

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

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

**Untersuchung des Knochenstoffwechsels anhand der Knochenmarker
knochenspezifische alkalische Phosphatase und Pyridinolin am intakten und
ovariorrektomierten Osteoporosemodell Minipig**

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

von Kathrin Reif

aus Netphen

München
2007

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

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

Referent: Prof. Dr. W. Rambeck

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Sinowatz

Tag der Promotion: 20.07.2007

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Das Minipig als Tiermodell	2
2.2	Geschichte, Entstehung und Züchtung	2
2.3	Einsatzmöglichkeiten.....	3
2.3.1	Leber	3
2.3.2	Stoffwechsel.....	3
2.3.3	Herz-Kreislaufsystem	4
2.3.4	Haut, Unterhaut, Schleimhaut	4
2.3.5	Knochen.....	5
2.4	Osteoporose.....	7
2.4.1	Allgemeine Osteoporose	7
2.4.2	Bedeutung.....	10
2.4.3	Knochen und Markerscreening im Modell	10
2.4.3.1	Knochenaufbau	10
2.4.3.2	Knochenmarker.....	13
2.4.3.2.1	Biochemische Marker der Knochenformation	14
2.4.3.2.1.1	Knochenspezifische Alkalische Phosphatase	14
2.4.3.2.1.2	Osteocalcin	17
2.4.3.2.2	Biochemische Marker der Knochenresorption	18
2.4.3.2.2.1	Pyridinolin und Desoxypyridinolin (Kollagen-Crosslinks)....	18
2.4.3.2.2.2	Crosslaps	20
2.4.4	Großtiermodelle in der Osteoporoseforschung	21
2.4.4.1	„Ovariectomiertes Tiermodell“	23
2.4.4.1.1	Ovariectomierte Primaten	24
2.4.4.1.2	Ovariectomierte Schafe	25
2.4.4.1.3	Ovariectomierte Hunde	27
2.4.4.1.4	Minipigs als Osteoporosemodell	29
3	Material und Methoden	33
3.1	Versuchstiere und Versuchstierhaltung	33
3.2	Futtermittel	33
3.3	Versuchsdurchführung	34

3.4	Synchronisation.....	35
3.5	Serumgewinnung	35
3.6	Ovariohysterektomie	35
3.7	Bestimmung der Serumparameter	36
3.7.1	Knochenspezifische Alkalische Phosphatase	36
3.7.2	Pyridinolin.....	36
3.7.3	Progesteron.....	37
3.7.4	Östradiol.....	37
3.8	Statistische Auswertung	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Ergebnisse am intakten Minipig vor Ovariohysterektomie.....	39
4.1.1	Allgemeinbefinden und Gewichtsentwicklung	39
4.1.2	Knochenspezifische Alkalische Phosphatase im Serum	41
4.1.3	Pyridinolin im Serum	42
4.1.4	Progesteron im Serum	43
4.1.5	Östradiol im Serum	44
4.1.6	Vergleichende Aufstellung aller Parameter vor OHX	45
4.1.6.1	Gruppe 1	45
4.1.6.2	Gruppe 2.....	46
4.2	Ergebnisse des ovariohysterektomierten-Minipigs	47
4.2.1	Allgemeinbefinden und Gewichtsentwicklung	47
4.2.2	Knochenspezifische Alkalische Phosphatase im Serum	48
4.2.3	Pyridinolin im Serum	49
4.2.4	Progesteron im Serum	50
4.2.5	Östradiol im Serum	51
4.2.6	Vergleichende Aufstellung aller Parameter nach OHX.....	52
4.2.6.1	Kontrollgruppe 1.....	52
4.2.6.2	Kontrollgruppe 2.....	53
4.2.6.3	OHX-Gruppe.....	54
5	Diskussion	55
5.1	Aufbau und Durchführung des Versuchs.....	55
5.2	Wahl des Tiermodells ovariohysterektomiertes Minipig.....	55
5.3	Gewichtsentwicklung der Minipigs.....	57
5.4	Ovariohysterektomie	58

5.5	Knochenmarker	59
5.5.1	Knochenspezifische Alkalische Phosphatase	60
5.5.2	Pyridinolin.....	62
5.6	Zyklus und Knochenstoffwechsel	65
5.6.1	Progesteron.....	67
5.6.2	Östradiol.....	68
6	Zusammenfassung	70
7	Summary	71
8	Literaturverzeichnis	73
9	Danksagung	87
10	Lebenslauf	89

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Osteoporosestadien (WHO, 1994)
- Tabelle 2: Einteilung der Osteoporoseformen (Kraenzlin, 1995; Stracke, 1992)
- Tabelle 3: Knochenmarker (Seibel, 1996)
- Tabelle 4: Nährstoffgehalte der Futtermittel nach Weender Analyse, Ca/P-Gehalt
- Tabelle 5: Mittlere Gewichte (MW \pm STABW) in kg der Minipigs der Gruppe 1, Ca 0,9%, (n=5) und der Gruppe 2, Ca 0,69%, (n=11) im Zeitraum vor OHX
- Tabelle 6: Mittlere Konzentrationen von BAP (MW \pm STABW) in IE/l im Serum der Minipigs der Gruppe 1 (n=5) und der Gruppe 2 (n=11) im Zeitraum vor OHX
- Tabelle 7: Mittlere Konzentrationen von PYD (MW \pm STABW) in nmol/l im Serum der Minipigs der Gruppe 1 (n=5) und Gruppe 2 (n=11) im Zeitraum vor OHX
- Tabelle 8: Mittlere Konzentrationen von Progesteron (MW \pm STABW) in nmol/l im Serum der Minipigs der Gruppe 1 (n=5) und Gruppe 2 (n=11) im Zeitraum vor OHX
- Tabelle 9: Mittlere Konzentrationen von Östradiol (MW \pm STABW) in pg/ml im Serum der Minipigs der Gruppe 1 (n=5) und Gruppe 2 (n=11) zu ausgewählten Zeitpunkten vor der OHX
- Tabelle 10: Alter in Wochen, errechneter Zyklusstand, mittlere Konzentrationen von Progesteron (MW \pm STABW) in ng/ml, Östradiol (MW \pm STABW) in pg/ml, BAP (MW \pm STABW) in IE/l und PYD (MW \pm STABW) in nmol/l im Serum der Minipigs der Gruppe 1 (n=5) zu ausgewählten Zeitpunkten vor OHX
- Tabelle 11: Alter in Wochen, errechneter Zyklusstand, mittlere Konzentrationen von Progesteron (MW \pm STABW) in ng/ml, Östradiol (MW \pm STABW) in pg/ml, BAP (MW \pm STABW) in IE/l und PYD (MW \pm STABW) in nmol/l im Serum der Minipigs der Gruppe 2 (n=11) zu ausgewählten Zeitpunkten vor OHX
- Tabelle 12: Mittlere Gewichte (MW \pm STABW) in kg der Minipigs der Kontrollgruppe 1 (n=5), der Kontrollgruppe 2 (n=6) und der OHX-Gruppe (n=4) im Alter von 138 Wochen; 17 Wochen nach OHX
- Tabelle 13: Mittlere Konzentrationen von BAP (MW \pm STABW) in IE/l im Serum der Minipigs der Kontrollgruppe 1 (n=5) und der Kontrollgruppe 2 (n=6) und der OHX-Gruppe (n=4) im Zeitraum nach OHX
- Tabelle 14: Mittlere Konzentrationen von PYD (MW \pm STABW) in nmol/l im Serum der Minipigs der Kontrollgruppe 1 (n=5) und Kontrollgruppe 2 (n=6) und der OHX-Gruppe (n=4) im Zeitraum nach OHX

- Tabelle 15: Mittlere Konzentrationen von Progesteron (MW \pm STABW) in nmol/l im Serum der Minipigs der Kontrollgruppe 1 (n=5) und Kontrollgruppe 2 (n=6) und der OHX-Gruppe (n=4) im Zeitraum nach OHX
- Tabelle 16: Mittlere Konzentrationen von Östradiol (MW \pm STABW) in pg/ml im Serum der Minipigs der Kontrollgruppe 1 (n=5) und Kontrollgruppe 2 (n=6) und der OHX-Gruppe (n=4) im Zeitraum nach OHX
- Tabelle 17: Errechneter Zyklusstand, mittlere Konzentrationen von Progesteron (MW \pm STABW) in ng/ml, Östradiol (MW \pm STABW) in pg/ml, BAP (MW \pm STABW) in IE/l und PYD (MW \pm STABW) in nmol/l im Serum der Minipigs der Kontrollgruppe 1 (n=5) zu ausgewählten Zeitpunkten nach OHX
- Tabelle 18: Errechneter Zyklusstand, mittlere Konzentrationen von Progesteron (MW \pm STABW) in ng/ml, Östradiol (MW \pm STABW) in pg/ml, BAP (MW \pm STABW) in IE/l und PYD (MW \pm STABW) in nmol/l im Serum der Minipigs der Kontrollgruppe 2 (n=6) zu ausgewählten Zeitpunkten nach OHX
- Tabelle 19: Alter in Wochen, errechneter Zyklusstand, mittlere Konzentrationen von Progesteron (MW \pm STABW) in ng/ml, Östradiol (MW \pm STABW) in pg/ml, BAP (MW \pm STABW) in IE/l und PYD (MW \pm STABW) in nmol/l im Serum der Minipigs der OHX-Gruppe (n=4) zu ausgewählten Zeitpunkten nach OHX

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Mittlere Gewichte der Minipigs in kg während des gesamten Versuchszeitraums
- Abbildung 2: Mittlere BAP-Konzentrationen in IE/l vor OHX der Gruppe 1 (Intakt Ca 0,9%) und Gruppe 2 (Intakt Ca 0,69%)
- Abbildung 3: Mittlere BAP-Konzentrationen in IE/l nach OHX aller Gruppen
- Abbildung 4: Mittlere Pyridinolin-Konzentrationen in nmol/l vor OHX der Gruppe 1 (Intakt Ca 0,9%) und Gruppe 2 (Intakt Ca 0,69%)
- Abbildung 5: Mittlere Pyridinolin-Konzentrationen in nmol/l nach OHX aller Gruppen
- Abbildung 6: Mittlere Progesteron-Konzentrationen in nmol/l vor OHX der Gruppe 1 (Intakt Ca 0,9%) und Gruppe 2 (Intakt Ca 0,69%)
- Abbildung 7: Mittlere Progesteron-Konzentrationen in nmol/l nach OHX aller Gruppen
- Abbildung 9: Mittlere Östradiol-Konzentrationen in pg/l nach OHX aller Gruppen

Abkürzungsverzeichnis

AP	gesamtalkalische Phosphatase
BAP	Knochenspezifische Alkalische Phosphatase
BGP	bone Gla Protein
BMC	bone mineral content, Knochenmineralgehalt
BMD	bone mineral density, Knochendichte
BS	bone surface, endostale Oberfläche
BV	bone volume, Knochenvolumen
Ca	Calcium
CT	Computertomographie
CTx	carboxyterminales Telopeptid des Typ 1 Kollagens
d	Tag
DE	verdauliche Energie
DEXA	dual energy X-ray absorptiometry
DPD	Desoxypyridinolin
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
g	Gramm
h	Stunde
HPLC	high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
i.m.	intramuskulös
i.v.	intravenös
IE	Internationale Einheit
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
KM ^{0,75}	metabolische Körpermasse
l	Liter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol

MW	arithmetischer Mittelwert
n	Anzahl
Na	Natrium
NaOH	Natronlauge
NfE	N-freie Extraktstoffe
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NTx	aminoterminales Telopeptid des Typ 1 Kollagens
OC	Osteocalcin
OHX	Ovariohysterektomie
OVX	Ovariectomie
P	Phosphor
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.o.	per os
PTH	Parathormon
PYD	Pyridinolin
Ra	Rohasche
Rfa	Rohfaser
Rfe	Rohfett
RIA	Radioimmunoassay
Rp	Rohprotein
s.c.	subkutan
SD	standard deviation
StABW	Standardabweichung
sV	scheinbare Verdaulichkeit
TS	Trockensubstanz
TV	total volume, Gesamtvolumen
U/l	Units (Einheiten) pro Liter
ucOC	untercarboxyliertes Osteocalcin
uS	ursprüngliche Substanz
WHO	World Health Organisation
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

1 Einleitung und Problemstellung

Die Osteoporose gehört zu den bedeutungsvollsten Krankheiten der westlichen Industrienationen. Nach der Deutschen Gesellschaft für Osteologie von 2006 wird die Osteoporose als „systemische Skeletterkrankung mit Verlust bzw. Verminderung von Knochensubstanz und –struktur, Störung der Mikroarchitektur und erhöhter Frakturanfälligkeit“ definiert.

Da der Anteil an alten Menschen in der Bevölkerung in den künftigen Jahrzehnten weiterhin zunehmen wird, kann man die Bedeutung der Osteoporose nicht genug einschätzen. Jedes Jahr werden in der EU über 380 000 Patienten mit Hüftfraktur und über 96 000 Patienten mit Wirbelfrakturen in Kliniken behandelt. Die Kosten belaufen sich dabei auf insgesamt über vier Milliarden Euro. Aufgrund einer steigenden Lebenserwartung und damit verbunden der zunehmenden Inzidenz von osteoporotischen Frakturen, wird die Osteoporose in Zukunft noch weiter an Bedeutung gewinnen.

Um die Krankheit in ihrem ganzen Ausmaß, die Pathogenese, die Wirksamkeit von Medikamenten oder der Einsatz orthopädischer Implantate, hinreichend untersuchen zu können, werden entsprechende Tiermodelle genutzt. Die Food and Drug Administration (FDA) verlangt seit 1994 für die Zulassung neuer Medikamente für die Osteoporosetherapie die Überprüfung der Wirksamkeit sowohl an der Ratte als auch an einem Großtiermodell.

Großtiermodelle besitzen den Vorteil, dass sie durch ihre größere Körpermasse ein höheres Blutvolumen haben. Dies ermöglicht, dass öfters größere Mengen an Blut entnommen werden können als z.B. bei der Ratte. Auch kann man an der Ratte keine orthopädischen Implantate testen oder wiederholt Knochenbiopsien durchführen.

Ziel dieser Studie soll es sein, am Tiermodell Minipig eine eventuelle Zyklusabhängigkeit des Knochenstoffwechsels zu untersuchen und im weiteren Verlauf der Studie die Auswirkung der Ovariohysterektomie bei diesem Großtiermodell auf den Knochenstoffwechsel anhand von ausgewählten Knochenmarkern zu untersuchen.

In einem weiteren Aspekt dieser Arbeit soll überprüft werden, ob eine reduzierte Calciumzufuhr bei diesem Tiermodell von entscheidender Bedeutung ist.

2 Literaturübersicht

2.1 Das Minipig als Tiermodell

Das Minipig ist besonders durch seine geringe Größe und die einfache Handhabung als Großtiermodell für Langzeitstudien geeignet (Larsen and Rolin, 2004).

