

Bei Messung der Knochendichte der Tibia wurde die Gesamtdichte, die Trabekuläre Dichte und die Kortikale Dichte gemessen. Gemessen wurde die Region of Interest (ROI), die sich 12,5% der Gesamtlänge unterhalb des Tibiaplateaus befand.

Hier ist eine klare Unterscheidung in Trabekuläre und Kortikale Dichte möglich. Die Tiere der OVX-Gruppe hatten im Durchschnitt eine um 23% signifikant niedrigere Gesamtdichte der Tibia im Vergleich zu der Positivkontrolle SHAM. Der deutliche Verlust an Knochenmasse ist Folge der verringerten Östrogenspiegel im Zuge der Ovariectomie (ERIKSEN et al., 1990; KALU, 1991).

Bei der Gesamtdichte des Knochens zeigten REE-Citrat und REE-Citrat+VD keine signifikanten Unterschiede zu OVX. Die beiden Gruppen LaCo und LaCo+VD zeigten zwar keine signifikanten Unterschiede zu OVX, aber die Werte der Gesamtdichte waren um 10,3% beziehungsweise 6,3% höher als die der OVX-Gruppe und es gab keinen signifikanten Unterschied zu SHAM. Dieses deutet auf einen positiven Einfluss der Lanthancarbonatbehandlung auf den Knochenstoffwechsel der Tiere aus den Therapiegruppen hin.

Die Ratte besitzt einen relativ hohen Anteil kortikaler Struktur des Knochens, und da diese bei der Gesamtdichte Eingang in die Ergebnisse finden, stellt sie eventuell keinen sensitiven Parameter für die osteoporotischen Veränderungen des Knochens dar. Störungen des Knochenstoffwechsels manifestieren sich vor allem im trabekulären, stoffwechselaktiven Teil des Knochens (STRACKE, 1992). Aufgrund dessen verspricht dieser Parameter eine höhere Sensitivität im Hinblick auf die knochenprotektiven Eigenschaften der Seltenen Erden. Die Abbildung 5.10 zeigt die Trabekuläre Dichte der Therapie- und Kontrollgruppen als Bezugswert in Prozent vs SHAM. Bei der Trabekulären Dichte ließ sich bei den Gruppen REE-Citrat und REE-Citrat+VD eine hochsignifikante Steigerung und bei LaCo+VD eine signifikante Steigerung der Trabekulären Dichte gegenüber OVX darstellen. Die Gruppe LaCo zeigte keinen signifikanten Unterschied zu OVX. Jedoch erreichte die Knochendichte keiner Therapiegruppe die Werte der SHAM-Gruppe, sie lagen sogar noch signifikant niedriger.

Die Supplementierung der Seltenen Erden zeigte somit also in der von den osteoporotischen Veränderungen betroffenen Trabekulären Dichte einen positiven Effekt, der jedoch noch verbessert werden könnte. Es ist beispielsweise zu überlegen, ob die gewählte Dosierung nicht im Wirkoptimum der gewählten Substanzen lag.

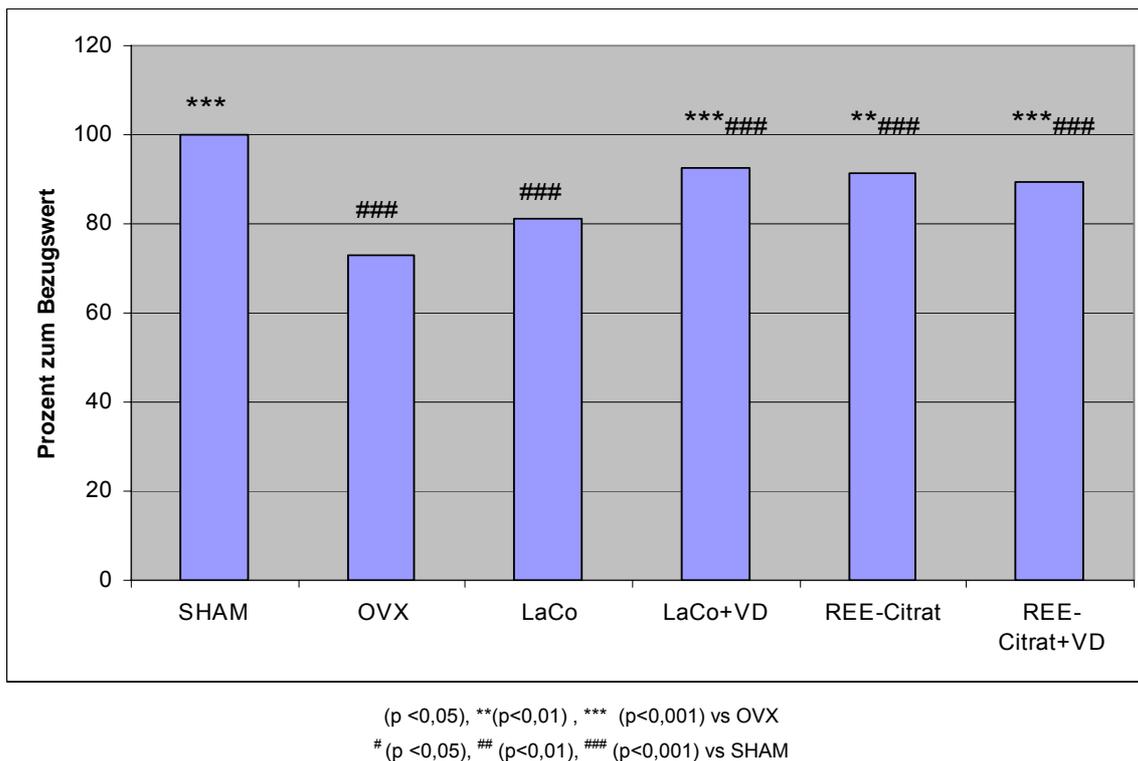


Abbildung 5.10: Trabekuläre Dichte der ROI (MW±SD) der Therapie- und Kontrollgruppen (n=10 Tiere/Gruppe) in Prozent vs. SHAM

## 6.1 Ausblick

Man könnte sich vorstellen, dass die eingesetzten Seltenen Erden eine sinnvolle Erweiterung der präventiven oder therapeutischen Behandlung der Postmenopausalen Osteoporose darstellen. In Kombination mit den etablierten Therapieansätzen könnte beispielsweise die Dosierung von Hormonanaloga herabgesetzt werden, da diese Präparate möglicherweise zu Brustkrebs oder anderen starken Nebenwirkungen führen können. Auch die eingesetzten Bisphosphonate weisen Nebenwirkungen auf, die zu einer niedrigen Compliance bei den Patienten führen, so dass auch hier eine Reduktion der Dosis durch die Verwendung der recht nebenwirkungsarmen Seltenen Erden sinnvoll erscheint.

Die genaue, dabei zu verwendende Dosierung, muss noch durch Folgeversuche im Anschluss an diese Studie untersucht werden.

## 7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde erstmals der knochenprotektive Effekt von Seltenen Erden im Osteoporosemodell der ovariectomierten Ratte untersucht. Bei den Seltenen Erden handelt es sich um 17 chemische Elemente, die zur dritten Nebengruppe des Periodensystems gehören.

Die Studie wurde als Fütterungsversuch an 60 weiblichen Wistar Han Ratten über einen Zeitraum von 6 Monaten durchgeführt. Die Versuchstiere wurden in eine scheinoperierte Postivkontrollgruppe (SHAM), eine ovariectomierte, aber nicht therapierte Negativkontrollgruppe (OVX) und in vier ovariectomierte Therapiegruppen eingeteilt. Von den vier Therapiegruppen erhielten zwei Gruppen reines Lanthancarboxylat (1740 mg/kg Futter) und zwei Gruppen eine Seltene-Erd-Citrat Mischung (8000 mg/kg Futter). Zudem wurde jeweils eine der beiden Wirkstoffgruppen mit zusätzlich 1500 I.E. Vitamin D supplementiert. Jede Gruppe umfasste 10 Tiere.

Als Parameter für die Knochenformation wurde Osteocalcin im Serum und als Parameter für die Knochenresorption wurden die Collagencrosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin im Urin bestimmt. Die Probenahme erfolgte dabei einmal pro Monat. Um die direkte Wirkung der Seltenen Erden auf den Knochen zu untersuchen, wurde post mortem die Knochenmasse, die Knochenlänge und der Knochenaschegehalt mit seinem Gehalt an Calcium, Phosphor und Magnesium bestimmt.