Da bei einer Arzneimittelzulassung sowohl an einem Kleintier- als auch an einem Großtiermodell Untersuchungen durchgeführt werden müssen, bietet das Minipig im Vergleich zu anderen Schweinerassen die Vorteile von weniger Platz- und Futterbedarf. Im Gegensatz zum Kleintiermodell Ratte kann beim Großtiermodell Minipig eine wesentlich größere Menge an Blut häufiger gewonnen, Knochenbiopsien wiederholt entnommen und orthopädische Implantate getestet werden.

Viele Organsysteme von Schweinen sind denen des Menschen ähnlich: z.B. sind Schweine Allesfresser und haben nur einen Magen, und damit eine vergleichbare Verdauung (Bentouimou et al, 1997; Dixon et al, 1999).

2.2 Geschichte, Entstehung und Züchtung

1960 begann F. Haring erstmals mit der Zucht des Göttinger Miniaturschweines aus vietnamesischen Hängebauchschweinen und Minnesota Minischweinen auf der Versuchsgutanlage Friedland. 1969 wurde aus den Mitteln der VW-Stiftung eine SPF (semi-pathogenfrei)-Zuchtanlage auf dem Versuchsgut Relliehausen der Universität Göttingen errichtet, in der die Basiszuchtpopulation des Göttinger Minischweines gezüchtet wurde. Ursprünglich gab es eine bunte und eine weiße Linie, doch seit 1992 wird als Standardversuchstier nur noch das weiße Miniaturschwein gezüchtet. Mittlerweile ist die Zucht auf Lizenzbasis der Fa. Ellegard Göttingen Minipigs in Dänemark übertragen worden.

Es werden ebenfalls das Dresdner Minipig, das Münchner Miniaturschwein, das vietnamesische Hängebauchschwein, das Sinclair- und das Yucatan-Minipig als Versuchstiere genutzt.

2.3 Einsatzmöglichkeiten

Das Schwein besitzt viele Ähnlichkeiten mit den Organsystemen des Menschen, sowohl anatomisch als auch physiologisch.

Das Kreislaufsystem mit Herz und Gefäßen, Pankreas, Leber, Verdauungssystem, Haut und Knochen weisen große Ähnlichkeiten mit denen des Menschen auf.

Dadurch bietet sich das Minipig als Tiermodell für viele Untersuchungsgebiete an, um z.B. Arzneimittel oder Implantate für den Menschen zu testen.

2.3.1 Leber

Die Leber des Schweins ist anatomisch und physiologisch der des Menschen ähnlicher als die Rattenleber (Vielei et al, 2001). Nicht nur die relative Organgröße entspricht der des Menschen, auch die Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit ist gleichartig (Kobayashi et al, 1998).

Die Infektion mit Staphylococcus Enterotoxin verläuft beim Minipig mit klinischen Symptomen, histologischen Läsionen und postmortalen Befunden wie beim Menschen (van Gessel et al, 2004). Da die Hepatocyten auf mikrosomaler und molekularer Ebene denen des Menschen entsprechen, ist das Minipig in dieser Hinsicht als Tiermodell für die Pharmakokinetik geeignet (Monshouwer et al, 1998; Anzenbacher et al, 1998). Die Biotransformation von Pharmazeutika wie z.B. 5-Aminoalicylsäure gleicht beim Minipig denen des Menschen (Kvetina et al, 1999). 75% der Cytochrom P-Sequenzen des humanen Genoms sind homolog zu denen des Minipigs (Skaanild et al, 1999).

2.3.2 Stoffwechsel

Die wohl am meisten am Minipig untersuchte Stoffwechselerkrankung ist Diabetes mellitus (Typ 1), da der Aufbau, die Größe und die Lage des Pankreas des Minipigs in hohem Maße dem des Menschen entspricht. Die Blutversorgung des endo- und exokrinen Gewebes des Schweins ist vergleichbar zu der des Menschen (Murakami et al, 1997). Porcines und humanes Insulin unterscheidet sich lediglich in einer einzelnen Aminosäure an der 30. Position der b-Kette (Ganong, 1991b). Endokrine Zellen

befinden sich hauptsächlich in den Langerhansschen Inseln, aber auch im exokrinen Gewebe lassen sich einzelne Zellen oder Zellcluster finden (Jay et al, 1999; Wieczorek et al, 1998). Die Struktur der Langerhansschen Inseln in jungen Schweinen ist diffuser als die von erwachsenen Menschen und die retikuläre Kapsel, die das endokrine vom exokrinen Gewebe trennt, ist nicht wie die menschliche.

Die Langerhansschen Inseln werden bei ausgewachsenen Schweinen kompakter, so dass sie dann den menschlichen Langerhansschen Inseln wieder mehr ähneln (Jay et al, 1999; Krickhahn et al, 2002). Die Anzahl der β -Zellen des endokrinen Gewebes im Minipig entspricht der des Menschen (Larsen et al, 2003).

Minipigs haben niedrigere Nüchtern-Plasmawerte von Insulin und Glucose, während die Werte der Hausschweine im Bereich der humanen Werte liegen (Fritsche et al, 2000, Larsen et al, 2001, 2002c). Die Plasmawerte von Insulin und Glukose steigen mit zunehmendem Alter sowohl bei Minipigs als auch bei Menschen an (Larsen et al, 2001).

2.3.3 Herz-Kreislaufsystem

Auch das Herz und das gesamte Kreislaufsystem sind in ihrem Aufbau zwischen Mensch und Schwein vergleichbar. Verschiedene Studien zeigen, dass sich das Minipig auch in dieser Hinsicht als Tiermodell eignet. De Korte et al untersuchten an Yucatan Minipigs atherosklerotische Plaques mit intravaskulärem Ultraschall (2002).

An weiblichen Schweinen wurde gezeigt, dass sich die Ovariektomie auf die Proliferation von den glatten Muskelzellen der Coronararterien positiv auswirkt. Dies ist notwendig für die Hämostase nach Gefäßverletzungen (Bracamonte et al, 2002).

2.3.4 Haut, Unterhaut, Schleimhaut

Die hohe Übereinstimmung des Aufbaus der Haut und des subkutanen Gewebes, der Gefäße von Schweinen und Menschen führt dazu, dass auch in diesem Bereich das Minipig gerne als Tiermodell genutzt wird. Es ist von Bedeutung für die Pharmaforschung ein Tiermodell zu finden, an dem die subkutane Injektion von Insulin für Diabetes untersucht werden kann. Die Konzentration von Serum-Albumin in der Haut entspricht bei Schweinen der des Menschen (Ganong et al, 1991a).

Die allergische Kontakt-Dermatitis ist weltweit eine Erkrankung mit progressiver Entwicklung, anhand von Minipigs wurden Untersuchungen zu morphologischen und immunohistochemischen Gesichtspunkten der Krankheit durchgeführt.

Vana und Meingassner (2000) fanden heraus, dass sich durch die Verwendung von 2,4 Dinitrofluorbenzene eine allergische Kontaktdermatitis bei Minipigs hervorrufen lässt, an der sich immunpathologische Mechanismen und pharmakokinetische Vorgänge untersuchen lassen. Ebenfalls zur Untersuchung der allergischen Kontaktdermatitis, hervorgerufen durch Haarfärbemittel, wird das Minipig eingesetzt (Hueber-Becker et al, 2004).

Auch die Schleimhaut von Minipigs ähnelt in vielerlei Hinsicht der des Menschen, so kann anhand der Darmschleimhaut, der nasalen, bukkalen, sublingualen und rektalen Schleimhaut die Permeabilität von Biomembranen zur Anwendung von Medikamenten untersucht werden (Gore et al, 1998).

2.3.5 Knochen

Verschiedene Merkmale des Minipigskeletts sind mit denen des Menschen vergleichbar. Das Skelett zeigt ein umfangreiches Remodeling in der Spongiosa und metaphysär in der Kortikalis des Knochens. Das Schwein besitzt eine definierbare Peak Bone Mass im Alter von 2,5 bis 3 Jahre (Bouchard et al, 1995).

Minipigs sind groß genug für orthopädische Implantate, verkraften wiederholte Knochenbiopsien und häufigere Entnahmen größerer Blutmengen. Knochensubstanzverlust und Ablagerung in trabekulären und kortikalen Knochen sind zu denen des Menschen ähnlich, außerdem besitzt das Schwein ebenso wie der Mensch Lamellenknochen (Mosekilde et al, 1987; Mori et al, 2005).

Yucatan-Minipigs wurden als Tiermodell in einer Studie zur Untersuchung der Zahnimplantation genutzt, in der ein Vergleich zwischen der herkömmlichen Implantatvorbereitung durch Bohren und der neuartigen Osteotomie gezogen wurde (Büchter et al, 2004).

In einer anderen Studie wurde der Unterschied von mit IGF- und TGF-beschichteten und unbeschichteten Implantaten zur Überbrückung eines Frakturspaltes im Femur an Minipigs untersucht (Raschke et al, 2002).

Aber auch Erkrankungen, die eine Beeinträchtigung des Knochenstoffwechsel als Sekundärerkrankung nach sich ziehen, können am Tiermodell Minipig untersucht werden.

Z.B. haben Maier et al (1995) Minipigs genutzt, um die Calciumregulation und den Knochenmasseverlust nach einer vollständigen oder partiellen Magenresektion zu untersuchen. Das Schwein ist omnivor wie der Mensch, besitzt nur einen Magen und hat sich deshalb auch als geeignet für Fütterungsstudien gezeigt. Das ist von Vorteil, da nach Magenresektionen verschiedene Verdauungsstörungen auftreten können, die so untersucht werden können. Außerdem ist die relative Größe der Wirbel der Minipigs vergleichbar mit den menschlichen Wirbeln und somit geeignet für eine Computertomographie (Maier et al, 1995).

Nicht nur Sekundärerkrankungen, die sich auf den Knochen auswirken, können am Tiermodell Minipig untersucht werden, auch Primärerkrankungen. Lafage et al (1995) nutzten das Minipig, um die Wirkung von Alendronaten und Fluoriden als Osteoporosetherapie auf den spongiösen und kortikalen Knochen zu vergleichen.

Der Knochenstoffwechsel wurde von Tsutsumi et al (2004) an 53 Göttinger Minipigs erforscht. Die Knochendichte wurde an Lumbalwirbelkörpern und dem Femur gemessen. Direkt postnatal waren die Konzentrationen der Knochenmarker am höchsten, mit steigendem Alter sanken die Werte. Wenn man berücksichtigt, dass Schweine eine höhere Knochendichte und ein dichteres trabekuläres Netz besitzen, sind sie als Tiermodell für Versuche bezüglich des Knochens geeignet (Tsutsumi et al, 2004).

Um ein Großtiermodell für Osteoporose mit trabekulärem und kortikalem Knochenremodeling zu definieren, das für die weitere Medikamentenprüfung zuverlässig genug ist, um eine therapeutische Wirksamkeit während des Versuches zu zeigen, nutzten Mosekilde et al (1993) das ovariektomierte Minipig mit restriktiver Calciumgabe.

2.4 Osteoporose

2.4.1 Allgemeine Osteoporose

Nach der Deutschen Gesellschaft für Osteologie von 2006 wird die Osteoporose als „systemische Skeletterkrankung mit Verlust bzw. Verminderung von Knochensubstanz und –struktur, Störung der Mikroarchitektur und erhöhter Frakturanfälligkeit“ definiert. Beurteilt wird der Knochensubstanzverlust mit Hilfe der Osteodensitometrie. Je nach Messverfahren erhält man den Knochenmineralgehalt (Bone Mineral Content; BMC) oder die Knochendichte (Bone Mineral Density; BMD) als Ergebnis.

Eine Erniedrigung des Knochenmineralgehaltes oder der Knochendichte von mehr als 2,5 Standardabweichungen (SD) unter den Mittelwert für junge Erwachsene (T-Wert) gilt als Osteoporose. Eine schwere oder klinisch manifeste Osteoporose besteht, wenn eine oder mehrere Frakturen aufgetreten sind. Eine Osteopenie liegt dann vor, wenn die Knochendichte zwischen 1 und 2,5 SD unter dem Mittelwert liegt (World Health Organization, WHO, 1994).

In Tabelle 1 werden die verschiedenen Osteoporosestadien dargestellt.

Tabelle 1: Osteoporosestadien (nach WHO, 2006)

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

Man unterscheidet zwischen einer lokalisierten und einer generalisierten Osteoporose. Lokale Osteoporosen treten z.B. gelenksnah bei einer chronischen Arthritis oder bei längerer Immobilisation einer Gliedmaße auf. Generalisierte Osteoporosen teilt man in die primäre und die sekundäre Form ein. Als primäre Osteoporose bezeichnet man die

idiopathische, postmenopausale (Typ I) und altersabhängige/senile (Typ II) Osteoporose (Gambacciani and Ciaponi, 2000).

In der Menopause kommt es zu einem erhöhten Knochenturnover, der bei manchen Frauen durch Imbalancen die postmenopausale Osteoporose auslösen kann. Bei der postmenopausalen Osteoporose (Typ I) der Frau kommt es zu einem östrogenabhängigen trabekulären Knochenverlust in bzw. nach der Menopause, der durch den erhöhten Knochenturnover eingeleitet wird, durch Imbalancen wird dann die eigentliche Osteoporose ausgelöst. Der jährliche Knochenmasseverlust steigt von 0,5-1% auf 3-6% in den ersten Jahren der Menopause. Östrogen bremst den Knochenabbau und fördert die Einlagerung von Calcium in den Knochen. Diese frühe postmenopausale Osteoporose nennt man auch „High Turnover“-Osteoporose. Als Low Turnover-Osteoporose bezeichnet man die Osteoporose im späteren Verlauf der Menopause. Durch die abfallende Östrogenproduktion entfällt ein Schutzfaktor gegen osteolytische Faktoren und Stimulatoren für das Knochengewebe. Knochenzellen produzieren mehr osteolytische Zytokine. Interleukin 1 und 6 steigern die Knochenresorption, der keine adäquate Knochenformation gegenüber steht (Eriksen et al, 1990).

Durch die Steigerung der Knochenresorption wird Calcium in die Blutbahn freigesetzt (der Knochen wird entmineralisiert), dies hemmt die Parathormonsekretion (PTH). Die Calciumausscheidung im Urin wird in der Niere gleich zweifach gesteigert: Calcium wird vermehrt im Glomerulumfiltrat angeboten und infolge des PTH-Mangels tubulär weniger reabsorbiert. PTH aktiviert Vitamin D zu Calcitriol, daraus resultiert eine verminderte Calciumabsorption (Ritz et al, 1995).

Recker et al (1988) fanden heraus, dass die Aktivierungsfrequenz der Bone Remodeling Units (BRU, Zahl der Umbaueinheiten) steigt, dadurch ist ein größerer Teil der Knochenmasse dem Remodeling unterworfen.

Bei der senilen Osteoporose von Mann und Frau (Typ II) tritt ein altersabhängiger kortikaler und trabekulärer Knochenverlust auf. Bei Patienten mit Typ II Osteoporose findet ein langsamer, aber lang andauernder Knochenabbauprozess statt (Riggs and Melton, 1995).