Die Dichte und Architektur des Knochens wurden mit Hilfe der Knochendichtemessung mittels Peripherer Quantitativer Computertomographie und Microcomputertomographie gemessen.

Um mögliche Veränderungen der Organe durch die Applikation der Seltenen Erden in der gewählten Dosierung beurteilen zu können, wurden post mortem die Organgewichte von den Kreislauforganen Herz und Lunge, sowie von den Stoffwechselorganen Niere und Leber bestimmt. Außerdem wurde die Calcium- und Phosphorkonzentration der Herzen und der Lebern bestimmt.

Die Ergebnisse der Studie zeigen bei den meisten gemessenen Parametern, dass die eingesetzten Seltenen Erden über einen knochenprotektiven Effekt verfügen. Ein zusätzlicher additiver Effekt von Vitamin D bestand dabei jedoch nicht. So konnte in jeder der Therapiegruppen der durch die Ovariectomie entgleiste Knochenstoffwechsel positiv beeinflusst werden. Ein antiresorptiver Effekt und eine Aktivierung der Osteoblasten konnten nachgewiesen werden. Dies führte desweiteren zu einer signifikanten Erhöhung des Calciumgehaltes der Knochenasche.

Darüberhinausgehend wurde auch die Knochendichte positiv beeinflusst.

Es kann also zusammenfassend festgestellt werden, dass die Seltenen Erden in dieser Studie knochenprotektive Eigenschaften gezeigt haben. Somit ist zu überlegen, ob Seltene Erden eine Alternative zu den bisher eingesetzten Prophylaktika und Therapeutika in der Osteoporose darstellen könnten.

## 8 Summary

Alexander Feldhaus

### Rare earth elements restore accelerated bone loss in a small animal model of postmenopausal osteoporosis

The objective of the present study was to evaluate bone protecting effects of rare earth elements on ovariectomized rats which were used as a model of postmenopausal osteoporosis. Rare earths comprise 17 chemical elements, which belong to the group III A and B of the periodic table.

The investigation was performed as a feeding experiment on sixty female Wistar Han rats over a period of six months. The experimental animals were thereby allotted to a positive control sham (SHAM) (positive control), one ovariectomized non treated group (OVX) (negative control) and four ovariectomized treatment groups. Among the treatment groups, two out of four were supplemented with pure lanthan carbonate (1740mg/kg food) while the other two groups received a diet, which contained a mixture of rare earth citrates (8000mg/kg food). In addition, 1500 I.U. Vitamin D were applied to one out of each active agent group. Each experimental group comprised ten animals.

The concentration of osteocalcin, a bone formation marker, was measured in the blood serum while pyridinolin and desoxypyridinolin contents were determined in the urine in order to assess bone resorption. Urin and blood samples were taken once a month. To evaluate the immediate effect of the rare earths on bone mass, on bone length and on content of bone ash, including calcium, phosphorus and magnesium, were determined. The density of bone as well as its architecture was also determined by peripheral quantitative computed tomography and microcomputed tomography as to analyse the effect of rare earths on the bone structure. Furthermore, the weight of the heart and the lung as representatives of organs of circulation, and the weight of the kidney and the liver representing metabolically active organs were quantified to assess whether rare earth application at given concentrations has any impact on these organs. Additionally, the contents of calcium and phosphorus in heart and liver tissue were determined.

With respect to the measured parameters, this study was able to show that rare earths have bone protecting effects, yet no additional effects were noticed due to Vitamin D application. Thus, it was shown that changes in bone metabolism, which followed ovariectomy could be

influenced positively by rare earths. Both antiresorptive effects and an activation of the osteoblasts was detected which led to a significant increase of calcium in the bone ash. Moreover, rare earths had positive effects on bone density.

Based on the results obtained in this study it can be concluded that rare earths have bone protecting effects. Hence, rare earths might be of interest in therapy and prophylaxis of postmenopausal osteoporosis in human medicine as alternative of currently used agents.

## Literatur

ABBIATI, G., BARTUCCI, F., LONGONI, A., FINCATO, G., GALIMBERT, I, S., RIGOLD, I. M. und CASTIGLIONI, C. (1993)

Monitoring of free and total urinary pyridinoline and deoxypyridinoline in healthy volunteers: sample relationships between 24-h and fasting early morning urine concentrations  
Bone Miner 21(1): 9–19

ALBRIGHT, F., BLOOMBERG, E., SMITH, P. H. (1940)

Postmenopausal Osteoporosis  
Trans Assoc Am Phys 55: 29-305

ALLEN, M. J., HOFFMANN, W. E., RICHARDSON, D. C. and BREUER, G. J. (1998)

Serum markers of bone metabolism in dogs  
Am J Vet Res 59: 250-254

APFELBOOM, T. und BODY J. J. (1993)

The antiquity of Osteoporosis: More questions than answers  
Calcif Tissue Int 53: 367-369

ARVELA, P. (1977)

Toxicity of Rare-Earths  
Prog Pharmacol 2(3): 69-73

BAGI, C. M., HANSON, N., ANDRESEN, C., PERO, R., LARIVIERE, TURNER, C. H., LAIB, A. (2006)

The use of micro-CT to evaluate cortical bone geometry and strength in nude rats: Correlation with mechanical testing, pQCT and DEXA  
Bone 38: 136-144

BEHETS, G. J., DAMS, G., DAMMENT, S., D'HAESE, P. C., DE BROE, M. E. (2001)

An Assesment of the Effects of Lanthanum on Bone in a chronic Renal Failure Rat Model  
J Am Soc Nephrol, 12: 740

BEHETS, G. J., VERBERCKMOES, S. C., D'HAESE, P. C. und DE BROE, M. E. (2004)

Lanthanum carbonate: a new phosphate binder  
Curr Opin Nephrol Hypertens, 13: 403–409

BELLINO, F. L. (1999)

Nonprimate animal model of menopause: Workshopreport  
Menopause 7: 14-24

BIRNBAUM, E. R., GOMEZ, J. E., DARNALL, W. (1970)

Rare earth metal ions as probes of electrstatic binding sites in proteins  
J Am Chem Soc, 92: 5287-5288

BIRNER, H. (1995)

Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels bei der Ratte und beim Menschen  
Vitamine als Prophylaxe im Osteoporose-Modell Ratte  
Vet Med Diss, Ludwig Maximilians Universität München

BLACK, D., DUNCAN, A. und ROBINS, S. P. (1988)

Quantitative analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in the urin using ion-paired  
reversed-phase high-performance liquid chromatography  
Anal Biochem 169: 197-203

BLAIR, H. C., ROBINSON, L. J., ZAID, M. (2005)

Osteoclast signalling pathways  
BBRC: 328: 728-738

BLUME (2001)

Blume, R.:

Das Vorkommen der Lanthanoide

<http://www.chemieunterricht.de/dc2/lanthan/vorkomm.htm>

BÖHME, H., FLECKENSTEIN, J., HU, Z., und SCHNUG, E. (2002)

Bilanzversuche zum Einsatz von Seltenen Erden in der Schweinemast  
114. VDLUFA Kongress Ressourcen und Produktsicherheit-Qualitätssicherung in der  
Landwirtschaft, 16. - 20. September 2002, Leipzig: 261-264

BONE, H. (2002)

US Guidance for the development of drugs for osteoporosis: rationale, duarability and  
evolution

Endocrinologic & Metabolic Drugs Advisory Commitee

BORGER, C. (2003)

Alternative Methoden in der Schweinemast. Untersuchungen zum leistungssteigernden Potential Seltener Erden und zur Jodanreicherung im Gewebe durch die Verfütterung von Meeresalgen

Vet Med Diss, Ludwig Maximilians Universität München

BRADSHAW, A. D., SAGE, E. H. (2001)

SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissues response to injury

J Clin Invest 107: 1049-1054

BRIOT, K. and ROUX, C. (2005)

Les markers biochimiques du remodelage osseux

Gynécologie Obstétrique & Fertilité

BROWN, P. H., RATHJEN, A. H., GRAHAM, R. D., TRIBE, D. E. (1990)

Rare earth elements in biological systems

In: Gschneidner, JR. K.A., Eyring, L.(Eds): Handbook on the physics and chemistry of rare earth elements 13, Amsterdam: Elsevier, 423-453

BROWNING, E. (1969)

Toxicity of industrial Metals

Butterworths, London

BULMAN, R. A. (2003)

Metabolism and Toxicity of the Lanthanides

In: Sigel, A., Sigel, H. (Eds.), The Lanthanides and their interrelations with biosystems 40, Marcel Dekker, New York, 683 - 706

BYL, S. (1983)

La vieillesse dans le corpus Hippocratique

In: Formes de pensée dans la collection hippocratique ( eds.: Lasserre F., Mudry P.)