Als idiopathische Osteoporose bezeichnet man eine Osteoporose mit ungeklärter Ursache. Die Diagnose „idiopathische Osteoporose“ wird häufiger beim Mann als bei der Frau gestellt. So fanden Resch et al (1992) bei 60 von 95 Männern mit osteoporotisch veränderten Wirbelkörperfrakturen keine den Knochendichteverlust erklärende Ursache und stellten deshalb die Diagnose idiopathische Osteoporose. Die idiopathische Osteoporose kommt als juvenile Osteoporose bei 8- bis 14-jährigen vor und als idiopathische Osteoporose junger Erwachsener bei 20- bis 35-jährigen vor.

Sekundären Osteoporosen liegt dagegen eine Grunderkrankung zugrunde oder in manchen Fällen eine Kombination aus Grunderkrankung und Risikofaktoren. Unter Risikofaktoren versteht man z.B. hormonelle Veränderungen, Stoffwechselstörungen, Medikamenteneinnahme und falsche Ernährung.

In Tabelle 2 werden die verschiedenen Osteoporoseformen dargestellt.

Tabelle 2: Einteilung der Osteoporoseformen (nach Kraenzlin, 1995; Stracke, 1992)

Primäre Osteoporose	<ul style="list-style-type: none"> • Postmenopausale Osteoporose (Typ 1) • Senile Osteoporose (Typ 2) • Idiopathische Osteoporose, juvenil
Sekundäre Osteoporose (als Folge einer Grundkrankheit)	<ul style="list-style-type: none"> • Endokrin • Iatrogen • Medikamentös • Gastrointestinal/alimentär • Myelogen/onkologisch • Parainfektios/immunogen • Genetisch • Inaktivität/Immobilisation • Komplexe(renale, intestinale) Osteopathien • Hereditäre Bindegewebserkrankungen

2.4.2 Bedeutung

Die Bedeutung der Osteoporose wird immer noch verkannt: Nur ein Drittel der für Osteoporose typischen Wirbelfrakturen werden vom Arzt als solche erkannt, nur 20% der Betroffenen werden behandelt (Götte und Dittmar, 2001). In der EU erleidet alle 30 Sekunden ein Bürger einen osteoporotischen Knochenbruch. In Europa gibt es jedes Jahr 400 000 Hüftfrakturen, 270 000 schmerzhafte Wirbelbrüche und 340 000 Unterarmbrüche. Diese Zahlen nehmen mit steigendem Alter der Bevölkerung zu: so wird z.B. die Zahl der Hüftfrakturen bis 2025 um 60% steigen (Ismail et al, 2002). Zusätzlich kommt erschwerend hinzu, dass die Lebenserwartung der Bevölkerung immer mehr steigt (Götte und Dittmar, 2001).

500 000 Krankenhausbetten werden jährlich europaweit mit Osteoporose-Patienten belegt, diese Zahl wird sich in den nächsten 50 Jahren verdoppeln. Das Lebenszeitrisiko einer Frau, eine Hüftfraktur zu erleiden, ist größer als die Summe aller Risiken für Brustkrebs, Gebärmutterhals- und Ovarialkrebs. Mehr als 4 Milliarden Euro werden jährlich für die stationäre Versorgung der Osteoporose ausgegeben (Finnern und Sykes, 2003).

2.4.3 Knochen und Markerscreening im Modell

2.4.3.1 Knochenaufbau

Knochen ist lebendes Gewebe. Er besteht aus einem Fasergerüst, das durch Calcium, Phosphor und andere Mineralien gehärtet wird. Der Knochen setzt sich aus einer äußeren, festen (kortikalen) Schicht (Kortikalis), die von der Knochenhaut (Periost) umgeben ist und einer inneren, schwammartigen, porösen (trabekulären) Schicht (Spongiosa) zusammen.

Die Kortikalis (Substantia compacta) besitzt große Widerstandskraft gegen Zug-, Scher- und Druckkräfte, dies ist auf die lamellenartige Struktur zurückzuführen, daraus folgt die Stützfunktion des Körpers. Die Spongiosa ist ein fein verzweigtes knöchernes Netzwerk aus Knochenbälkchen, Knochenblättchen und Knochenröhrchen. Dieses trabekuläre Knochengewebe befindet sich in der Zentralregion des Knochens und nimmt mit seiner großen Oberfläche das Knochenmark (Medulla ossium), das Fettgewebe und die Gefäße auf. Die Spongiosa unterstützt die Kortikalis bei

mechanischer Belastung durch die Ausrichtung ihrer Trabekel entlang der Zug- und Drucklinien (Jee, 1988).

Eine Änderung der physiologischen Zug-, Scher- und Druckkräfte hat einen Umbau des Knochens zur Folge. Er passt sich zeitlebens adaptiv durch Knochenaufbau (Osteoblasten) und Knochenabbau (Osteoklasten) an.

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

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

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

Durch das Zusammenspiel von Formation und Resorption kann Knochen lebenslang ersetzt und umgebaut werden. Im Wachstum findet vor allem ein formender Knochenaufbau statt, ist das Wachstum abgeschlossen, findet ein ständiger Umbau des Knochengewebes statt. Dies geht sowohl vom Haversschen System aus, das nur beim Menschen vorkommt, als auch von den periostalen und endostalen Oberflächen. Spongioser Knochen kann daher aufgrund der größeren Oberfläche schneller umgebaut werden als kompakter.

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

Knochenresorption über lokale Zellsignale der Osteoblasten, die wiederum die Osteoklasten aktivieren und so Calcium und Phosphat frei setzen. Außerdem steigert es die renale, tubuläre Reabsorption, sowie die intestinale Absorption von Calcium.

Auch 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ steigert die intestinale Calciumabsorption und die Rückresorption von Calcium in der Niere. Es unterliegt, wie auch Parathormon, einem negativen „Feedback“ Mechanismus. Calcitonin aus den C-Zellen der Schilddrüse wird bei einer Erhöhung des Calciumspiegels freigesetzt. Es hemmt direkt die Aktivität der Osteoklasten und steigert so den Einbau von Calcium in den Knochen.

Auch Insulin, Wachstumshormone und Östrogene sind an der Regulation des Knochenstoffwechsels beteiligt. Osteoblasten und Osteoklasten besitzen Östrogenrezeptoren. Östrogen hemmt die Knochenresorption mittels IL-6 (Interleukin 6) und beeinflusst die Knochenformation (Turner et al, 1994). Die Wirkung von Östrogen ist IGF-1 (Insulin like Growth Factor) abhängig. So kann durch Zugabe von IGF-1-Antikörpern die östrogeninduzierte Proliferation der Osteoblasten gehemmt werden (Ernst et al, 1989).

Lokal produzierte Faktoren, die meist von den Osteoblasten stammen, spielen ebenfalls eine Rolle. Eicosanoide, wie Prostaglandine und Leukotriene, Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1 (Transforming Growth Factor) und Zytokine können einen lokalen Einfluss auf den Knochen ausüben (Raisz, 1999). Die TGF- β 1-Synthese der Knochen steht unter dem Einfluss von Östrogen (Bracamonte, 2002). TGF- β steigert die Osteoblasten- und hemmt die Osteoklastentätigkeit (Lind, 1998). Die Wirkung von TGF wird durch andere Faktoren wie Calcitonin noch verstärkt (Bracamonte, 2002). TGF- β 1 wird somit als weiterer Mediator der Verknüpfung von Knochenformation und -resorption verantwortlich gemacht (Eismann, 1999).

2.4.3.2 Knochenmarker

Den Knochenumbau kann man anhand von Knochenmarkern im Blut und Urin messen. Es wird zwischen den Markern des Knochenaufbaus (Knochenformation) und des Knochenabbaus (Knochenresorption) unterschieden. Entweder sind es Enzyme der knochenauf- oder abbauenden Zellen oder Bestandteile des Knochens, die beim Auf- und Abbau freigesetzt werden.

Der Vorteil des Markerscreenings ist, dass dynamische Umbauvorgänge im Knochen bestimmt werden können. Es besteht keine Strahlenexposition wie z.B. beim Röntgen und der Computertomographie.

Von Nachteil ist allerdings, dass man die Umbauvorgänge am Knochen nicht lokalisieren kann, man kann nicht zwischen Spongiosa und Kortikalis oder zerstörter und intakter Knochensubstanz unterscheiden (Withold, 1996). Das Markerscreening kann die Knochendichtemessung und histologischen Untersuchungen nicht ersetzen, sondern unterstützt sie ergänzend (Mehl et al, 2002).

Da im gesunden Organismus Knochenauf und -abbau stets miteinander gekoppelt sind, sollte zur Beurteilung des Knochenstoffwechsels immer ein Formationsmarker mit einem Resorptionsmarker bestimmt werden. Um circadiane Schwankungen zu vermeiden, ist darauf zu achten, dass die Probennahme immer zu einem bestimmten Zeitpunkt erfolgt.

Eine Übersicht der in der Humanmedizin gebräuchlichen biochemischen Marker des Knochenstoffwechsels wird in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Knochenmarker (Seibel, 2005)

Knochenformation	Herkunftsgewebe	Medium	Nachweismethode
Knochenspezifische Alkalische Phosphatase	Knochen	Serum	ELISA
Osteocalcin (OC)	Knochen, Thrombozyten	Serum	ELISA, RIA
Carboxyterminales Propeptid	Knochen, Haut, Bindegewebe	Serum	ELISA

Knochenresorption	Herkunftsgewebe	Medium	Nachweismethode
Hydroxyprolin	Knochen, Knorpel, Bindegewebe, Haut, Nahrung	Urin	Colorimetrie, HPLC
Pyridinolin (PYD)	Knochen, Knorpel, Bänder, Sehnen	Urin	HPLC, ELISA, RIA
Desoxypyridinolin (DPD)	Knochen	Urin	HPLC, ELISA, RIA
Quervernetzte Telopeptide (NTx, CTx und ICTP)	Knochen (Haut)	Urin, Serum	ELISA, RIA
Receptor activator of nuclear factor KB Ligand (RANKL)	Knochen, Knorpel, Synovia	Serum	ELISA
Osteoprotegerin	Knochen, Knorpel, Synovia	Serum	ELISA

2.4.3.2.1 Biochemische Marker der Knochenformation

Eine Auswahl an Knochenmarkern wird hier beschrieben, wobei die Marker berücksichtigt wurden, für die ein Humanassay mit Kreuzreaktion beim Schwein gefunden wurde und die im Rahmen dieses Versuchs verwendet wurden.

2.4.3.2.1.1 Knochenspezifische Alkalische Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase (AP) ist ein ubiquitär vorkommendes, membranständiges Enzym, das aus Isoenzymen besteht, die in verschiedenen Geweben gebildet und nachgewiesen werden können. Beim Menschen wird die AP von vier Genen codiert. Man unterscheidet daher vier Isoenzyme: die nicht-gewebsspezifische, die intestinale, die plazentale und die Keimzell-AP.

Bei der knochenspezifischen Isoform der alkalischen Phosphatase handelt es sich um ein Glykoprotein, das auf der Zelloberfläche von Osteoblasten zu finden ist (Swaminathan, 2001) und an der Kalzifikation der Knochenmatrix mitwirkt. Der Unterschied in der Glykolisierung der Knochen- und Leberisoenzyme (Produkte des gleichen Gens) ist genutzt worden, um spezifische Antikörper gegen die

Knochenspezifische Alkalische Phosphatase (bone specific alkaline phosphatase, BAP) zu entwickeln.

Durch die Bestimmung von BAP lassen sich genauere Aussagen über den Knochenstoffwechsel treffen, da sie besser mit dem Knochenmasseverlust korreliert: BAP wird als hochspezifischer Marker für die knochenbildende Aktivität der Osteblasten betrachtet (Dresner-Pollak et al, 1996). Vor allem bei bestehenden hepatischen Erkrankungen kann die Messung von BAP die diagnostische Spezifität erhöhen (Woitge et al, 1996).

Erhöhte BAP-Serumkonzentrationen sind bei Situationen und Erkrankungen zu finden, die durch exzessiven Knochenumsatz gekennzeichnet sind, wie z.B. der postmenopausalen Osteoporose, Paget-Krankheit, Hyperparathyreoidismus, Hyperthyreose und metastasierenden Tumoren, und werden mit raschem Knochenmasseverlust assoziiert.

Diese rasch eintretenden Veränderungen der BAP-Konzentration korrelieren reziprok mit langfristigen Veränderungen der Knochenmineraldichte.

BAP ist ein empfindlicher Indikator für den erhöhten Knochenumsatz, der bei postmenopausalen Frauen und Osteoporose auftritt. Sowohl bei gesunden postmenopausalen als auch bei an Osteoporose leidenden Frauen sind die BAP-Werte signifikant höher als bei prämenopausalen Frauen. Bei Frauen mit Osteoporose sind die BAP-Werte signifikant höher als bei etwas jüngeren postmenopausalen Frauen (Pedrazzoni et al, 1996).

Ein enger Zusammenhang zwischen BAP-Konzentrationen und rapidem Knochenverlust wurde in der Hawaii Osteoporosis Study (Kohortenstudie) festgestellt. Frauen mit einem BAP-Wert von 2 SD unter dem Mittelwert weisen eine geringere Wahrscheinlichkeit eines schnellen Verlusts auf, während Frauen mit den höchsten BAP-Konzentrationen eine 80%-ige Wahrscheinlichkeit eines rapiden Knochenverlusts haben.

Der Zusammenhang zwischen BAP und Knochenmasseverlust entspricht dem zwischen Knochenmineraldichte und Fraktur, daraus folgt die wichtige Rolle von BAP als Knochenmarker für die Risikobewertung (Ross et al, 1998).

BAP kontrolliert die Effizienz einer Hormonersatztherapie und Bisphosphonaten, da sie aufgrund ihrer hohen Spezifität für Knochen eine empfindlichere Messung der Veränderungen im Knochenumsatz als die Gesamt- AP bietet. Dies wird z.B. durch eine Studie über 121 Frauen mit Osteoporose, die über ein Jahr mit 10 mg/Tag Alendronat behandelt wurden, gezeigt (Bettica et al, 1997).

In einer weiteren Studie wurde im Rahmen eines Doppelblindtests die Auswirkung von einer Placebo- und einer Östrogengabe zur Erhaltung und Erhöhung der Knochenmasse untersucht. BAP spiegelt die antiresorptive Wirkung der Hormonersatztherapie (HRT) wider: Mittlere BAP-Konzentrationen sanken im Durchschnitt um 32% zum Ausgangswert und erreichten einen Tiefpunkt nach 12 Monaten bei den Frauen, die sich der HRT unterzogen haben. BAP identifiziert nach kurzer Zeit mehr HRT-Responder als BMD, da die Sensibilität zwischen einer tatsächlichen biologischen Reaktion und der normalen Varianz zu unterscheiden höher ist (O'Halloran et al, 1993).