Acts du IV eme colloque international hippocratique (Lausanne, 21-26 septembre 1981),

Geneve: 85-95

- CALVO, M. S., EYRE, D. R., GUNDBERG, C. M. (1996)  
Molecular basis and application of biological markers of bone turnover  
Endocr Rev 17: 333-368
- CHANG, J., ZHU, W., ZHANG, L., XIONG, J., ZHANG, J., HU, Z. (1998)  
Study on environmental effects of rare earth elements  
2<sup>nd</sup> International Symposium on Trace Elements and Food Chain, 15.-17. November 1998,  
Wuhan, China: 24
- CHEN, H., F. (1997)  
Influence of rare earth compounds on the growth of pigs  
Journal of the Chinese Rare Earth Society 15: 441–443
- CHINA RARE EARTH INFORMATION (1988)  
Batou research Institute of rare earth elements 8:4
- CLARENZ, P., DÖREN, M., FISCHER, M., FRANCK, H., FRANCKE, J., KECK, E., KRUSE,  
H. P., SCHMIDT-GAYK, H., SEIBEL, M. und WERNER, E. (1996)  
Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Osteologie  
Osteologie 5(3): 162-173
- COBAYASHI, F., LOPES, L., A., TADDEI, J. A. (2005)  
Bone mineral density in overweight and obese adolescents  
J Pediatr 81(4): 337-342
- COHN, B. (1925)  
Erfahrungen mit Introcid bei der Palliativbehandlung inoperabler Karzinome  
Dtsch Med Wochenschr 51: 184-1986
- COLFORD, J. W. und LUEDDECKE, B. A. (1999)  
Immunoradiometric assay for intact human osteocalcin (1-49) without cross reactivity to  
breakdown products  
Clin Chem 45: 526-531
- COLLWELL, A., EASTELL, R., ASSIRI, A. M. A., RUSSEL, R. G. G. (1990)  
Effect of diet on desoxypyridinoline excretion  
In: Osteoporosis 1990 (eds. Christiansen C., Overgaard K.)  
Osteopress APS, Copenhagen: 590-591

COLLWELL, A., RUSSEL R. G. G. und EASTELL R. (1993)

Factors affecting the assay of urinary 3-hydroxypyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption

Europ J Clin Invest 23(6): 341-349

COLMAN, E. (2002)

FDA's Osteoporosis Guidance

Endocrinologic & Metabolic Drugs Advisory Committee

COTTON, F. A. und WILKINSON, G. (1966)

Advanced inorganic chemistry

Interscience Publishers, J.Wiley & Sons (Eds.)

DAS, T., SHARMA, A., TALKUDER, G. (1988)

Effects of Lanthanum in cellular Systems

Biol Trace Elem Res18: 201-228

DAVIDSON, M. K., LINDSAY, J. R., DAVIS, J. K. (1987)

Requirement and selection of an animal model

Isr J Med Sci 23: 551-555

DE FRANCO, D. J., LIAN, J. B., GLOWACKI, J. (1992)

Differential effects of glucocorticoids on recruitment and activity of osteoclasts induced by normal and osteocalcin

Endocrinology 131: 114-121

DE LA LOGE, C., SULLIVAN, K., PINKNEY, R., MARQUIS, P., ROUX, C., MEUNIER, P. J. (2005)

Cross-cultural validation and analysis of responsiveness of the QUALILOST®: Quality of Life questionnaire in Osteoporosis

Health Qual Life Outcomes 3: 69

DELANY, A. M., AMLING, M., PRIEMEL, M., HOWE, C., BARON, R., CANALIS, E. (2003)

Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-null mice

J Clin Invest 105: 915-923

DELMAS, P. D., SCHLEMMER, A., GINETYS, E., RIIS, B. und CHRISTIANSEN, C. (1991)  
Urinary excretion of pyridinoline crosslinks correlates with bone turnover measured on iliac crest biopsy in patients with vertebral osteoporosis

J Bone Miner Res, 6:639–644

DEL POZO, E., LIPPUNER, K., RUCH, W., CASEZ, J. P., PAYNE, T., MACKENZIE, A.,  
JAEGER, P. (1995)

Different effects of cyclosporin A on Bone Remodeling in young and adult rats

Bone 16: 271-275

D'HAESE, P. D., SPASOVSKI, G. B., SIKOLE, A., HUTCHISON, A., FREEMONT, T. J.,  
SULKOVA, S., SWANPOEL, C., PEJANOVIC, S., DJUKANOVIC, L., BALDUCCI, A., COEN,  
G., SULOWICZ, C., FERREIRA, A., TORRES, A., CURIC, S., POPOVIC, M., DIMKOVIC, N.  
(2003)

A multicenter study on the effects of lanthanum carbonate (Fosrenol™) and calcium carbonate on renal bone disease in dialysis patients

Kidney International 63:73–78

DIATLOFF, E., ASHER, C., J. und SMITH, F., W. (1996)

Concentrations of rare earth elements in some Australian soils

Australian J Soil Res 34: 735–747

DINARELLO, C. (1994)

The biological properties of interleukin-1

Eur Cytokine Netw 5: 517–31

DUCY, P., DESBOIS, C. H., BOYCE, B., PINERO, G., STORY, B., DUNSTAN, C. S, E.,  
BONANDIO, J., GOLDSTEIN, S., GUNDBERG, C., BRADLEY, A., KARSENTY,  
G. (1996)

Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice

Nature 382: 448-452

DURBIN, P. W., WILLIAMS, M. H., GEE, M., NEWMAN, R. H. und HAMILTON, J. G. (1956)  
Metabolism of the lanthanons in the rat. Proceedings of the Society for Experimental Biology  
and Medicine

Proc Soc Exp Biol Med 91: 78–85

EAPEN, J.T., KARTHA, C.C., RATHINAM, K., VALIATHAN, M. S. (1996)

Levels of Cerium in the tissues of rats fed a magnesium-restricted and cerium adulterated diet

Bull Environ Contam Toxicol 56: 178-182

ECKSTEIN, F., WEUSTEN, A., SCHMIDT, C., WEHR, U., WANKE, R., RAMBECK, W. A., WOLF, E., SUBBURAMAN, M. (2004)

Longitudinal in vivo effects of growth hormone overexpression on bone in transgenic mice

J Bone Miner Res 19: 802-810

EISELE, N. (2003)

Untersuchungen zum Einsatz Seltener Erden als Leistungsförderer beim Schwein

Vet Med Diss, Ludwig Maximilians Universität München

ENGLER, H. und RIESEN, W. (1995)

Pyridinium-Crosslinks: Sind die Resultate der freien PYD-, DPD-Bestimmungen als Knochen-Resorptionsmarker vergleichbar zu denjenigen der Gesamt-PYD-, DPD-Konzentration ?

Clin Lab 41: 893–895

ERIKSEN, E. F., HODGSON, S. F., EASTELL, R., CEDELS, L., O'FALLON, W.M. und RIGGS, B. L. (1990)

Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels

J Bone Miner Res 5: 311–319

EVANS, C. H. (1983)

Interesting and useful biochemical properties of lanthanides

Trends in Biochemical Sciences 8(12): 445 – 449

EVANS, C. H. (1990)

Biochemistry of the lanthanides

Plenum Press, New York and London

FERRETTI, J. L., CAPOZZA, R. F., ZANCHETTA, J. R. (1996)

Mechanical Validation of a tomographic (pQCT) Index for non-invasive Estimation of Rat Femur Bending Strength

Bone 18, (2): 97-102

FERRETTI, J. L. (1998)

Peripheral quantitative computed tomography (pQCT) for evaluating structural and mechanical properties of small bone

AN YH, Draughan RA (eds.): A practical Guide for Mechanical Testing of Bone. CRC Press, Boca Raton

FLECKENSTEIN, J., HALLE, I., HU, Z. Y., FLACHOWSKY, G., SCHNUG, E. (2004)

Analyse von Lanthaniden mittels ICP - MS in Futter- und Organproben im Broilermastversuch

22. Arbeitstagung Mengen und Spurenelemente, Jena, 2004

FLEISCH, H. (1995)

Structure and function of bone: An overview

P. Delmas, Lyon: 1-3

FOURNIER, B., GINETYS, E. und DELMAS, P. D. (1989)

Evidence that free gamma carboxyglutamic acid circulates in serum

Clin Chim Acta 182: 173–182

FÖRSTER, D., BERK, A., HOPPEN, H. O., RAMBECK, W. A. (2006)

Effect of rare earth elements (REE) on the performance and thyroid hormone status of rearing piglets

Proceedings of the Society of Nutrition Physiology, 21. - 23. März, Göttingen:15

FREEMONT, A. J. (1989)

Histology of mineralized tissues

Calcified tissue (ed.: HUKINS D W.L.), Macmillan, London

FROST, H. M. (1983)

Bone histomorphometry: Choice of marking agent and labeling schedule. Recker R.R., ed.,

Bone histomorphometry: Techniques and interpretation

CRC Press, Boca Raton: 37-52

FWAZI, A. B., MCNEILL, J. H. (1985)

Effect of Lanthanum on the ionotropic response of isoproterenol: role of the superficially bound calcium

Can J Physiol Pharmacol 63: 1106-1112

GARNEO, P., SHIH, W. J., GINEYTS, E., KARP, F. D. B. and DELMAS, P. D. (1994)

Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic woman in response to alendronate treatment

J Clin Endocrinol Metab 79: 1693-1700

GASSER, J. A. (1995)

Assessing bone quantity by pQCT

Bone 17: 145-154

GEBERT, S., CALETKA-FRITZ, A., WENK, C. (2005)

Rare earth elements as alternative growth promoters for pigs

Vitamins and Additives in the Nutrition of Man and Animals 28

GEHORN-ROBEY, P. (1995)

Biochemistry of bone

L. Riggs I. L. J. Melton, ed., Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management, 2nd edition edition, 41–66. Lippincott-Raven, Philadelphia

GERRITS, M. I., THIJSSSEN, J. H. und van RIJN, H. J. (1995)

Determination of pyridinoline and deoxypyridinoline in urine, with special attention to retaining their stability

Clin Chem 41(4): 571–574

GIRASOLE, G., JILKA, R., L., PASSERI, G., BOSWELL, S., BODER, G., WILLIAMS, D., C. and MANOLAGAS, S. C. (1992)

17  $\beta$  Estradiol inhibits interleukin-6 production by a bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: potential mechanism of the antiosteoporotic effect of estrogens

J Clin Invest 89: 883-91

GOWIN, W. und FELSENBURG, D. (1996)

Methods in osteodensitometry

Schönau E., ed., Paediatric Osteology. New Developments in Diagnostics and Therapy, 73–81. Elsevier Science BV, Amsterdam

GRAVALLESE, E. M. (2003)

Osteopontin: a bridge between bone and immune system

J. Clin Invest 112: 147-149

GREISBERG, J. K., WOLF, J. M., WYMAN, J., ZOU, L. und TEREK, R. M. (2001)

Gadolinium inhibits thymidine incorporation and induces apoptosis in chondrocytes.

J Orth Res, 19: 797– 801

GSCHEIDNER, K. A. (1978)

Handbook on the physics and chemistry of rare earths

Eyring, L.R., Gschneidner, K.A.:jr. (Eds.)

Amsterdam, North Holland Publ. Co., 1978

GUNDBERG, C. M., MARKOWITZ, M. E., MIZRUCHI, M. und ROSEN, J. F. (1985)

Osteocalcin in human serum: A circadian rhythm

J Clin Endocrinol Metab 60: 736

HALEY, T. J. (1979)

Toxicity

Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths K.A. Gschneider und L.R.

Eyring (Eds.), 4, Amsterdam, Niederlande, 553-585

HALEY, T. J. (1985)

Toxicity of Rare-Earths

In: Xu, G., Xiao, J. (Hrsg): New frontiers in rare earth science and applications, Proceeding of the international conference on rare earth development and applications

HALLE, I., FLECKENSTEIN, J., HU, Z., FLACHOWSKY, G. und SCHNUG, E. (2002)

Untersuchungen zum Einsatz von Seltenen Erden auf das Wachstum und die Schlachtleistung von Broilern

114. VDLUFA Congress Ressourcen und Produktsicherheit-Qualitätssicherung in der Landwirtschaft, 16. - 20. September 2002, Leipzig

HE, M. L und RAMBECK, W. A. (2000)

Rare earth elements - a new generation of growth promoters for pigs?

Arch Tierernähr 53(4): 323–334

HE, M. L., RANZ, D. und RAMBECK, W. A. (2001)

Study on performance enhancing effect of rare earth elements in growing and fattening pigs  
J Anim Physio Anim Nutr 85: 263–270

HE, M. L., WANG, Y. Z., XU, Z. R., CHEN, M. L., RAMBECK, W. A. (2003)

Effect of dietary rare earth elements on growth performance and blood parameters of rats  
J Anim Physiol Anim Nutr 87: 229-235

HE, M. L., WEHR, U., RAMBECK, W. A. (2006)

Oral administration of a low dose of rare earth elements improved the performance of broilers

J Anim Physio Anim Nutr: submitted

HEERSCHE, J. N., REIMERS, S. S., WRANA, J. L., WAYE, M. M., GUPTA, A. K. (1992)

Changes in expression of alpha 1 type collagen and osteocalcin mRNA in osteoblasts and odontoblasts at different stages of maturity as shown by in situ hybridization

Proc Finn Dent Soc 88: 173-182

HENDERSON, P. (1984)

The rare earth Geochemistry

Elsevier, Amsterdam, 1984

HENKE, J. (2005)

Persönliche Mitteilung

HEUCK, C., SKJAREBECK, C., WOLTHERS, O. D. (1998)

Diurnal rhythm of serum osteocalcin in normal children

Acta Paediat 87: 930-932

HOBBER, R. und SPÄTH, R. A: (1914)

Über den Einfluss Seltener Erden auf die Kontraktibilität des Muskels

Archiv für die Gesamte Physiology, 159: 914 – 932

HOFBAUER, L., KHOSLA, S., DUNSTAN, C. R., LACEY, D. L., BOYLE, W. J., RIGGS, B. L. (2000)

The role of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption

J Bone Miner Res 15: 2-12

HOLLOWAY, L., BUTTERFIELD, G., HINTZ, R. L., GESUNDHEIT, N. und MARCUS, R. (1994)

Effects of recombinant human growth hormone on metabolic indices, body composition, and bone turnover in healthy elderly women

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 79: 470-479

HORI, M., UZAWA, T., MORITA, K., NODA, T., TAKAHASHI, H., INOUE, J. (1988)

Effect on human parathyroid hormone (PTH (1-34)) on experimental osteopenia of rats induced by ovariectomy

J Bone Miner Res 3: 193-199

HU, Z., WANG, J., YANG, Y. und MA, Y. (1999)

Effect of REE on the nutrients digestibility for growing pigs

Feed World 11: 29-31

HUBBARD, W. K. (2004)

Draft guidance for industry on the preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis; Request for comments

Food and Drug Administration ( Docket No. 2004D-0035)

HUGHES, D. E., DAI, A., TIFFE, J. C., LIH, H., MUNDY, G. R. und BOYCE, B. F. (1996)

Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- $\beta$

Nat Med 2: 1132-1136.

HUNTER, R. B. and WALKER, W. (1956)

Anticoagulant action of neodymium 3-sulfo-isonicotinate

Nature 178: 47.

HUTCHISON, A. J., SPEAKE, M., AL-BAAJ, F. (2004)

Reducing high phosphate levels in patients with chronic renal failure undergoing dialysis: a 4-week, dose finding, open label study with lanthanum carbonate

Nephrol Dial Transplant 19: 1902-1907

INABA, M. (2006)

Bone metabolic marker; recent progress

Clin Calcium 16(1): 74-80

JAFFE, M. (1886)

Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins

Hoppe Seylers Z Physiol Chem 10(7): 391–400.