Auch bei der Wirksamkeit von Alendronaten spiegelt BAP den antiresorptiven Effekt bei Frauen mit Osteoporose wider. Die BAP Veränderungen werden bereits 6 bis 8 Wochen nach Therapiebeginn aufgezeigt im Gegensatz zur Knochendichtemessung, die Therapieveränderungen erst nach ca. einem Jahr zeigt (Ross et al, 1998).

Lane et al (2000) untersuchten die Fähigkeit der Knochenumsatzmarker danach, welche durch Parathormon induzierte Veränderungen in der BMD bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose, die mit Östrogen und Glukokortikoiden behandelt wurden, voraussagen können. BAP-, OC- und DPD-Konzentration stiegen als Folge der PTH-Behandlung an.

Chronisches Nierenversagen wird oft mit sekundären Knochenerkrankungen wie z.B. Osteoporose assoziiert und kann sich auf die Beurteilung der Knochenmarker negativ auswirken. BAP ist der empfindlichste und spezifischste Marker zur Evaluierung des Grades der Knochenremodellierung bei urämischen Patienten (Urena et al, 1999).

BAP kann bei Hunden, Kaninchen, Schweinen, Schafen, Ziegen, Rindern, Pferden und Makaken mittels ELISA nachgewiesen werden. Katzen, Eichhörnchen und Paviane besitzen keine BAP (Allen, 2003).

2.4.3.2.1.2 Osteocalcin

Osteocalcin (Bone Gla Protein; OC) liegt ausschließlich im Knochengewebe vor. Es ist ein extrahepatisches, Vitamin-K-abhängiges Protein mit einem Molekulargewicht von 5800, das von Osteoblasten und Megakaryozyten gebildet wird. Seine Synthese wird von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D reguliert. Da es nur von Osteoblasten in der Phase der Mineralisation der Matrix synthetisiert wird, stellt es einen sehr spezifischen Marker der Osteoblastenfunktion, bzw. der Mineralisation von Osteoid dar (Schmolke, 2001).

Es macht 10-20% aller nicht-kollagenen Proteine im Knochen aus. In Abhängigkeit von Vitamin K wird das Protein posttranslational modifiziert und drei Glutamatreste werden carboxyliert. An diese gamma-Carboxyglutamat-Reste kann wiederum Calcium binden.

Etwa 80% des aktiven Osteocalcins werden in den Knochen eingebaut, der Rest wird in die Blutzirkulation abgegeben, wo es zu einem raschen Abbau in verschiene Fragmente kommt. Werden die drei Glutamatreste nicht vollständig carboxyliert, so entsteht untercarboxyliertes Osteocalcin (ucOC).

Dies kann beim Menschen indirekt mit ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) gemessen werden. UcOC korreliert negativ mit der Knochendichte (Szulc et al, 1994) und erhöhte Werte stehen mit einem erhöhten Risiko einer Hüftfraktur in Zusammenhang (Vergnaud et al, 1997). Sowohl intaktes OC, als auch die N-terminalen, C-terminalen, N-Mid-terminalen und C-Mid-terminalen Fragmente, können mittels ELISA gemessen werden.

Osteocalcin kann als biochemischer Indikator für den Knochenumsatz hilfreich sein. Der Osteocalcin-Serumspiegel zeigt eine deutliche tageszeitliche Schwankung mit hohen Werten in den Morgenstunden, deshalb sollte der Zeitpunkt der Probennahme immer gleich sein (Grundberg et al, 1995). Sowohl die Erhöhung als auch die Verminderung des Osteocalcins sind pathologisch. Die Erhöhungen beruhen meist auf einer vermehrten Knochenumsatztätigkeit, wie bei der high-turnover Osteoporose, die Erniedrigung spricht meist für eine low-turnover Osteoporose.

Bei Osteoporosepatienten mit normaler Knochenumbauaktivität ergibt sich kein Unterschied zu einer altersgleichen skelettgesunden Kontrollgruppe (Delmas, 1985).

Bei der postmenopausalen Osteoporose können infolge der gesteigerten Knochenresorption bzw. reduzierten Knochenformation erhöhte Osteocalcinkonzentrationen auftreten.

In einer Vergleichsstudie zwischen Östrogen- und Calciumgabe bei postmenopausalen Osteoporosepatientinnen sanken die Osteocalcin-Werte signifikant zu denen der Kontrollgruppe. Damit eignet sich OC ebenfalls für das Monitoring einer Osteoporosetherapie (Chailurkit et al, 2001).

Da OC über die Nieren ausgeschieden wird, kann der OC-Wert bei Nierenversagen ansteigen. Dies gilt es bei einem erhöhten Knochenturnover bei Patienten mit chronischem Nierenversagen zu berücksichtigen (Price et al, 1995). Bei Ferkeln wurde ein erhöhter OC-Wert nach Glukokotikoid-Gabe gemessen (Guo et al, 2000; Ikeda et al, 2001). Carter et al validierten 1996 einen Osteocalcin-RIA für das Schwein. Serum-OC und Vit. D korrelieren negativ zur Knochenmineralisation von Schweinen bei einer Ca/P-reichen Fütterung.

Bei Menschen Pferden, Rindern, Schafen, Ziegen, Schweinen, Kaninchen und Primaten kann ein ELISA verwendet, für Hunde und Mäuse muss ein RIA (Radioimmuno Assay) verwendet werden.

2.4.3.2.2 Biochemische Marker der Knochenresorption

Eine Auswahl an Knochenmarkern wird hier beschrieben, wobei die Marker berücksichtigt wurden, für die ein Humanassay mit Kreuzreaktion beim Schwein gefunden wurde und die im Rahmen dieser Studie verwendet wurden.

2.4.3.2.2.1 Pyridinolin und Desoxypyridinolin (Kollagen-Crosslinks)

Die neu synthetisierten Kollagenfibrillen reifen nach der Ablagerung in der Knochenmatrix durch Ausbildung spezifischer Quervernetzungen, der Pyridinium-Crosslinks, Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) aus. Diese Vernetzungen zwischen den Aminosäuren der helikalen Region und der nicht-helikalen amino-(N) und carboxy-(C) terminalen Regionen werden Telopeptide genannt und sind für die große Stabilität der Kollagene verantwortlich.

Reifes Kollagen wird während des Knochenabbaus degradiert und gibt Pyridinium-Crosslinks als Degradationsprodukte ins Blut ab. Einerseits wird es im Urin ausgeschieden, andererseits kann man es im Serum nachweisen. Wird Knochengewebe abgebaut und Kollagen proteolytisch gespalten, so kommt es zur Freisetzung der Crosslinks. Diese werden aufgrund ihrer komplexen Struktur nicht weiter abgebaut und unterliegen einer raschen Elimination über die Niere (Calvo et al, 1996). Die Crosslinks liegen im Urin zum Großteil (90%) als gebundene Proteine vor, nur ein kleiner Teil ist ungebunden (Swaminathan, 2001).

Da diese Verbindungen fast ausschließlich im Knochen vorkommen und ihre Ausscheidung nicht durch die Synthese von neuem Kollagen beeinflusst wird, gelten die Pyridinium-Crosslinks als Parameter mit der größten Spezifität für Knochenresorption. PYD/DPD sind unabhängig von nutritiven Faktoren, ausschließlich in reifen Kollagenen anzutreffen und stellen nach bisherigem Kenntnisstand bei hoher Sensitivität sehr gewebspezifische Parameter dar.

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

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

Die Analyse der Crosslinks wird mittels HPLC (High Performance Liquid Chromathography) durchgeführt. Dies gilt als Referenzmethode des quantitativen Nachweises, aber auch die Bestimmung durch Immunassays ist möglich. Vor einer Messung mit HPLC müssen durch Aufbereitung der Proben mit Säurehydrolyse die Peptidbindungen gespalten werden (Black et al, 1988; Colwell et al, 1993). Nun liegen die Crosslinks in freier Form vor und nach weiterer Vorreinigung können die Konzentrationen an freiem Pyridinolin und Desoxypyridinolin in einem Lauf an der HPLC bestimmt werden (Wehr et al, 1997). Messungen der Crosslinks wurden sowohl bei Hunden als auch bei Schweinen und Pferden durchgeführt (Wehr et al, 1997).

Bei Patienten mit Osteoporose korrelieren die Kollagen-Crosslinks gut mit histomorphometrischen Auswertungen. Die Ausscheidung von PYD und DPD weist einen alterskorrelierten Anstieg auf, bei Männern verläuft dieser etwa linear, bei Kindern im Wachstum treten große Schwankungen auf. Bei Frauen ist ein perimenopausaler Anstieg um 50-100% zu beobachten, der durch eine Hormonersatztherapie auf die ursprünglichen Werte gesenkt werden kann (Seibel et al, 1993; Delmas et al, 1993).

Eine Kreuzreaktion für Hunde, Pferde, Rinder, Schafe, Schweine, Kaninchen und Primaten liegt vor (Allen, 2003).

2.4.3.2.2 Crosslaps

Neben den peptidfreien Kollagen-Crosslinks können auch peptidgebundene Formen nachgewiesen werden. Für die Bestimmung von aminoterminalen (NTX) und carboxyterminalen (CTX, Crosslaps) Telopeptiden stehen Immunoassays zur Verfügung. Mangelnde Spezifität der Tests führt dazu, dass die Telopeptide zwar von den Antikörpern erkannt werden, aber die daran gebundenen Crosslinks nicht differenziert werden können. Daher kann nicht zwischen Telopeptiden aus dem Knochen und z.B. der Haut unterschieden werden (Scariano et al, 2002). Es ist eine hohe individuelle Variabilität vorhanden (Scariano et al, 2002). Trotz dieser geringeren Spezifität im Vergleich zu den Crosslinks gibt es Studien, die beim Menschen eine Korrelation mit der Knochenresorption und mit anderen Knochenmarkern festgestellt haben (Seifert-Klauss et al 2002; Rico et al 2002).

Bei postmenopausalen Frauen korrelieren quervernetzte Telopeptide mit dem Knochenabbau, wie in histomorphometrischen Analysen von Knochenbiopsien festgestellt werden konnte (Eriksen et al, 1993). NTX/CTX im Urin scheinen sensitive Indikatoren für Knochenresorption zu sein, die mit hohen Werten eine starke Osteoklastenaktivität anzeigen. Quervernetzte Telopeptide werden für das Monitoring im Zuge einer Osteoporosetherapie mit Bisphosphonaten oder Hormonen genutzt (Rosen et al, 1994; Bonde et al, 1995; Filipponi, 1994).

Serum-Crosslaps gelten als sensitivste Marker, die am besten und schnellsten das positive Ansprechen auf eine Vielfalt von antiresorptiven Therapien (Calcium, Calcitonin, Östrogen und Bisphosphonate) widerspiegeln (Chailurkit et al, 2001).

Auch Bjamason et al (2000) stellten eine Korrelation zwischen Serum-NTX/CTX und Knochenmineraldichte an 120 älteren Frauen mit Alendronate-Gabe fest.

Für Hunde, Pferde, Schafe, Schweine und Primaten liegt eine Kreuzreaktion vor (Allen, 2003).

2.4.4 Großtiermodelle in der Osteoporoseforschung

In der derzeitigen Osteoporoseforschung werden Tiermodelle genutzt, an denen die Pathogenese, die Wirksamkeit von Medikamenten oder der Einsatz orthopädischer Implantate untersucht werden kann.

Eine klinische Studie ist mit enormem Zeitaufwand verbunden, da die Krankheit nur sehr langsam fortschreitet. Zudem gibt es sehr viele individuelle Einflussfaktoren, die sich auf die Ergebnisse der Studie auswirken. Dazu zählen unter anderem Ernährung, Alkohol- und Nikotinkonsum oder körperliche Aktivität (Heaney, 1996). Aus diesem Grund ist es kaum möglich, einheitliche Studiengruppen aufzustellen.

Bei einem Tiermodell kann man dagegen die Umgebungsbedingungen so gestalten, dass die oben genannten Limitationen minimiert werden. Außerdem lässt sich die Studiendauer durch die künstliche Erzeugung der Menopause beim Tier erheblich verkürzen. Eine kürzere Studiendauer ist auch bei der Überprüfung von neuen Medikamenten vor der klinischen Prüfung gesetzlich vorgeschrieben. Die Food and Drug Administration (FDA) verlangt seit 1994 für die Zulassung neuer Medikamente für die Osteoporosetherapie die Überprüfung der Wirksamkeit sowohl an der Ratte als auch an einem Großtiermodell (Thompson et al, 1995).

Ein weiterer Grund für die Verwendung von Großtiermodellen in der Osteoporoseforschung ist die Tatsache, dass man orthopädische Implantate nicht am Tiermodell Ratte testen kann. Die speziellen Ansprüche des osteoporotischen Knochens erfordern die Entwicklung von Implantaten, die im Knochen optimal verankert werden können (Turner, 2001). Zur Erforschung von biologischen und

biomechanischen Eigenschaften ist der Test an einem Tiermodell zwingend notwendig (Turner 2001).

Ein gutes Tiermodell muss verschiedene Anforderungen erfüllen: Es sollte der Fragestellung angemessen und für ihre Beantwortung geeignet sein (Rodgers et al, 1993). Angemessen und geeignet heißt in diesem Zusammenhang, dass ein Tiermodell benutzt wird, welches auf die humane Situation übertragen werden kann und bei dem die Ergebnisse generalisiert werden können. Die Organismen sollten genetisch einheitlich sein, damit individuelle Unterschiede möglichst gering gehalten werden.

Außerdem ist es natürlich von Vorteil, wenn man die Tiere kostengünstig und ohne Schwierigkeiten erwerben kann. Bei experimentellen Manipulationen sollten die Tiere einfach und gefahrlos zu handhaben sein. Vor der Entscheidung für ein bestimmtes Tiermodell müssen zu guter Letzt Überlegungen zur ökologischen, ethischen und sozialen Unbedenklichkeit stehen (Davidson et al, 1987).

Für die Osteoporoseforschung muss darüber hinaus geklärt werden, wann bei dem entsprechenden Tiermodell die „Peak Bone Mass“ erreicht wird und ob es anschließend zu alters- oder östrogenabhängigem Knochenverlust kommt. Es ist wichtig zu wissen, ob der Knochenverlust den kortikalen und spongiösen Knochen gleichermaßen betrifft und ob dieser so stark ist, dass es – wie beim Menschen – zu spontanen Frakturen kommt (Turner, 2001).

Durch die Ovariectomie (OVX) bzw. Ovariohysterektomie (OHX) kann eine Aufhebung des Sexualzyklus mit Einstellung der Hormonproduktion und den damit einhergehenden Auswirkungen auf den Knochen, herbeigeführt werden. Manchmal reicht der Effekt der OVX bzw. OHX auf den Knochen nicht aus. In diesem Fall muss versucht werden, durch Zugabe oder Restriktion von Futtermittelzusätzen wie Mineralien oder Spurenelementen und Medikamenten wie Glukokortikoide dies zu forcieren (Egermann et al, 2005).