JAKUPEC, M., A., ARION, V., BERGER, W., WILD, S., ZORBAS, H. und KEPPLER, B. K. (2002)

Novel antineoplastic complexes of bismuth (iii), cerium (iii) and lanthanum (iii)

Eur J Cancer 38: 125

JEE, W.S.S. (1988)

The skeletal tissues

Cell and tissue biology. Textbook of histology, 6<sup>th</sup> edition (ed.:WEISS L.), Urban & Schwarzenberg, Baltimore, Munich: 212-254

JEREON, A., VAN AUDEKERCKE, R., TALALAJ, M., GEUSENS, P., BRAMM, E., DEQUEKER J. (1996)

Effects of 1 $\alpha$ -Vitamin D<sub>3</sub> and estrogen therapy on cortical bone mechanical properties in the ovariectomized rat model

Endocrinologie 137: 1358-1364

JI, Y. (1985)

Toxicological study on safety evaluation of rare earth elements used in agriculture

In: Xu, G., Xiao, J. (Hrsg.): New frontiers in rare earth science and application; Proceedings of the international conference on rare earth development and application

JIANHUA, X., ZHONGSHENG, X., ZHENQUAN, W. (1988)

Studies on the effects of rare –earth compound added to diets of guangxi local broiler chickens

College of Anim Sci and Technol, Guagxi Univ., Nanning 530005, P.R China

JILKA, R. L., HANGOC, G., GIRASOLE, G., PASSERI, G., WILLIAMS, D. C., ABRAMS, J. S., BOYCE, B., BROXMEYER, H., MANOLAGAS, S. C. (1992)

Increased osteoclast development after estrogen loss-Mediation by interleukin 6  
Science 257: 88-91

JIMI, I., E., AKIYAMA, S., TSEUUKAI, T., OKHASHI, N., KOBAYASHI, K., UDAGAWA, N. et al. (1999)

Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function

J Immunol163: 434-42

JOHNSON-DELANY, C. (1996)

Comparison Medicine Handbook for Veterinarians

Aus: Krankheiten der Heimtiere, & Auflage (2005), H. Gabrisch, P. Zwaart, (Hrsg. M. Fehr, L. Sassenburg, P. Zwaart), Schlütersche

JOY, M. S., und FINN, W. F. (2003)

Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Titration, Phase III Study Assessing the Efficacy and Tolerability of Lanthanum Carbonate: A New Phosphat Binder for The Treatment of Hyperphosphatemia

Am J Kidney Dis 42: 96-107

KALU, D. N. (1991)

The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss

Bone Miner 15: 175-192

KALU, D. N., LIU, C. C., HARDIN, R. R., HOLLIS, B. W. (1989)

The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss

Endocrinology 124: 7-16

KAMEDA, T., MANO, H., YUASA, T., MORI, Y., MIYAZAWA, K., SHIOKAWA, M., NAKAMARU, Y., HIROI, E., HIURA, K., KAMEDA, A., YANG, N. N., HAKEDA, Y., KUMEGAWA, M. (1997)

Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts

Rockefeller Univ Press 186: 489-495

KARTHA, C.C., EAPEN, J. T., RADHAKUMARY, C., KUTTY, V. R., RAMANI, K., LAL, A. V. (1998)

Pattern of cardiac fibrosis in rabbits periodically fed a magnesium-restricted diet and administered rare earth chlorid drinking water

Biol Trace Elem Res, 63: 19-30

KESSLER, J. (2004)

Lanthanoide - Wachstumsförderer mit Zukunft

Schweinehaltung 255: 22. - 23.Juni 2004, Sursee/Oberkirch, Schweiz

KIM, J. G., LIM, K. S., KU, S. Y., KIM, S. H., CHO, I. Y., M., MOON, S. Y. (2006)

Relations between interleukin-1, its receptor antagonist gene polymorphism, and bone mineral density in postmenopausal Korean women

J Bone Miner Metab 24: 53-57

KIMBLE, R., SRIVASTAYA, S., ROSS, F. P., MATAYOSHI, A., PACIFICI, R. (1996)

Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production

J Biol Chem 271: 28890-28897

KLAUSHOFER, K., HOFFMAN, O., GLEISPACH, H., CZERWENKA, E., KOLLER, K., PETERLIK, M. (1989)

Bone-resorbing activity of thyroid hormones is related to prostaglandin production in cultured neonatal mouse calvaria

J Bone Miner Res 4: 1436-1440

KNEBEL, C. (2004)

Untersuchungen zum Einfluss Seltener Erd-Citrate auf Leistungsparameter beim Schwein und die ruminale Fermentation im künstlichen Pansen (RUSITEC)

Vet Med Diss, Ludwig Maximilians Universität München

KRAATZ, M., TARAZ, D., MÄNNER, K., SIMON, O. (2004)

Eine Untersuchung zur Wirksamkeit Seltener Erden bei Ferkeln.

8. Tagung Schweine und Geflügelernährung, 23. - 25. November 2004 am Institut für Ernährungswissenschaften, Halle, Germany

KRAENZLIN, M. E. (1995)

Sinnvolle Osteoporose-Diagnostik in der Praxis

M.J.SEIBEL M.E.K., ed., Osteoporose: Moderne Diagnostik-therapeutische Konsequenzen für Klinik und Praxis, 26. Karger, Freiburg-Basel

KRAMMER, S. J. M. (2001)

Das Osteoporosemodell Ratte: Einfluss von Phytoöstrogenen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren sowie Vitamin D und K

Vet Med Diss, Ludwig Maximilians Universität München

KUO, P. L., HUANG, Y. T., CHANG, C. H., and CHANG, J. K (2006)

Bone Morphogenetic Protein-2 and – 4 (BMP-2 and-4) mediates Fraxetin-Induced maturation and differentiation in human osteoblast-Like cell lines

Biol Pharm Bull 29: 119-124

KYKER, G. C., CRESS, E. A., SIVARAMAKRISHNAN, V. M., STEFFEE, C. H., STEWART, M. (1957)

Fatty infiltration due to rare earths

Fed Proc 16: 207

LANG, M., SEIBEL, M. J, ZIPF, A. und ZIEGLER, R. (1996)

Einfluss eines neuen Proteolysehemmers auf die Haltbarkeit von Osteocalcin im Serum.

Clin Lab 42: 5–10

LEE, S. K., GARDNER, A. E., KALINOWSKI, J. F., JASTRZEBSKI S. L., LORENZO, J. A. (2006)

RANKL-stimulated osteoclast-like cell formation in vitro is partially dependent on endogenous interleukin-1 production

Bone 38: 678-685

LENSING, A. (1998)

Eine Pilotsudie zum Einfluss der Fütterung auf Knochenmarker beim Pferd

Vet Med Diss, Ludwig Maximilians Universität München

LEPAGE, O. M., CARSTANJEN, B. und UEBELHART, D. (2001)

Non-invasive assessment of equine bone: an update

Vet J 161: 10–23

LEWIN, C. (1924)

Über die Verwendung einer Cerium-Jodverbindung (introcid) in der Therapie der Geschwulstbildung

Med Klin, 20: 1319-1323.

LEY, C. J., LEES; B. und STEVENSON, J. C. (1992)

Sex- and menopause-associated changes in bodyfat distribution

Am J Clin Nutr 55(5): 950 – 954

LIAN, J. B. und FRIEDMAN P. A. (1978)

The vitamin K-dependent synthesis of gamma-carboxyglutamic acid by microsomes

J Biol Chem 253: 6623–6626

LI, C. Y., JEE, S. S., CHEN, J. L., MO, A., SETTERBERG, B., S. U. M., TIAN, X. Y., LING, Y. F., YAO, W. (2001)

Estrogen and “exercise” have synergistic effect in preventing bone loss in the lumbar vertebra and femoral neck of the ovariectomized rat

Calcif Tissue Int 72: 42-49

LI, D., SHE, W., GONG, L., YANG, W., YANG, S. (1992)

Effects of rare earth elements on the growth and nitrogen balance of growing pigs.

Feed BoLan 4: 3–4

LINDBERG, M. K., SVENSSON, J., VENKEN, K., CHAVOSHI, T., ANDERSSON, N., MOVERAR, E., SKRITC, S., ISAKSSON, O., VANDERSCHUEREN, D., CARLSTEN, H., OHLSSON, C. (2006)

Liver-derived IGF-I is permissied for ovariectomy-induced trabecular bone loss

Bone 38: 85-92

LINDGREN J. U. und LINDHOLM T. S. (1979)

Effect of 1-alpha-hydroxyvitamin D3 on osteoporosis in rats induced by oophorectomy

Calcif Tissue Int 27(2): 161–164

LINDSAY, R. (1995)

Estrogen deficiency

L. Riggs I. L. J. Melton, ed., Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management, 2nd edition, 133–160 Lippincott-Raven, Philadelphia

LINDSAY, R. (1988)

Sex steroids in the pathogenesis and prevention of osteoporosis

In: Osteoporosis: Etiology, diagnosis and management (eds.: Riggs B.L., Melton L.J.III)

Raven Press New York: 333-358

LINDSAY, R., COSMAN, F. (1992)

Primary osteoporosis

Disorders of Bone and mineral metabolism (eds.: Coe F.L., Favus M.J. Raven Press, New

York: 831-888

LIU, H., YUAN, L., XIAODA, Y., WANG, K. (2003)

La<sup>3+</sup>, Gd<sup>3+</sup> and Yb<sup>3+</sup> induced changes in mitochondrial structure, membrane permeability, cytochromic release and intracellular ROS level

Chem Biol Interact 146: 27-37

LIU, M. (2005)

The effect of feeding Lanthan on the growth performance of pigs

Jiangxi Feed Vol. 3

LOCATELLI, F., D'AMICO, M., PONTORIERO, G. (2003)

Lanthanum Carbonat, Shire

Drugs 6: 688-695

LUKERT, B. P., RAISZ, L. G. (1990)

Glucocorticoid-induced osteoporosis: Pathogenesis and management

Ann Intern Med 112: 352-364

MACINTYRE, I., STEVENSON, J. C., WHITEHEAD, M. I., WIMALAWANSA, S. J., BANKS, J. N., HEALY, M. J. R. (1988)

Calcitonin for the prevention of postmenopausal bone loss

Lancet 1: 900-902

MAGNUSSON, G. (1963)

The behavior of certain Lanthanoids in rats

Acta Pharmacol Toxicol 20: 1-95

MAKAN, S., BAYLEY, H. S., WEBBER, C. C. (1997)

Precision and accuracy of total bone mass and body composition measurements in rats using x-ray based dual photon absorptiometry

Can J Physiol Pharmacol 75: 1257-1261

MARCUS, R. (1992)

Secondary forms of osteoporosis

In: Disorders of bone and mineral metabolism (eds.: Coe F.L., Favus M.J.) Raven Press, New York: 889-904

MARTIN, T. J. (1993)

Hormones in the coupling of bone resorption and formation

Osteoporosis Int 3: 121-125

MCCARTHY, T. I., CENTRELLA, M., CANALIS, E. (1990)

Cortisol inhibits the synthesis of insulin-like growth factor 1 synthesis in osteoblast-enriched cultures

J Biol Chem 265: 15353-15358

MELTON, L. J., CHRISCHILLES E. A., COOPER, C., LANE A. W., RIGGS, B. L. (1992)

How many women have osteoporosis?

J Bone Miner Res 7: 1005-1010

MEUNIER, P. J., DELMAS, P. D., EASTELL, R., MCCLUNG, M. R., PAPAPOULOS, S., RIZZOLI, S. et al. (1999)

Diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women

Clinical Therapeutics: International Committee for Osteoporosis; Clinical Guidelines: 1025-1044

MEYER, U., SPOLDERS, M., RAMBECK, W. A., und FLACHOWSKY, G. (2006)

Effect of dietary rare earth elements on growth performance of preruminant female Holstein calves

Proceedings of the society of Nutrition Physiology, 21.- 23. März, Göttingen, Volume 15

MILLER, T. (2006)

Einfluss Seltener Erden in der Schweine und Kälbermast

Vet Med Diss, Ludwig Maximilians Universität München

MOTAMED, K. (1999)

Molecules in Focus SPARC (Osteonectin/BM-40)

Int J Biochem Cell Biol 31: 1363-1366

MUROMA, A. (1958)

Studies on the bactericidal action of salts of certain rare earth metals

Ann Med Exp Biol Fenn 36: 1-5

NAKAMURA, Y., TSUMURA, Y., SHIBATA, T., ITO, Y. (1997)

Differences in behavior among the chlorides of seven rare earth elements administered intravenously to rats

Fundam Appl Toxicol 37: 106 – 116, 1997

National Osteoporosis Foundation (2005)

Disease statistics

NEMERY, B. (1990)

Metal toxicity in the respiratory tract

Eur Respir J 3: 202-219

NEWMAN, E., TURNER, A. S., WARK, J. D. (1995)

The potential of sheep for study of osteopenia: current status and comparison with other animal models

Bone 16(4): 227-284

NORDIN, B. E. C., GREGOR, J. M., SMITH, D. A. (1966)

The incidence of osteoporosis in normal women: Ist relation to age and menopause

Quarterly J Med new Series XXXV (137), 35: 25-38

NUTRIENT REQUIREMENTS OF LABORATORY ANIMALS (1995)

Fourth Revised Edition

National Research Council, National Academy Press, Washington D.C.

PACIFI, R., RIFAS, L., MCCRACKEN, R., VERED, I., MCMURTY, C., AVIOLI, L. V. and PECK, W. A. (1989)

Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclastic cells in vitro

J Bone Miner Res 4: 113-118

PARFITT, A. M. (1982)

The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data

In: Bone histomorphometry: Techniques and interpretation (ed.: Recker R.R.) CRC Press, Boca Raton: 143-223

PANG, X., LI, D., PENG, A. (2002)

Application of rare earth elements in the agriculture of China and its environmental behavior in Soil

Environ Sci Poll Res, 9(2): 143-148

PARVIAINEN, M. T., JÄÄSKELÄINEN, K., KRÖGER, H., ARNALA, I., ALHAVA, E. (1999)

Urinary bone resorption markers in monitoring treatment of symptomatic osteoporosis

Clin Chim, 279: 145-154

PORRU, S., PLACIDI, D., QUARTA, C., SABBIONI, E., PIETRA, R., FORTANER, S. (2000)

The potential role of rare earths in the pathogenesis of interstitial lung disease: A case report of a movie projectionist as investigated by neutron activation analysis

J Trace Elem Med Biol, 14: 232-236

PRAUSE, B., GEBERT, S., WENK, C., RAMBECK, W. A., WANNER, M. (2004)

Seltene Erden– alternative Leistungsförderer beim Schwein – ein Überblick und erste Ergebnisse eines Gesamtstoffwechselforschungsvorhabens

3. BOKU Symposium für Tierernährung, Fütterungsstrategien und Produktqualität, 4.

November 2004 in Wien, pages 38-44

PRYZWARA, D., BHAVE, S., BHAVE, A., CHOWDHURY, P., WAKADE, T., WAKADE, A. (1992)

Activation of  $K^+$ - channels by Lanthanum contributes to the block of Neurotransmitter release in chick in rat sympathetic neurons

J Membr Biol 125:155-162

RAISZ, L. G., PILBEAM, C. C., FALL, P. M. (1993)

Prostaglandins: Mechanismus of action and regulation of production in bone  
Osteoporosis Int 3: 1363-140

RAMBECK, W. A., HE, M. L., CHANG, J., ARNOLD, R., HENKELMANN, R. und SÜSS, A.  
(1999)

Possible role of rare earth elements as growth promoters  
Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier  
7. Symposium, 22.-23. September 1999, JenaThüringen, 311-317

RENARD, B. (2005)

Seltene Erden als Leistungsförderer in der Fischzucht – Untersuchungen an  
Regenbogenforellen und Karpfen  
Vet Med Diss, Ludwig Maximilians Universität München

RICHELSON, L. S., WAHNER, H. W., MELTON, L. J. und RIGGS, B. L. (1984)

Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss  
N Engl J Med 311(20): 1273–1275

RIEDER, M. A. (2000)

Knochenmarker bei ovariektomierten Ratten und Schafen, Tiermodelle in der  
postmenopausalen Osteoporose  
Vet Med Diss, Ludwig Maximilians Universität München

RIGGS, B. L., KHOSLA, S., MELTON, L. J. (2001)

Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton  
Endocr Rev 23: 279-302

RITTLING, S. R., DEHNHARDT, D. T. (1999)

Osteopontin function in pathology: Lessons from osteopontin-deficient mice  
Exptl Nephrology 7: 103-113

RIZZOLI, R. (2002)

Preclinical models of drug efficiency and skeletal toxicity  
Endocrinologic & Metabolic Drugs Advisory Committee, September 2002

RODAN, G. (2002)