Kein Tiermodell kann alle diese Anforderungen erfüllen. Vor Beginn einer Studie muss man daher genau abwägen, welches Tiermodell für die Beantwortung der entsprechenden Fragestellung am besten geeignet ist. Es kann durchaus sein, dass mehrere Modelle herangezogen werden müssen, weil ein einziges Modell nicht ausreicht.

2.4.4.1 „Ovariectomiertes Tiermodell“

Durch die Ovariectomie bzw. Ovariohysterektomie eines Tiermodells kann eine Aufhebung des Sexualzyklus mit Einstellung der Hormonproduktion, und den damit einhergehenden Auswirkungen auf den Knochen, herbeigeführt werden.

Osteoblasten und Osteoklasten besitzen Östrogenrezeptoren. Östrogen bremst den Knochenabbau und fördert die Einlagerung von Calcium in den Knochen.

Durch die abfallende Östrogenproduktion bzw. den Mangel an Östrogen entfällt ein Schutzfaktor gegen osteolytische Faktoren, die skelettale Sensitivität für PTH steigt. Stimulatoren für das Knochengewebe entfallen ebenfalls, die Zahl der Osteoblasten geht zurück und die Knochenformation sinkt (Järvinen et al, 2003). Es kommt nicht mehr zum programmierten Zelltod (Apoptose) der Osteoklasten, die wiederum mehr osteolytische Zytokine produzieren: Interleukin 1 und 6 steigern die Knochenresorption, der keine adäquate Knochenformation gegenüber steht (Eriksen et al, 1990).

Manchmal reicht der Effekt der OVX bzw. OHX auf den Knochen nicht aus, da die verschiedenen Tiermodelle unterschiedlich reagieren: z.B. kommt es bei Primaten zu einem deutlichen Verlust die BMD, bei Hunden dagegen ändert sich die BMD nur unwesentlich (Egermann et al, 2005). Dann muss versucht werden, durch Restriktion von Futtermittelzusätzen wie Mineralien oder Spurenelementen und Zugabe von Medikamenten wie Glukokortikoide dies zu forcieren (Egermann et al, 2005).

Spencer et al begannen bei Schweinen im Alter von sieben Wochen mit einer Ca/P-Restriktionsdiät, die sich nach einer Trächtigkeit zu Beginn der Laktation in einer Osteopenie mit anschließenden osteoprotischen Spontanfrakturen niederschlugen (1979).

Glukokortikoide stimulieren die Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen zu Osteoklasten, gleichzeitig wird der Kontrollmechanismus zur Regulierung der überschießenden Differenzierung zu Osteoklasten und die Differenzierung von Osteoblasten aus Osteoblastenvorläuferzellen gehemmt. Es kommt zur vorzeitigen Apoptose von Osteoblasten. Es wird also die Knochenformation reduziert und die Knochenresorption stimuliert (Silvestrini et al, 2001).

2.4.4.1.1 Ovariectomierte Primaten

Mitte der 80er Jahre wurden erstmals ovariectomierte nicht-humane Primaten (Paviane, Makaken) in der Osteoporoseforschung eingesetzt (Jayo et al, 1994). Affen besitzen erhebliche Vorteile gegenüber anderen Tiermodellen: Sie sind in ihrer Anatomie und Physiologie dem Menschen am ähnlichsten. Insbesondere der Gastrointestinaltrakt, die endokrinen Verhältnisse und der Knochenstoffwechsel entsprechen den Gegebenheiten beim Menschen. Zudem besitzen sie eine dem Menschen ähnliche Biomechanik des Bewegungsapparates. Ein ganz entscheidender Vorteil liegt darin, dass Paviane und Makaken im Gegensatz zu allen anderen Tiermodellen zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr eine natürliche Menopause ausbilden.

Die Peak Bone Mass wird etwa im Alter von neun Jahren erreicht (Jayo et al, 1994). Affen besitzen wie der Mensch kortikale Knochenosteone und zeigen daher kortikales Remodeling. Von Miller wurde 1986 nach Ovariectomie eine signifikante Verminderung des trabekulären Knochenvolumens an der Wirbelsäule nachgewiesen. Zudem erhöht sich infolge der Ovariectomie die Frakturneigung.

Doch haben Affen als Tiermodelle auch Nachteile. Die Zahl der verfügbaren Affen mit abgeschlossenem Knochenwachstum (>9 Jahre) ist äußerst beschränkt. Andererseits ist es aber auch zu kostenintensiv, junge Affen zu erwerben und sie bis zu diesem Alter zu halten. Die meisten zu Versuchszwecken gehaltenen Affen sind daher zwischen vier und sieben Jahre alt (Jerome et al, 1993). Dies ist bezüglich der noch nicht erreichten Peak Bone Mass problematisch. Zu berücksichtigen ist auch, dass Affen sehr hohe Anforderungen an Haltung und Handhabung stellen.

Bei Einzelhaltung kann es zu Knochenverlust kommen, der allein von der Inaktivität des Tieres herrührt. Bei der Haltung in Gruppen ist dagegen durchaus damit zu rechnen, dass Tiere nach Rangordnungskämpfen zu Tode kommen.

Ein sehr großes Problem stellt das Zoonose-Risiko dar. Affen besitzen nur eine geringe natürliche Resistenz gegen Tuberkulose. Daher kann der Kontakt mit dem Bakterium überaus schnell zum Tode einer ganzen Versuchspopulation führen

(Brommage, 2001). Umgekehrt ist auch eine Übertragung von Retro- oder Herpes B-Viren vom Affen auf den Menschen möglich (Brommage, 2001; Turner, 2001).

Auch die Ovariectomie der Tiere ist nicht unproblematisch: bei den oft verwendeten Langschwanzmakaken laufen sogar bei nur noch 5% ihres Ovargewebes normale Zyklen ab (Lundon et al, 1994). Die chirurgische Entfernung der Ovarien muss daher mit größter Sorgfalt geschehen und das Gelingen der Operation muss anhand des Serum-Östradiol-Spiegels überprüft werden (< 10 pg/ml) (Lundon et al, 1994).

Als eines der wichtigsten Argumente gegen Primaten als Tiermodell ist jedoch die absolute Nulltoleranz der Öffentlichkeit in Europa gegenüber Tierversuchen an Primaten zu berücksichtigen. Die meisten der vorliegenden Untersuchungen stammen aus dem asiatischen Raum.

2.4.4.1.2 Ovariectomierte Schafe

Das Schaf wird aufgrund seiner genügsamen Haltung und Pflege häufiger als Tiermodell genutzt. Durch die Körpergröße ist das Schaf für die Erprobung von Prothesen sehr gut geeignet. Auch die wiederholte Gewinnung von Blut- oder Urinproben ist ebenso wie die Entnahme von Knochenbiopsaten problemlos möglich.

Schafe haben einen saisonal polyöstrischen Zyklus, der abhängig von Rasse und Tageslichtlänge zwischen 14 und 21 Tage lang ist (Rodgers et al, 1993; Newman et al, 1995). Die Jahreszeit beeinflusst auch die Knochendichte: Während der anöstrischen Wintermonate ist die Knochendichte geringer (Hornby et al, 1995).

Das Schaf bildet keine natürliche Menopause aus. Verschiedene Studiengruppen haben allerdings nachgewiesen, dass eine Ovariectomie zu Osteopenie führt. In einigen Studien fiel der Knochenverlust nach Ovariectomie allerdings eher moderat aus. Turner et al konnten 1995 keine Unterschiede zwischen ovariectomierten Tieren und einer Kontrollgruppe in der Knochendichte des Calcaneus und des distalen Radius feststellen (Turner et al, 1995a). Die Änderung der Knochenmineraldichte an der Lendenwirbelsäule (L4) bezogen auf den Zustand vor der Ovariectomie lag bei den operierten Tieren nach drei Monaten bei -2,5% und nach sechs Monaten bei -1% (Turner et al, 1995a).

In einer weiteren Studie, bei der die Knochenmineraldichte erst zwölf Monate nach der Ovariectomie gemessen wurde, konnten keinerlei Unterschiede nachgewiesen werden (Turner et al, 1995b). Dagegen fanden Fini et al (2000) in ihrer Studie nach 12 Monaten eine signifikante Reduktion des trabekulären Knochenvolumens und der trabekulären Dichte.

Auch Newton et al (2004) untersuchten den Effekt der Ovariectomie auf den Knochen von Schafen. Sieben ovariectomierte Schafe wurden ein Jahr lang beobachtet, alle drei Monate nach Ovariectomie wurden Blut- und Urinproben gewonnen, um Östradiol, Osteocalcin und Desoxypyridinolin zu bestimmen. Ein Jahr nach der Ovariectomie hatten sich die Knochendichte und das Knochenvolumen verringert und die Trabekelabstände im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Östradiol war erheblich niedriger geworden und Osteocalcin und DPD waren erhöht (Newton et al, 2004). Diese Ergebnisse zeigen, dass sich das ovariectomierte Schaf als Osteoporosemodell eignet. Allerdings sind die Effekte auf den Knochen erst nach einem längeren Zeitraum zu erkennen.

Durch eine ständige Gabe von Glukortikoiden, kann der Knochenmasseverlust forciert und schneller erzielt werden. Dabei kommt es zu einer Verringerung der Knochendichte am Gesamtknochen um 5-15% und am trabekulären Knochen sogar um bis zu 30%. Diese Veränderungen sind am Gesamtknochen reversibel, am trabekulären Knochen bleiben sie jedoch bis zum Versuchsende bestehen (Schorlemmer, 2003). Beeinflusst wird auch die Knochenarchitektur: Knochenvolumen, Knochenoberfläche und die Dicke der Trabekel sind stark verändert (bis 30%). Die Anzahl der Trabekel bleibt dagegen gleich. Knochen von behandelten Tieren sind weniger steif (20-60%) und brechen schon unter geringerer Belastung als Knochen von Kontrolltieren.

Die Neubildungsrate von Osteoid ist unter Östrogenmangel und Glukokortikoideinfluss merklich reduziert (50-70%) (Schorlemmer, 2003). Somit stellt das ovariectomierte und glukokortikoid-behandelte Schaf ein gutes Modell für osteopenischen Knochen dar. Anhand dieses Tiermodells wird es möglich sein, besondere Verankerungsmechanismen oder speziell für den Osteoporosepatienten entwickelte Implantate direkt am porösen Knochen zu testen. Für die Erprobung neuer

orthopädischer Techniken zur chirurgischen Versorgung osteoporotischer Frakturen ist dieses Modell gut geeignet (Schorlemmer, 2003).

Ebenfalls beschäftigten sich Goldhahn et al (2005) mit dem Tiermodell glukokortikoidbehandeltes ovariektomiertes Schaf zur Implantatnutzung. Die Knochenmineraldichte des spongiösen Knochens in beiden distalen Radien wurde mit quantitativer Computertomographie überwacht. Das Cortisonniveau wurde in dreiwöchigen Abständen festgestellt. Strukturelle Parameter des Knochens wurden in den Biopsien des 6. Lumbalwirbels und des rechten Hüftkammes mit Mikro-CT gemessen. Da nach Absetzen der Glukokortikoide sich die Zunahme der Knochenmassedichte sehr lange verzögert, kann dieses Zeitfenster zur Implantatprobung genutzt werden (Goldhahn et al, 2005).

2.4.4.1.3 Ovariektomierte Hunde

Auch Hunde werden in der Osteoporoseforschung als Versuchstiere eingesetzt. Hunde sind in Beschaffung und Haltung wesentlich billiger als Primaten. Auch ihre Handhabung bereitet weniger Schwierigkeiten. Jedoch ist die öffentliche Akzeptanz von Versuchen am Hund ebenso wie die an Primaten sehr schlecht.

Das Tiermodell Hund wird aufgrund der starken Ähnlichkeiten im Knochenaufbau und -stoffwechsel von Hund und Mensch gewählt. Im Vergleich des trabekulären Knochens von Hund und Mensch konnten Kuhn et al (1989) erhebliche Ähnlichkeiten sowohl quantitativ, als auch qualitativ feststellen.

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

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

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

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

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

In einer Studie kam es nach OHX zu einem Anstieg der Exkretion der Crosslinks (PYD und DPD) im Urin. Allerdings zeigte sich in der Kontrollgruppe bei beiden Knochenmarkern ein deutlich höherer Anstieg. Vier Wochen nach OHX konnte die maximale Steigerung der Knochenresorption gemessen werden (Kern, 2004). Dies entspricht Ergebnissen bei Schweinen (Wirner, 1997) und Ratten (Krammer, 2001), bei denen ebenfalls nach vier Wochen eine deutlich gesteigerte Resorption nachgewiesen werden konnte. Es kann daher angenommen werden, dass diese Veränderungen beim Hund ebenfalls durch die OHX ausgelöst wurden.

Beim Menschen kann die Steigerung des Knochenturnovers nachfolgend einen Verlust an Knochenmasse verursachen, wobei die Formations- und die Resorptionsmarker negativ mit der Knochendichte korrelieren (Dresner-Pollak et al, 1996). Von den Markern können daher auch Rückschlüsse auf die Knochendichte und das Frakturrisiko gezogen werden (Looker et al, 2000).

Malluche et al (1990) nutzten den Beagle als Tiermodell, um den Knochenmasseverlust nach Aussetzen der Ovarfunktion zu studieren. Sie demonstrierten den Knochenmasseverlust, der mit einer Unzulänglichkeit der Osteoblasten bei 4 Monaten nach Ovarhysterektomie (OHX) verbunden ist. Diese Studie wurde entworfen, um durch vier aufeinanderfolgende Monatsknochenbiopsien die Entwicklung und den Verlauf der histologischen Knochenabweichungen nach OHX auszuwerten.

Es wurden verringertes spongiöses Knochenvolumen, verminderte trabekuläre Dichte und der dadurch entstehende größere Abstand zwischen den Trabekeln (p weniger als 0,05) und eine geringere Wandstärke (p weniger als 0,05), schon einen Monat nach OHX gefunden (Malluche et al, 1990). Nach 2 Monaten gab es eine Abnahme an der Knochenoberfläche und der Mineralisierungsrate (p weniger als 0,05). Volumen und Oberfläche des Osteoids wurden nach 3 Monaten (p weniger als 0,05) erhöht, und es kam zu einer Zunahme der Osteoblasten (p weniger als 0,01).

Diese Resultate weisen auf eine frühe Phase des Eintritts des Knochenmasseverlustes bezogen auf die Hyperresorption des Knochens hin (Malluche et al, 1990).

2.4.4.1.4 Minipigs als Osteoporosemodell

Die Größe der herkömmlichen Schweinerassen ist der limitierende Faktor in ihrem Gebrauch als Tiermodell in der Untersuchung von Krankheiten. Die Züchtung des Minipigs (oder Micropigs) eliminiert dieses Problem. Die Reduzierung der Größe ergibt weniger Platzbedarf und einen leichteren Umgang. Allerdings sind Minipigs in der Anschaffung teurer als die herkömmliche Rassen.