Contribution of preclinical studies to evaluation of osteoporosis therapy  
Endocrinologic & Metabolic Drugs Advisory Committee, September 2002

RODGERS, J. B., MONIER-FAUGERE, M. C., MALLUCHE, H. (1993)

Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function  
Bone 14: 369-377

ROMAS, E., MARTIN, T. J. (1997)

Cytokines in the pathogenesis of osteoporosis  
Osteoporos Int 7(3): 47-53

SABBIONI, E., PIETRA, R., GAGLIONE, P. (1982)

Long term occupational risk of rare-earth pneumoconiosis. A case report as investigated by  
neutron activation analysis  
Sci Tot Environ 26: 19-32

SANADA, H., SHIKATA, J., HAMAMOTO, H., UEBA, Y., YAMAMURO, T., TAKEDA, T.  
(1978)

Changes in collagen cross-linking and lysyl oxidase by estrogen  
Biochim Biophys Acta Sci USA 85: 5235-5239

SCHÖNAU, E. (1998)

Problems of bone analysis in childhood and adolescence  
Pediatr Nephrol 12: 420-429

SCHULLER, S (2001)

Seltene Erden als Leistungsförderer beim Geflügel. Untersuchungen an Broilern und  
japanischen Wachteln  
Vet Med Diss, Ludwig Maximilians Universität München

SEIBEL, M. J. (1995)

Labordiagnostik bei osteoporotischen Erkrankungen: Möglichkeiten und Grenzen  
M. J. Seibel M.E.K., ed., Osteoporose: Moderne Diagnostik - therapeutische Konsequenzen  
für Klinik und Praxis, 13-23. Karger, Freiburg - Basel

SEIBEL, M. J. und RAUE, F. (1996)

Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels und ihre Bedeutung bei der Osteoporose-Diagnostik

Clin Lab 3: 135–140

SODEK, K. L., TUPY, J. H., SODEK, J., GRYPAS, M. D. (2000)

Relationships between bone protein and mineral in developing porcine long bone and calvaria

Bone 26: 189-198

SNYDER, F., CRESS, E. A., KYKER, G. C. (1960)

Rare-earth fatty liver

Nature 185: 480-481

STORM, T., THAMSBORG, G., STEINICHE, T., GENANT, H. K., SORENSEN, O. H. (1990)

Effect on intermittent cyclic etidronate therapy on bone mass and fracture rate in women with postmenopausal osteoporosis

N Eng J Med 322: 1265-1271

STRACKE, H. (1992)

Osteoporose: Was ist gesichert in der Therapie?

Arcis Verlag, München

STRATEC (1998)

XCT 2000 Bedienungsanleitung, Softwareversion 5.40

Stratec Medizintechnik GmbH

SUDA, T., TAKAHASHI, I. N., UDGAWA, N., JIMI, E., GILLSOIE M. T., MARTIN, T. J. (1999)

Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families

Endocr Rev 20: 345–57

SULOTTO, F., ROMANO, C., BERRA, A., BOTTA, G. C., RUBINO, G. F., SABBIONI, E. und PIETRA, R. (1986)

Rare-earth pneumoconiosis: A new case

Am J Ind Med 9: 567-575

SÜSS, A (2004)

Seltene Erden mit beachtlicher Wirkung

Bayerisches Landwirtschaftliches Wochenblatt 194, 2004

SWAINSTON HARRISON, T. und SCOTT, L. J. (2004)

Lanthanum Carbonate

Drugs 64(9): 985-996

SZULE, P., SEEMAN, E., DELMAS, P. D. (2000)

Biochemical measurements of bone turnover in children and adolescents

Osteoporos Int 11: 281-294

TANSEY, G., HUGHES; C. L. J., CLINE, J. M., KRUMMER, A., WALMER, D. K. und  
SCHMOLTZER, S. (1998)

Effects of dietary soybean estrogens on the reproductive tract in female rats

Proc Soc Exp Biol Med 217: 340–344

TARALLO, P., HENNY J., FOURNIER, B. und SIEST, G. (1990)

Plasma osteocalcin: biological variations and reference limits

Scand J Clin Lab Invest 50(6): 649–655

TAUTENHAHN, J. (2004)

Effect of different concentrations of rare earth Elements on growth of juvenile oreochromis niloticus

University of Aquaculture University of Stirling, Scotland, Bachelor Thesis

TERMINE, J. D., KLEINMANN, H. K., WHITSON, S. W., CONN, K. M., MCGARVEY, M. L.,  
MARTIN, G. R. (1981)

Osteonectin, a bone –specific protein linking mineral to collagen

Cell 26: 99-105

THOMPSON, D. D., SIMMONS, H. A., PIRIE, C. M., KE, H. Z. (1995)

FDA guidelines and animal models for osteoporosis

Bone 17: 125-133

- TINTUT, Y., ABEDIN, M., CHO, J., CHOE, A., LIM, J., DEMER, L. (2005)  
Regulation of RANKL-induced osteoclastic differentiation by vascular cells  
J Mol Cell Card 39: 389-393
- TORITSUKA, N., DAIMON, H., SAWADA, S., SAGAMI, F., TIRONE, P., MORISETTI, A.,  
BUSSI, S., FASSIO, F. (1999)  
Mutagenicity study of gadobenate dimeglumine formulation (E7155) (3)-Micronucleus test in  
rat bone marrow cells  
J Toxicol Sci 24: 103-106
- US FDA (1994)  
Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment  
of postmenopausal osteoporosis  
Div Met End Drug Prod, Food and Drug Admin, Maryland, USA
- VACCARIE, A., SABA, P., MOCCI, I, RUIUI, S. (1999)  
Lanthanids stimulate (3H) tyramine binding in the rat striatum  
Neurosci Lett 261: 49-52
- VAN DER LAARSE, W., VAN NOOR, T. P., SIMONIDES, W., DIGENBACH, P., LEE DE  
GROOT, M., VAN HARDEVELD, C. (1995)  
Histochemistry of sarcoplasmatic reticulum Ca-ATPease using dysprosium as capturing  
agent  
Histochem J 27(9): 702-714
- VERVUERTH I. (1999)  
Besonderheiten der Verdauungsphysiologie neugeborener kleiner Heimtiere unter  
besonderer Berücksichtigung der Handaufzucht  
J. Kamphues M.F. P.Wolf, ed., Praxisrelevante Fragen zur Ernährung kleiner Heimtiere  
(kleiner Nager, Frettchen, Reptilien), 29–32. Eigenverlag, Tierärztl. Hochschule Hannover
- WADA, T., NAKASHIMA, T., HIROSHI, N., PENNINGER, J. (2005)  
RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease  
Trends in molecular medicine 12: 17-25

WADKINS, T., BENZ, J., BRINER, W. (1998)

The effect of lanthanum administration during neural tube formation on the emergence of swimming behavior

Met Ions Biol Med 5: 168-171

WALD, P. H. (1990)

A review of the literature on the toxicity of rare earth metals as it pertains to the engineering demonstration system surrogate testing. Lawrence Livermore National Laboratory, UCID-21823 Rev 1: 1-27

WARRING, P.M. und WATTLING, R. J. (1990)

Rare earth desposits in a deceased movie projectionist

Med J Aust 153: 726-730

WASSERMANN, A. J., MONTICELLO, T. M., FELDMAN, R. S., GITLITZ, P. H., DURHAM, S. K. (1996)

Utilization of electron probe microanalysis in gadolinium-treated mice

Toxicol Pathol 24(5): 588-594

WAYNFORTH, H. B. (1980)

Experimental and surgical technique in the rat

Academic Press

WEHR, U. A. (1998)

Diagnose, Prävention und Therapie von Knochenstoffwechselerkrankungen in der Humanmedizin: Möglichkeiten und Grenzen von biochemischen Knochenmarkern

Vet Med Diss, Ludwig Maximilians Universität München

WEISS, G. B. und GOODMAN F. R. (1969)

Effects of lanthanum on contraction, calcium distribution and

Ca<sup>2+</sup> movements in intestinal smooth muscle

J Pharmacol Exp Ther 169: 46-55

WITHOLD, W. (1996)

Monitoring of bone turnover biological, preanalytical and technical criteria in the assessment of biochemical markers

Eur J Clin Chem Clin Biochem 34: 785–799

WRONSKI; T. J., SCHENK; P. A., CINTRON; M. und WALSH; C.C. (1987)

Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats

Calcif Tissue Int 40(3): 155–159.