Der Zyklus des Schweins ist dem der Frau sehr ähnlich: er ist asaisonal polyöstrisch mit einer Dauer von durchschnittlich 21 Tagen.

Eine weitere wichtige Ähnlichkeit ist, dass das Schwein omnivor und wie der Mensch monogastrisch ist, was von Bedeutung für die Metabolisierung von Medikamenten ist.

Mehrere Merkmale des Skeletts der Minipigs sind mit denen des Menschen vergleichbar. Das Skelett zeigt ein umfangreiches Remodeling in der Spongiosa und metaphysär in der Kortikalis des Knochens. Das Schwein besitzt eine definierbare Peak Bone Mass im Alter von 2,5 bis 3 Jahre (Bouchard et al, 1995). Schweine gehören zu den wenigen Tieren, die spontane Wirbelfrakturen zeigen (Spencer et al, 1979). Da Schweine Vierfüßer sind, haben sie eine größere Knochenmasse und ein dichteres trabekuläres Netz als Menschen (Mosekilde et al, 1993). Sie sind ebenso wie Hunde groß genug für orthopädische Implantate, verkraften wiederholte Knochenbiopsien und häufigere Entnahmen größerer Blutmengen. Knochensubstanzverlust und Ablagerung in trabekulären und kortikalen Knochen ergeben einen vergleichbaren Wert mit denen des Menschen, außerdem besitzt das Schwein ebenso wie der Mensch Lamellenknochen (Mosekilde et al, 1987).

Der Knochenstoffwechsel wurde von Tsutsumi et al an 53 Göttinger Minipigs erforscht (2004). Es wurden von allen Tieren Urin- und Blutproben genommen, aus denen die Knochenmarker BAP, Osteocalcin, Crosslaps und Desoxypryridinolin bestimmt wurden. Die Knochendichte wurde an Lumbalwirbelkörpern und dem Femur gemessen. Direkt postnatal lagen die höchsten Werte bei Knochenmarkern und Knochendichte vor, die sich mit steigendem Alter verringerten. Die Wachstumsfugen waren im Alter von 42 Monaten vollständig geschlossen (Tsutsumi et al, 2004).

Die Peak Bone Mass wurde in den Lumbalwirbelkörpern und im Femur zwischen 21 und 25 Monaten erreicht. Vor dem Wachstumsfugenverschluß erhöhten sich BMD/BMC drastisch und stiegen weiterhin stetig bis zum Alter von 72 Monaten. Eine hohe negative Korrelation wurde zwischen den Knochenmarkern und der Knochenmassedichte bestätigt. Diese Resultate zeigen an, dass die Knochenumsatzgeschwindigkeit mit der Knochenwachstumsgeschwindigkeit in weiblichen Göttinger Minipigs gleichbleibend ist (Tsutsumi et al, 2004).

In einer Studie von Mosekilde et al (1993) wurde das ovariektomierte Minipig mit restriktiver Calciumgabe genutzt, um ein Großtiermodell mit trabekulärem und kortikalem Knochenremodeling zu definieren, das für die weitere

Medikamentenprüfung zuverlässig genug ist, um eine therapeutische Wirksamkeit während des Versuches zu zeigen.

26 vier Monate alte Minipigs wurden zufällig in Gruppen eingeteilt: zwei mit einem Futter mit 0,90% Calcium und zwei mit einem mit Calciumgehalt von 0,75% bzw. 0,50% gefüttert. Im Alter von 10 Monaten, wurde jeweils ein Teil beider Gruppen ovariectomiert (OVX), während der jeweils andere Teil der Gruppen intakt belassen wurde. Die Gruppen wurden über sechs Monate beobachtet.

Die Studie deckte eine durch OVX verursachte Abnahme von 6% in der Mineraleichte des vertebraalen Knochens (BMD) und eine Abnahme von 15% im trabekulären Knochenvolumen auf (BV/TV). Demgegenüber wurden eine 15%-ige Zunahme der Trabekel und eine kleine Zunahme des Markraum-Sternvolumens (MA Stern V.) ermittelt. Die Strukturveränderungen wurden ausgeprägter, bei der OVX-Gruppe mit restriktiver Calciumgabe (0,75% CA.) mit einer Vergrößerung des MA Stern V. bis zu 164% (Mosekilde, 1993).

Die Antwort des Kochens auf die Ovariectomie wurde also durch eine Calcium-Reduktionsdiät verstärkt. In einer weiteren Studie mit ovariectomierten Sinclair-S1 Minipigs bei einer Fütterung mit auf 0,75% reduziertes Calcium waren deutliche Änderungen der Umwandlungsparameter erkennbar (z.B. ein Anstieg der Resorptionsmarker).

Dies lässt auf eine signifikante Veränderung in der Knochenstruktur, eine Abnahme der Knochenmasse und der biomechanischen Fähigkeit der Spongiosa der Wirbelkörper schließen (Mosekilde et al, 1993; Boyce et al, 1995).

Durch die Ergebnisse dieser Untersuchung bieten sich ovariectomierte Minipigs mit eingeschränkter Calcium-Fütterung (0,75%) als Tiermodell für die Forschung über den Knochenumbau des Menschen und des Knochenmasseverlust der postmenopausalen Frau an. Die Ovariectomie verursacht eine Reduzierung der vertebraalen Knochenmassedichte (BMD) um 11% in 12 Monaten (Bouchard et al, 1997).

Vergleiche der Erfolge einer 1-jährigen Therapie mit Fluoriden, Bisphosphonaten und Alendronate und deren Auswirkung auf die Knochenqualität und den Knochenumbau wurden an 9 Monate alten Minipigs bestimmt (Lafage et al, 1995).

Borah et al (2002) nutzten das ovariectomierte Minipig mit restriktiver Calciumgabe als Tiermodell, um den Effekt von Risedronate auf den Knochenstoffwechsel zu testen.

Die Minipigs wurden im Alter von 18 Monaten ovariektomiert und eine Gruppe für weitere 18 Monate täglich mit 0,5 mg/kg und eine mit 2,5 mg/kg Risedronate gefüttert. Bei beiden Wirkstoffgruppen waren die Veränderungen am Knochen im Gegensatz zur Kontrollgruppe im Mikro-Computertomogramm deutlich erkennbar, das Knochenmassevolumen war höher, wobei bei der Gruppe mit der 2,5 mg/kg Risedronate-Gabe die Knochenmassedichte noch größer war (Borah et al, 2002).

Der Knochenstoffwechsel, der Zyklus und die gastrointestinale Funktion von Schweinen sind positive Merkmale in Bezug auf den Nutzen dieser Tierart als Tiermodell. Allerdings sind der hohe Anschaffungspreis und die mangelnde Verfügbarkeit in manchen Regionen von Nachteil.

3 Material und Methoden

Ziel des Versuches war es einen Zusammenhang zwischen Knochenstoffwechsel und den einzelnen Zyklusphasen darzustellen und isolierte Effekte anhand von Knochenmarkern zu beurteilen. Der Versuch wurde mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt.

3.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Es wurden 16 Dresdner Minipigs in Einzelboxen mit Sichtkontakt („Dänisches System“) gehalten, die mit Stroh eingestreut wurden. Bei Versuchsbeginn waren die Schweine 12 Monate alt. Die Tiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 mit 5 Tieren, Gruppe 2 mit 11 Tieren. Aus Gruppe 1 wurde zum Zeitpunkt der Ovariohysterektomie Kontrollgruppe 1 mit 5 Tieren, aus Gruppe 2 wurden die Kontrollgruppe 2 mit 6 Tieren und die OHX-Gruppe mit 5 Tieren.

Die Tiere wurden halbjährlich mit Ivermectin s.c. (Ivomec®, Merial, Hallbergmoos) zur Parasitosenprophylaxe behandelt. Einmal wurde während des Versuchszeitraums eine Klauenpflege bei allen Minipigs durchgeführt.

3.2 Futtermittel

Die Tiere der Gruppe 1 (später Kontrollgruppe 1) wurden zweimal pro Tag mit insgesamt 550 g Alleinfuttermittel für Minipigs (Zimmermannwerke Landshut) gefüttert. Die Tiere Gruppe 2 (später Kontrollgruppe 2 und OHX-Gruppe) erhielten die gleiche Menge des Alleinfuttermittels für Minipigs, allerdings war hier der Calciumgehalt bei Bedarfsdeckung reduziert. Wasser stand den Tieren ad libitum in Form von Nippeltränken zur Verfügung.

Die Nährstoffgehalte der Futtermittel werden in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Nährstoffgehalte des Versuchsfutters nach Weender Analyse, Ca-/P-Gehalt des Futters nach Analyse

Nährstoffe	Gruppe 1		Gruppe 2	
	% uS	% TS	% uS	% TS
Rp	14,7	13,1	14,1	12,6
Rfe	2,2	2,0	2,6	2,3
Ra	8,1	7,2	8,3	7,4
Rfa	12,1	10,8	12,4	11,0
NfE	51,8	46,2	48,4	43,2
TS	89,2		89,2	

Elemente	Gruppe 1	Gruppe 2
Ca	0,9%	0,698%
P	0,701%	0,7%

3.3 Versuchsdurchführung

Der Versuch erstreckte sich über eine Dauer von 73 Wochen (65 Wochen vor OHX und 8 Wochen nach OHX), in denen in regelmäßigen Abständen Blutproben entnommen wurden, um einen Vergleich zwischen Knochenmarkern und Hormonzyklus zu erstellen. Nach einer Synchronisation mit dem Ziel, dass alle Tiere zur gleichen Zeit in Rausche kommen, und deren Nachweis mittels Progesterontest, wurden 4 Tiere ovariohysterektomiert. Die Tiere der Kontrollgruppen wurden intakt belassen.

Zwei, vier, sechs und acht Wochen nach der Ovariohysterektomie wurde jeweils Serum gewonnen, um die Knochenparameter Osteocalcin, knochenspezifische Phosphatase, Pyridinolin und Crosslaps, Progesteron und Östradiol zu bestimmen.

3.4 Synchronisation

Um alle Tiere in denselben Zyklusstand zu bekommen, in diesem Fall den Östrus, wurde eine Synchronisation durchgeführt.

Allen Tieren wurde 18 Tage 2 ml Altrenogest (Regumate®, Intervet, Unterschleißheim) oral verabreicht. Am 19. Tag wurde allen Tieren PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin; Intergonan®, Intervet, Unterschleißheim) und am 22. Tag HCG (Human Chorionic Gonadotropin; Ovogest®, Intervet, Unterschleißheim) injiziert. Nach ca. 18 Stunden ovulierten die Schweine. Durch eine optische Rauschebeobachtung und einen Progesteronnachweis aus dem Serum, nach einer Woche (zum Zeitpunkt des Östrus), nach zwei Wochen (Metöstrus) und nach drei Wochen (Diöstrus), wurde dies verifiziert.

3.5 Serumgewinnung

Die Gewinnung des Serums erfolgte am nüchternen Tier durch Punktion der Vena jugularis dextra.

3.6 Ovariohysterektomie

Als Prämedikation wurde Ketaminhydrochlorid (10 mg/kg) (UrsoKetamin®, Bernburg AG, Serumwerk) und Azaparon (2mg/kg) (Stresnil®, Janssen, Neus), intramuskulär verabreicht. Nachdem das Tier in Rückenlage fixiert worden war, wurde die Bauchunterseite gewaschen, rasiert und desinfiziert. Über eine Atemmaske wurde Isofluran (Forene®, Abbott, Wiesbaden) als Inhalationsnarkose zugeführt. In die Vena auricularis intermedia wurde ein Venenzugang gelegt, während der OP wurde 0,9% NaCl-Lösung infundiert.

Die Ovariohysterektomie (OHX) geschah durch Laparotomie in der Linea alba. Der Hautschnitt begann etwa eine handbreit kaudal des Nabels und reichte bis etwa zwei Zentimeter kranial des vorderen Schambeinrandes. Anschließend wurden die Bauchmuskeln in der Linea alba durchtrennt und das Peritoneum eröffnet. Die Gebärmutter wurde am Corpus uteri beginnend aus der Bauchhöhle vorgelagert. An beiden Eierstöcken wurden Ligaturen am Mesovar gesetzt und dieses durchtrennt. Das Mesometrium wurde auf Höhe der Ovar-Ligaturen ebenfalls ligiert. Dann wurde

eine weitere Ligatur im Bereich der Zervix gesetzt und der Uterus kaudal der Zervix abgesetzt.

Die Schleimhaut des Vaginalstumpfes wurde exzidiert und die Wundflächen durch eine Diagonalnaht adaptiert. Anschließend wurde die Bauchhöhle schichtweise verschlossen. Für die Ligaturen und die Nähte von Bauchdecke und Unterhaut wurde resorbierbarer Faden verwendet (Vicryl® 6-0, Ethicon, Norderstedt), für die Hautnaht nicht resorbierbarer Faden (Prolene® 3-0, Ethicon, Norderstedt). Als Schmerzbehandlung erhielten die Tiere einmalig Vetalgin® (1ml/10kg) (Vetalgin®, Intervet, Unterschleißheim) und Meloxicam (1ml/50kg) (Metacam®, Boehringer, Ingelheim) und drei Tage lang Penicillin (1ml/10kg) (Procainpenecillin®, Animedica, Senden-Bösensell). Nach 14 Tagen wurden die Fäden gezogen.

3.7 Bestimmung der Serumparameter

3.7.1 Knochenspezifische Alkalische Phosphatase

Die Bestimmung der Knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase (BAP) erfolgte mit einem Enzymimmunoassay (EIA) der Firma Metra Quidel, Marburg (Katalog Nr. 8012), für den Allen (2003) eine Kreuzreaktion für das Schwein fand. Die im Serum vorliegende BAP wird an die mit einem Anti-BAP-IgG-Maus-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte gebunden. Nach der dreistündigen Inkubationszeit wird nicht gebundenes BAP durch viermaliges Waschen mit einer Waschlösung entfernt. Die Enzymaktivität wird mit Hilfe von p-Nitrophenylphosphat als Substrat bestimmt, das einen Farbkomplex mit der gebundenen BAP bildet. Nach Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 0,5 N NaOH als Stopplösung erfolgt die Messung der Farbintensität bei 405 nm im Assay Reader (Sunrise Remote, Tecan, Crailsheim). Die gemessene optische Dichte ist dabei direkt proportional zur BAP-Aktivität in der Probe.

3.7.2 Pyridinolin

Pyridinolin (PYD) wurde mit Hilfe eines kompetitiven Enzymimmunassay (EIA) der Firma Metra Quidel, San Diego, USA (Katalog Nr. 8019) bestimmt, für den Allen (2003) ebenfalls eine Kreuzreaktion fand. Das im Serum vorliegende Pyridinolin wird

an die mit einem polyklonalen Anti-PYD-Kaninchen-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte gebunden. Nach der Inkubation über Nacht wird nicht gebundenes PYD durch dreimaliges Waschen mit einer Waschlösung entfernt. Es folgt eine weitere einstündige Inkubation mit alkalischem Anti-Kaninchen-IgG-Phosphatasekonjugat, wieder werden durch dreimaliges Waschen ungebundene Reste entfernt. Die Enzymaktivität wird mit Hilfe eines p-Nitrophenylphosphat als Substrat bestimmt, das einen Farbkomplex mit dem gebundenen PYD bildet. Nach Abbruch der Reaktion durch 0,5 N NaOH als Stopplösung erfolgt die Messung der Farbintensität bei 405 nm im Assay Reader. Die gemessene optische Dichte ist zur PYD-Aktivität in der Probe proportional.

3.7.3 Progesteron

Progesteron wurde durch den Festphasen Radioimmunoassay Coat-a-Count RIA der Firma DCP Biermann GmbH, Bad Nauheim (Katalog Nr. PITKPG-4) bestimmt.

Jod-125 markiertes Progesteron konkurriert während einer dreistündigen Inkubationszeit mit dem Progesteron der Serumprobe um die Bindung an spezifische Antikörper, die an der Innenwand von Propylenröhrchen gebunden sind. Nach der Inkubation wird der Überstand abgesaugt und die an die Antikörper gebundene Fraktion in einem Gamma-Counter gemessen. Die Messwerte sind zu der Konzentration umgekehrt proportional. Durch den Vergleich mit, unter gleichen Bedingungen behandelten Standards, lässt sich die Konzentration des Progesteron im Serum aus der Standardkurve ablesen.

3.7.4 Östradiol

Die Bestimmung der Serum-Östradiol-Konzentrationen wurde mit dem Elecsys®, Östradiol-Reagenzien, Standards und Kontrollen (Fa. Seidel Medipool, Buchendorf) durchgeführt. Das Elecsys® 1010 Analysegerät ist ein vollautomatisches System zur Bestimmung von immunologischen Tests durch Elektrochemolumineszenz. Die chemolumineszierenden Reaktionen, welche die Lichtemission messen, werden elektronisch initiiert. Die Serumproben, Standards und Kontrollen werden in, mit einem Strich-Code versehenen Röhrchen verbracht, die vom Analysegerät erkannt werden.

Vor jedem Testdurchlauf wird das Gerät kalibriert, dann erfolgt die Durchführung automatisch.

3.8 Statistische Auswertung

Die Auswertung der in diesem Versuch gewonnenen Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm Sigmastat 3.0 für Windows.

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

Zu jedem Zeitpunkt vor der Ovariohysterektomie wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen 1 und 2, zu jedem Zeitpunkt nach der Ovariohysterektomie wurden die Unterschiede zwischen beiden Kontrollgruppen und der OHX-Gruppe bestimmt.

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

Außerdem wurden innerhalb der Gruppen die Unterschiede zu jedem Zeitpunkt bestimmt. Signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe wurden mit ^{ab} gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse am intakten Minipig vor Ovariohysterektomie

4.1.1 Allgemeinbefinden und Gewichtsentwicklung

Die Tiere wurden zu Versuchsbeginn nach Gewicht randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 bekam ein Alleinfuttermittel für Minipigs mit 0,9% Calcium-Gehalt, Gruppe 2 bekam das Alleinfuttermittel für Minipigs mit 0,69% Calcium-Gehalt. Zum Zeitpunkt der OHX (Ovariohysterektomie) wurde Gruppe 2 in die Kontrollgruppe 2 und die OHX-Gruppe aufgeteilt.

Das Allgemeinbefinden der Versuchstiere war während des Versuchszeitraums ungestört, bis auf zwei Tiere, die an Anorexie litten und drei Tage lang mit Florfenicol (Nuflor®, Provet AG, Lüssach, Schweiz) behandelt wurden, wonach sich ihr Befinden verbesserte und die Futteraufnahme wieder ungestört war.

Aus Tabelle 5 gehen die mittleren Gewichte von beiden Gruppe hervor.

Tabelle 5: Mittlere Gewichte beider Gruppen (MW ± STABW) in kg der Minipigs der Gruppe 1, Ca 0,9%, (n=5) und der Gruppe 2, Ca 0,69%, (n=11) im Zeitraum vor OHX

Alter in Wochen	Gruppe 1 (Ca 0,9%)	Gruppe 2 (Ca 0,69%)
48	10,26 ± 1,52	9,48 ± 2,61
50	10,75 ± 1,51	10,22 ± 2,79
55	14,49 ± 1,92	13,33 ± 3,82
59	17,49 ± 1,62	16,48 ± 4,48
63	19,39 ± 2,09	18,35 ± 4,87
67	20,69 ± 1,24	19,01 ± 4,94
69	21,29 ± 1,32	20,48 ± 5,22

70	23,23 ± 1,36	20,77 ± 5,27
72	26,66 ± 0,72	23,64 ± 5,94
73	26,10 ± 1,67	24,41 ± 6,89
82	27,01 ± 1,76	25,81 ± 6,61

ab: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe zu einem Untersuchungszeitpunkt
xy : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen

Während des gesamten Versuchszeitraums nahmen die Minipigs stetig zu. Im Alter von 48 Wochen wogen die Tiere beider Gruppen im Mittel um die 9,87 kg, mit 82 Wochen 26,41 kg.

Es lagen zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Gewichtsunterschiede zwischen den Gruppen oder innerhalb einer Gruppe vor.

4.1.2 Knochenspezifische Alkalische Phosphatase im Serum

Im Serum wurde der Knochenformationsmarker BAP gemessen. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse beider Gruppen sowie das Alter zum Entnahmezeitpunkt dargestellt.

Tabelle 6: Mittlere Konzentrationen von BAP (MW \pm STABW) in IE/l im Serum der Minipigs der Gruppe 1 (n=5) und der Gruppe 2 (n=11) im Zeitraum vor OHX

Alter in Wochen	Gruppe 1 (Ca 0,9%)	Gruppe 2 (Ca 0,69%)
48	43,73 \pm 7,33	39,51 \pm 12,21
55	43,28 \pm 8,32	52,50 \pm 9,34
63	33,02 \pm 6,28	41,55 \pm 7,32
67	24,97 \pm 2,07	32,69 \pm 6,77
69	28,56 \pm 6,98	25,69 \pm 3,84
70	29,38 \pm 7,01	25,13 \pm 4,09
72	27,14 \pm 5,79	27,03 \pm 6,73
73	21,29 \pm 4,06	26,10 \pm 5,46
82	25,99 \pm 11,26	21,64 \pm 4,03
95	26,47 \pm 10,29	21,56 \pm 6,95

ab: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe zu einem Untersuchungszeitpunkt
 xy : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen

Beide Gruppen wiesen über den gesamten Versuchszeitraum vor Ovariohysterektomie einen ähnlichen Verlauf auf. Zu Beginn der Untersuchung lag die BAP-Konzentration der Gruppe 1 bei einem Mittel von 43,5 IE/l und fiel mit erheblichen Schwankungen auf 26,5 IE/l. Die Werte in Gruppe 2 fielen über den gesamten Versuchszeitraum auf ein Mittel von 21,6 IE/l kontinuierlich ab.

Innerhalb der Gruppen und zwischen den beiden Gruppen gab es zu keinem Zeitpunkt einen statistisch signifikanten Unterschied der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase.

4.1.3 Pyridinolin im Serum

Im Serum wurde der Knochenresorptionsmarker PYD gemessen. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der beiden Gruppen sowie das Alter zum Entnahmezeitpunkt dargestellt.

Tabelle 7: Mittlere Konzentrationen von PYD (MW \pm STABW) in nmol/l im Serum der Minipigs der Gruppe 1 (n=5) und Gruppe 2 (n=11) im Zeitraum vor OHX

Alter in Wochen	Gruppe 1 (Ca 0,9%)	Gruppe 2 (Ca 0,69%)
48	5,19 \pm 0,24	5,06 \pm 0,47
55	5,38 \pm 1,94	5,40 \pm 1,19
63	5,04 \pm 0,48	5,82 \pm 1,72
67	4,59 \pm 1,23	5,14 \pm 0,98
69	4,00 \pm 0,37	4,74 \pm 1,04
70	3,67 \pm 1,11	4,92 \pm 2,15
72	3,56 \pm 0,78	5,39 \pm 1,15
73	3,16 \pm 1,55	5,70 \pm 1,09
82	3,15 \pm 0,79	5,48 \pm 0,83
95	2,83 \pm 0,79	5,61 \pm 1,05

ab: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe zu einem Untersuchungszeitpunkt
 xy: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen

In Gruppe 1 sanken die PYD-Konzentrationen von 5,38 nmol/l im Alter von 55 Wochen kontinuierlich auf 2,83 nmol/l im Alter von 95 Wochen ab. Die Werte der Gruppe 2 blieben abgesehen von leichten Schwankungen höher als die von Gruppe 1.

Es ergab sich zu keinem Zeitpunkt zwischen oder innerhalb der Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied von Pyridinolin.

4.1.4 Progesteron im Serum

Im Serum wurde Progesteron gemessen. Aus Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Gruppe 1 und Gruppe 2 ersichtlich.

Tabelle 8: Mittlere Konzentrationen von Progesteron (MW \pm STABW) in nmol/l im Serum der Minipigs der Gruppe 1 (n=5) und Gruppe 2 (n=11) im Zeitraum vor OHX

Alter in Wochen	Gruppe 1 (Ca 0,9%)	Gruppe 2 (Ca 0,69%)
48	0,11 \pm 0,09	0,16 \pm 0,08
55	0,12 \pm 0,04	0,14 \pm 0,10
63	0,12 \pm 0,12	0,30 \pm 0,72
67	2,95 \pm 2,43	3,56 \pm 3,53
69	3,35 \pm 0,36	5,19 \pm 6,33
70	0,16 \pm 0,07	3,00 \pm 6,10
72	16,98 \pm 19,86	10,84 \pm 18,07
73	3,67 \pm 7,60	5,59 \pm 8,92
82	10,28 \pm 14,03	11,11 \pm 12,84
95	4,96 \pm 6,55	9,92 \pm 5,69

ab: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe zu einem Untersuchungszeitpunkt
 xy : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen

Im Zeitraum von 48 Wochen bis 55 Wochen blieben die Progesteronwerte beider Gruppen mit einem Mittel von 0,13 nmol/l niedrig. Ab der Woche 63 kam es zu zyklischen Schwankungen mit Höchstwerten von einem Mittel von 14,05 nmol/l. Im

Alter von 70 bis 73 Wochen waren die Progesteronschwankungen im Zyklusverlauf besonders deutlich erkennbar: niedrig zum Zeitpunkt des Östrus, hoch im Diöstrus und wieder niedriger im Proöstrus.

Es konnten zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede der Progesteronkonzentration der Gruppen gegeneinander und innerhalb der Gruppen festgestellt werden.

4.1.5 Östradiol im Serum

Aus den Serumproben wurde Östradiol gemessen. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Gruppe 1 und Gruppe 2 sowie das Alter zum Entnahmezeitpunkt dargestellt.

Tabelle 9: Mittlere Konzentrationen von Östradiol (MW \pm STABW) in pg/ml im Serum der Minipigs der Gruppe 1 (n=5) und Gruppe 2 (n=11) zu ausgewählten Zeitpunkten vor der OHX

Alter in Wochen	Gruppe 1 (Ca 0,9%)	Gruppe 2 (Ca 0,69%)
67	21,96 \pm 4,18	21,80 \pm 4,24
69	30,27 \pm 1,16	24,80 \pm 1,70
70	33,82 \pm 20,92	33,68 \pm 8,69
73	23,36 \pm 3,06	26,65 \pm 5,18

ab: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe zu einem Untersuchungszeitpunkt
 xy : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen

In beiden Gruppen liegen die Östradiolkonzentrationen im Alter von 67 Wochen bei einem Mittel von 22 pg/ml . Bis zum Alter von 70 Wochen stiegen sie bis zu einem Mittel von 34 pg/ml und fielen dann wieder auf 25 pg/ml ab.

Es lagen zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede der Östradiolkonzentration innerhalb einer Gruppe oder zwischen den Gruppen vor.

4.1.6 Vergleichende Aufstellung aller Parameter vor OHX

4.1.6.1 Gruppe 1

In Tabelle 10 werden die Parameter errechneter Zyklusstand, Progesteron, Östradiol, BAP und PYD der Gruppe 1 miteinander verglichen.

Tabelle 10: Alter in Wochen, errechneter Zyklusstand, mittlere Konzentrationen von Progesteron (MW \pm STABW) in ng/ml, Östradiol (MW \pm STABW) in pg/ml, BAP(MW \pm STABW) in IE/l und PYD(MW \pm STABW) in nmol/l im Serum der Minipigs der Gruppe 1 (n=5) zu ausgewählten Zeitpunkten vor OHX

Alter in Wochen	Errechneter Zyklusstand	Progesteron ng/ml	Östradiol pg/ml	BAP IE/l	PYD nmol/l
67	Östrus	2,95 \pm 2,43	21,96 \pm 4,18	24,97 \pm 2,07	4,59 \pm 1,23
69	Diöstrus	3,35 \pm 0,36	30,27 \pm 1,16	28,56 \pm 6,98	4,00 \pm 0,37
70	Östrus	0,16 \pm 0,07	33,82 \pm 20,92	29,38 \pm 7,01	3,67 \pm 1,11
72	Diöstrus	16,98 \pm 19,86	-	27,14 \pm 5,79	3,56 \pm 0,78
73	Östrus	3,67 \pm 7,60	23,36 \pm 3,06	21,29 \pm 4,06	3,16 \pm 1,55
82	Diöstrus	10,28 \pm 14,03	-	25,99 \pm 11,26	3,15 \pm 0,79
95	Diöstrus	4,96 \pm 6,55	-	26,47 \pm 10,29	2,83 \pm 0,79

Bei Gruppe 1 fiel auf, dass zum Zeitpunkt des Östrus die Progesteronwerte niedrig, zum Zeitpunkt des Diöstrus dagegen hoch waren. Die Östradiolwerte stiegen in Woche 70 auf 34 pg, sanken danach aber wieder ab auf 23 pg. BAP- und PYD-Konzentrationen fielen über den gesamten Zeitraum kontinuierlich ab.

4.1.6.2 Gruppe 2

In Tabelle 11 werden die Parameter errechneter Zyklusstand, Progesteron, Östradiol, BAP und PYD der Gruppe 2 miteinander verglichen.