WRONSKI, T. J., und YEN, C. F (1991)

The ovariectomized rat as an animal model for postmenopausal bone loss

Eur Cell Mater 69(1): 69–74

WYTENBACH et al. (1996)

J. Radioanal. Nucl. Chem. 204: 401

XIE, J. und WANG, Z. (1998)

The effect of organic rare-earth compounds on production performance

of chicken. In 2nd International Symposium on Trace Elements and Food Chain,

12.-15.November 1998, Seite 74, Wuhan, China

XIE, J., XIA, Z. und WANG, Z. (1995)

Studies on the effects of rare earth compound added to diets of Guangxi Broiler Chickens  
unpublished

XTC 2000 Bedienungsanleitung, Softwareversion 5.40.

Stratec Medizintechnik GmbH

XU, Z. R., CHEN, L. M., WANG, M. Q. (1998)

Effect of Lanthanum on growth, digestion, and carcass composition of growing pigs

J Zhejiang Agricultural Univ 24: 395-397

XU, Z. R, WANG, M. Q, CHEN, L. M. (1999)

Growth response of pigs fed supplemental lanthanum and approach of mechanism

Journal of the Chinese Rare Earth Society, 17: 53–59

YAMAZAKI, I. und YAMAGUCHI, H. (1989)

Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat model

J Bone Miner Res 4(1): 13-22

YANG, L. und GREY, V. (2005)

Pediatric references intervals for bone markers.

Clin Biochem: e-publication 2005 (accepted for publication)

YANG, H., ZHANG, Q., CHENG, J., ZHANG, H. (2005)

Effect of supplementing rare earth element complex compound with fumaric in ration on liveweight gain of yellow hybrid broiler

Chinese Qingai Journal of Animal and Veterinary Sciences Vol. 35

YUGUI, Z., MODAI, S., SHIQING, S. (1990)

A study on the effect of the rare earth element on main nutrients of chickens and its remaining rays

Scientific Research Center. Inner Mongolia Colleg of agriculture & Animal Husbandry

ZHANG, H., FENG, J., ZHU, W., LIU, C., XU, S., SHAO, P., WU, D., YANG, W., GU, J. (2000)

Chronic toxicity of rare-earth elements on human beings, Implications of blood biochemical indices in ree-high regions, South Jianxi

Biol Trace Elem Res 73: 1-16

ZHANG, B. und SHAO, L. (1995)

Effect of inorganic REE on growth performance of broilers

Chinese Journal of Husbandry 31:38 – 39

ZITTERMANN, A., SCHLEITHOFF, S. S., KOERFER, R. (2005)

Markers of bone metabolism in congestive heart failure

Clin Chim Acta 366: 27-36

## Abbildungsverzeichnis

5.1 Querschnitte durch Femurknochen	91
5.2 Mittlere Osteocalcinkonzentration von SHAM und OVX	94
5.3 AUC PYD von SHAM und OVX	96
5.4 Gewichtsentwicklung der Versuchstiere	99
5.5 AUC Osteocalcin	105
5.6 Mittlere Osteocalcinkonzentration der Therapie- und Kontrollgruppen	105
5.7 AUC PYD	108
5.8 Relative Knochengewichte	110
5.9 Calciumgehalt der Knochenasche	111
5.10 Trabekuläre Dichte	113

# Tabellenverzeichnis

2.1 Eigenschaften von Lanthanoiden und Calcium	4
2.2 Der Fütterungseinfluss von REE in der chinesischen Tierhaltung	6
2.3 Der Fütterungseinfluss von REE in der westlichen Tierhaltung auf Schw.	9
2.4 Der Fütterungseinfluss in der westlichen Tierhaltung auf andere Tiere	10
2.5 a/b Wichtige Knochenmarker	27
	28
2.6 Unterschiede des Modells zur Frau	39
2.7 Übereinstimmungen des Modells zur Frau	39
3.1 Tierfutter	48
3.2 Gruppeneinteilung	50
4.1 Mittleres Körpergewicht	68
4.2 AUC Körpergewichte	69
4.3 Tagesfuttermittelverbrauch	70
4.4 Mittlere Osteocalcinkonzentration	72
4.5 AUC Osteocalcin	72
4.6 Mittlere Pyridinolinausscheidung	73
4.7 Mittlere Desoxypyridinolinausscheidung	74
4.8 AUC PYD	74
4.9 AUC DPD	75
4.10 Mittlerer Serumcalciumgehalt	75
4.11 AUC Serumcalcium	76
4.12 Absolute Knochenlänge	77
4.13 Relative Knochenlänge	77
4.14 Absolutes Knochengewicht	78
4.15 Relatives Knochengewicht	79
4.16 Knochenasche	79
4.17 Calciumgehalt der Knochenasche	80
4.18 Phosphorgehalt der Knochenasche	80
4.19 Magnesiumgehalt der Knochenasche	81
4.20 Gesamtdichte der Tibia	82
4.21 Trabekuläre Dichte der Tibia	82
4.22 Kortikale Dicht der Tibia	83
4.23 Uterusgewichte	84
4.24 Gewicht von Herz und Lunge	84

4.25 Gewicht von Leber und Niere	85
4.26 Phosphorkonzentration Herz	85
4.27 Phosphorkonzentration Leber	86
4.28 Calciumkonzentration Herz	86
4.29 Calciumkonzentration Leber	87
4.30 Konzentration an REE in der Leber	87
4.31 Nährstoffe im Futter	88
4.32 Mineralstoffgehalt des Futters	88
5.1 Mittlere Wirkstoffaufnahme der Tiere	93

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rambeck danke ich für das Überlassen des Themas, seine Geduld und seine hilfsbereite, aufgeschlossene Art.

Herrn Dr. Ulrich Wehr danke ich für seine gute Betreuung und die vielen Hilfestellungen, die essentiell für die Durchführung dieser Doktorarbeit gewesen sind.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. med. F. Eckstein des Instituts für Anatomie und Muskuloskelettale Forschung der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität, Salzburg, Österreich, und seine Arbeitsgruppe am Anatomischen Institut der Medizinischen Universität München. Besonders möchte ich mich bei Frau Maiko Matsuura (M. Sc.) für die gute Zusammenarbeit und die zügige Datenermittlung bedanken.

Ein herzliches Dankeschön an die Mitarbeiter des Lehrstuhls für Tierernährung: Frau Elke Kleiner und Frau Antje Wetzel, sowie natürlich Herrn Werner Hesselbach, der mich monatelang an seinem Computer ertragen hat.

Desweiteren ein Dankeschön an Stefan Lochbrunner, Sabine Simmel, Marina Kohn, Jennifer Lange, Christiane Funk, Steffi sowie Georg Millauer, ohne deren Hilfe weder die Probenahmen, noch die Haltung der Tiere in dieser Art und Weise möglich gewesen wären.

Bei Frau E. Stadler von der Außenstelle Oberwiesenfeld bedanke ich mich für die Hilfe in der Ausstattung des Tierstalls und die Ideen der Materialien für die Probenentnahmen.

Frau H. Unterthurner und Herrn F. Meggendorfer danke ich für die Hilfe bei der Betreuung meiner Tiere. Herrn T. Hoschka danke ich für den technischen Service bei der Tierhaltung.

Einen Dank an Kerstin Redling für die Hilfe bei der Übersetzung.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich an meine Mitdotorandin Sylvia von Rosenberg richten, da Sie durch Ihre angenehme und unkomplizierte Art zu einer reibungslosen und entspannten Zusammenarbeit beigetragen hat.

Ohne meine Eltern wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen; vielen Dank für Euer Vertrauen und die Unterstützung.

## Lebenslauf

Alexander Feldhaus

Geb. am 24.07.1977 in Wipperfürth

Als Sohn von

Katharina Feldhaus (geb. Guntermann)

und Bernd Feldhaus

## Schulbildung

1983-1986: Pestalozzi-Grundschule Kierspe

1986-1996: Gesamtschule Kierspe

## Studium

1998-2004: Studium an der Tierärztlichen Fakultät  
der Justus-Liebig Universität Giessen

31.03.2004: 3. Staatsexamen

06.05.2004: Approbation als Tierarzt

## Promotion

Oktober 2004-April 2006: Anfertigung der  
vorliegenden Dissertation am Institut für  
Physiologie, physiologischen Chemie und  
Tierernährung unter Prof. Dr. W. A. Rambeck

München, den 26.03.2006