Tabelle 11: Alter in Wochen, errechneter Zyklusstand, mittlere Konzentrationen von Progesteron (MW \pm STABW) in ng/ml, Östradiol (MW \pm STABW) in pg/ml, BAP(MW \pm STABW) in IE/l und PYD(MW \pm STABW) in nmol/l im Serum der Minipigs der Gruppe 2 (n=11) zu ausgewählten Zeitpunkten vor OHX

Alter in Wochen	Errechneter Zyklusstand	Progesteron ng/ml	Östradiol pg/ml	BAP IE/l	PYD nmol/l
67	Östrus	3,56 \pm 3,53	21,80 \pm 4,24	32,69 \pm 6,77	5,14 \pm 0,98
69	Diöstrus	5,19 \pm 6,33	24,80 \pm 1,70	25,69 \pm 3,84	4,74 \pm 1,04
70	Östrus	3,00 \pm 6,10	33,68 \pm 8,69	25,13 \pm 4,09	4,92 \pm 2,15
72	Diöstrus	10,84 \pm 18,07	-	27,03 \pm 6,73	5,39 \pm 1,15
73	Östrus	5,59 \pm 8,92	26,65 \pm 5,18	26,10 \pm 5,46	5,70 \pm 1,09
82	Diöstrus	11,11 \pm 12,84	-	21,64 \pm 4,03	5,48 \pm 0,83
95	Diöstrus	9,92 \pm 5,69	-	21,56 \pm 6,95	5,61 \pm 1,05

Auch in Gruppe 2 blieben die Progesteronwerte zum Zeitpunkt des Östrus niedrig und stiegen im Diöstrus deutlich an. Die Östradiolwerte stiegen in Woche 70 auf 34 pg, sanken danach aber wieder auf 27 pg ab. Die BAP-Konzentrationen fielen unter leichten Schwankungen. PYD blieb unter Schwankungen relativ konstant abgesehen von einem Peak von 6,7 nmol/l in Woche 70.

4.2 Ergebnisse des ovariohysterektomierten-Minipigs

Zum Zeitpunkt der OHX wurde Gruppe 2 in die Kontrollgruppe 2 und die OHX-Gruppe eingeteilt, aus Gruppe 1 wurde Kontrollgruppe 1. Die Minipigs waren zum Zeitpunkt der Ovariohysterektomie 113 Wochen alt. Kontrollgruppe 1 bekam das Futter mit 0,9% Calcium. Die Kontrollgruppe 2 und die OHX-Gruppe bekam dagegen das Futter mit 0,69% Calcium. Der zeitliche Versuchsverlauf wurde nach der Ovariohysterektomie in Wochen nach OHX angegeben, wobei Woche 0 dem Zeitpunkt der Ovariohysterektomie entsprach.

4.2.1 Allgemeinbefinden und Gewichtsentwicklung

Die Ovariohysterektomie verlief bei allen bis auf zwei Minipigs komplikationslos. Bei beiden Minipigs kam es während der Operation zu Blutungen in die Bauchhöhle. Trotz wiederholtem Ligatursetzen verstarb ein Minipig in der folgenden Nacht. Das zweite Tier war drei Tage lang anorektisch und wurde zusätzlich zur üblichen OP-Nachbehandlung mit Meloxicam (1ml/50kg) (Metacam[®], Boehringer, Ingelheim) und Amoxicillin (Synulox[®], Pfizer AG, Karlsruhe) intramuskulär und einer Elektrolytlösung per os behandelt. Beim Fäden ziehen musste bei einem Minipig eine Spülung der Stichkanäle mit Jodlösung vorgenommen werden, da es zu einer pyogenen Entzündung der OP-Wunde gekommen war. Bei der Nahtkontrolle nach einer Woche waren alle OP-Wunden komplikationslos verheilt.

Tabelle 12: Gewichte aller drei Gruppen (MW \pm STABW) in kg der Minipigs der Kontrollgruppe 1 (n=5), der Kontrollgruppe 2 (n=6) und der OHX-Gruppe (n=4) im Alter von 138 Wochen; 17 Wochen nach OHX

Wochen nach OHX	Kontrollgruppe 1 (Ca 0,9%)	Kontrollgruppe 2 (Ca 0,69%)	OHX-Gruppe (Ca 0,69%)
17	32,46 \pm 4,2	35,25 \pm 5,7	33,95 \pm 1,97

ab: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe zu einem Untersuchungszeitpunkt
xy : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen

17 Wochen nach OHX lag das Gewicht aller Gruppen bei einem Mittel von 34 kg.

Es konnte zwischen den Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

4.2.2 Knochenspezifische Alkalische Phosphatase im Serum

In Tabelle 13 werden die BAP-Konzentrationen aller Gruppen nach OHX dargestellt.

Tabelle 13: Mittlere Konzentrationen von BAP (MW \pm STABW) in IE/l im Serum der Minipigs der Kontrollgruppe 1 (n=5) und der Kontrollgruppe 2 (n=6) und der OHX-Gruppe (n=4) im Zeitraum nach OHX

Wochen nach OHX	Kontrollgruppe 1 (Ca 0,9%)	Kontrollgruppe 2 (Ca 0,69%)	OHX-Gruppe (Ca 0,69%)
0	20,29 \pm 15,11	19,41 \pm 4,10	18,33 \pm 3,07
2	12,78 \pm 3,9	18,93 \pm 5,39	15,47 \pm 2,93
4	14,20 \pm 3,15	12,13 \pm 5,87	25,30 \pm 3,61
6	18,51 \pm 5,94	20,16 \pm 3,15	22,34 \pm 2,11
8	16,35 \pm 4,23	19,93 \pm 3,11	21,05 \pm 5,89

ab: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe zu einem Untersuchungszeitpunkt
 xy : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen

Die BAP-Konzentrationen der Kontrollgruppe 1 lagen vor OHX bei einem Mittel von 20,29 IE/l und fielen innerhalb der folgenden 8 Wochen nach Ovariohysterektomie mit leichten Schwankungen auf 16 IE/l ab. Bei Kontrollgruppe 2 lag bis zur 4. Woche nach OHX ebenfalls ein Abfall der BAP-Werte vor, bis zur 8. Woche stiegen die Werte wieder auf ein Mittel von 20,01 IE/l. In der OHX-Gruppe kam es im Gegensatz zu den beiden Kontrollgruppen nach einem leichten Absinken der Werte in der Woche 2, auf einen Anstieg auf 25,3 IE/l in Woche 4. Bis zur 8. Woche nach OHX sanken die BAP-Konzentrationen wieder auf 21 IE/l.

Es lag zu keinem Zeitpunkt zwischen den Gruppen und innerhalb der Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied der BAP vor.

4.2.3 Pyridinolin im Serum

Aus Tabelle 14 sind die PYD-Werte aller Gruppen nach OHX ersichtlich.

Tabelle 14: Mittlere Konzentrationen von PYD (MW \pm STABW) in nmol/l im Serum der Minipigs der Kontrollgruppe 1 (n=5) und Kontrollgruppe 2 (n=6) und der OHX-Gruppe (n=4) im Zeitraum nach OHX

Wochen nach OHX	Kontrollgruppe 1 (Ca 0,9%)	Kontrollgruppe 2 (Ca 0,69%)	OHX-Gruppe (Ca 0,69%)
0	3,30 \pm 1,10	4,49 \pm 1,32	4,98 \pm 1,33
2	3,53 \pm 2,20	5,85 \pm 2,83	4,42 \pm 2,87
4	4,18 \pm 1,35	6,72 \pm 2,88	6,79 \pm 2,20
6	3,18 \pm 1,66	6,20 \pm 1,84	5,27 \pm 2,04
8	4,04 \pm 0,91	7,10 \pm 1,72	5,08 \pm 1,93

ab: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe zu einem Untersuchungszeitpunkt
 xy : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen

Die PYD-Werte der Kontrollgruppe 1 blieben in den Wochen nach Ovariohysterektomie bei einem Mittel von 3,6 nmol/l. In Kontrollgruppe 2 kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg von 4,5 nmol/l auf 7,1 nmol/l. Die OHX Gruppe wies einen Peak von 6,8 nmol/l in der 4. Woche nach OHX auf und sank bis Woche 8 auf 5 nmol/l.

Es lag zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied der Pyridinolin-Konzentration der Gruppen gegeneinander oder innerhalb der Gruppen vor.

4.2.4 Progesteron im Serum

In Tabelle 15 sind die Progesteronwerte aller Gruppen nach OHX dargestellt.

Tabelle 15: Mittlere Konzentrationen von Progesteron (MW \pm STABW) in nmol/l im Serum der Minipigs der Kontrollgruppe 1 (n=5) und Kontrollgruppe 2 (n=6) und der OHX-Gruppe (n=4) im Zeitraum nach OHX

Wochen nach OHX	Kontrollgruppe 1 (Ca 0,9%)	Kontrollgruppe 2 (Ca 0,69%)	OHX-Gruppe (Ca 0,69%)
0	24,12 \pm 18,54	22,60 \pm 18,16	14,96 \pm 0,01
2	7,83 \pm 11,03	10,75 \pm 14,67	11,28 \pm 13,80
4	11,36 \pm 7,58	18,03 \pm 15,42	11,74 \pm 17,61
6	15,49 \pm 11,38	25,08 \pm 18,40	9,83 \pm 14,02
8	14,65 \pm 11,99	25,73 \pm 22,20	9,21 \pm 14,69

ab: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe zu einem Untersuchungszeitpunkt
 xy : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen

In Kontrollgruppe 1 fiel die Progesteronkonzentration in den ersten zwei Wochen nach OHX. Danach stieg sie mit leichten Schwankungen wieder bis Woche 6 nach OHX. Die Progesteronwerte der Kontrollgruppe 2 blieben bis auf ein Abfallen auf 10,75 nmol/l in Woche 2 nach OHX bei einem Mittel von 24,5 nmol/l. Bei der OHX-Gruppe sanken die Progesteronwerte von einem Anfangswert von 14,96 \pm 0,01 nmol/l kontinuierlich auf 9,21 \pm 14,69 nmol/l in Woche 8 ab.

Innerhalb der Gruppen und zwischen den Gruppen kam es zu keinem Zeitpunkt zu einem statistisch signifikanten Unterschied der Progesteron-Konzentration.

4.2.5 Östradiol im Serum

Aus Tabelle 16 gehen die Östradiolergebnisse aller Gruppen nach OHX hervor.

Tabelle 16: Mittlere Konzentrationen von Östradiol (MW \pm STABW) in pg/ml im Serum der Minipigs der Kontrollgruppe 1 (n=5) und Kontrollgruppe 2 (n=6) und der OHX-Gruppe (n=4) im Zeitraum nach OHX

Wochen nach OHX	Kontrollgruppe 1 (Ca 0,9%)	Kontrollgruppe 2 (Ca 0,69%)	OHX-Gruppe (Ca 0,69%)
0	19,18 \pm 3,97	28,09 \pm 16,92	41,99 \pm 22,12
2	36,89 \pm 14,31	34,97 \pm 10,04	14,68 \pm 9,03
4	26,68 \pm 14,68	35,41 \pm 5,28	16,59 \pm 16,06
6	20,56 \pm 3,23	37,4 \pm 2,39	15,27 \pm 8,41

ab: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Gruppe zu einem Untersuchungszeitpunkt
 xy : Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen

Die Östradiolwerte der Kontrollgruppe 1 lagen in den Wochen 0 und 6 bei einem Mittel von 20 pg/ml, in den Wochen 2 und 4 kam es zu einem Anstieg der Konzentration. Kontrollgruppe 2 wies dagegen ein kontinuierliches Ansteigen der Werte vor. In der OHX-Gruppe dagegen sanken die Östradiolkonzentrationen in der Woche 2 deutlich von 42 pg/ml auf 14,7 pg/ml. Dieser Wert blieb in den Wochen 4 und 6 annähernd gleich.

Ein statistisch signifikanter Unterschied der Östradiol-Konzentration zwischen den Gruppen und innerhalb einer Gruppe lag zu keinem Zeitpunkt vor.

4.2.6 Vergleichende Aufstellung aller Parameter nach OHX

4.2.6.1 Kontrollgruppe 1

In Tabelle 17 werden die Parameter errechneter Zyklusstand, Progesteron, Östradiol, BAP und PYD der Kontrollgruppe 1 miteinander verglichen.

Tabelle 17: Errechneter Zyklusstand, mittlere Konzentrationen von Progesteron (MW \pm STABW) in ng/ml, Östradiol (MW \pm STABW) in pg/ml, BAP(MW \pm STABW) in IE/l und PYD(MW \pm STABW) in nmol/l im Serum der Minipigs der Kontrollgruppe 1 (n=5) zu ausgewählten Zeitpunkten nach OHX

Wochen nach OHX	Errechneter Zyklusstand	Progesteron ng/ml	Östradiol pg/ml	BAP IE/l	PYD nmol/l
0	Diöstrus	24,12 \pm 18,54	19,18 \pm 3,97	20,29 \pm 15,11	3,30 \pm 1,10
2	Metöstrus	7,83 \pm 11,03	36,89 \pm 14,31	12,78 \pm 3,9	3,53 \pm 2,20
4	Proöstrus	11,36 \pm 7,58	26,68 \pm 14,68	14,20 \pm 3,15	4,18 \pm 1,35
6	Metöstrus	15,49 \pm 11,38	20,56 \pm 3,23	18,51 \pm 5,94	3,18 \pm 1,66

Die Progesteronwerte der Kontrollgruppe 1 lagen zum Zeitpunkt des Diöstrus hoch, zum Zeitpunkt von Met- und Proöstrus niedriger. Östradiol stieg in Woche 2 nach OHX auf 37 pg/ml. In Woche 2 fiel die BAP-Konzentration auf 12,8 IE/l, bis Woche 6 stieg sie wieder auf 18,5 IE/l. Die PYD-Werte wiesen in Woche 6 einen Peak von 4,2 nmol/l auf, blieben ansonsten bei einem Mittel von 3,4 nmol/l.

4.2.6.2 Kontrollgruppe 2

In Tabelle 18 werden die Parameter errechneter Zyklusstand, Progesteron, Östradiol, BAP und PYD der Kontrollgruppe 2 miteinander verglichen.

Tabelle 18: Errechneter Zyklusstand, mittlere Konzentrationen von Progesteron (MW \pm STABW) in ng/ml, Östradiol (MW \pm STABW) in pg/ml, BAP(MW \pm STABW) in IE/l und PYD(MW \pm STABW) in nmol/l im Serum der Minipigs der Kontrollgruppe 2 (n=6) zu ausgewählten Zeitpunkten nach OHX

Wochen nach OHX	Errechneter Zyklusstand	Progesteron ng/ml	Östradiol pg/ml	BAP IE/l	PYD nmol/l
0	Diöstrus	22,60 \pm 18,16	28,09 \pm 16,92	19,41 \pm 4,10	4,49 \pm 1,32
2	Metöstrus	10,75 \pm 14,67	34,97 \pm 10,04	18,93 \pm 5,39	5,85 \pm 2,83
4	Proöstrus	18,03 \pm 15,42	35,41 \pm 5,28	12,13 \pm 5,87	6,72 \pm 2,88
6	Metöstrus	25,08 \pm 18,40	37,4 \pm 2,39	20,16 \pm 3,15	6,20 \pm 1,84

Bei der Kontrollgruppe 2 lagen die Progesteronwerte im Diöstrus hoch, im Proöstrus etwas niedriger. Im Metöstrus waren die Werte in Woche 2 niedrig, in Woche 6 dagegen hoch. Östradiol stieg bis zur Woche 6 kontinuierlich an. In Woche 4 sank der BAP-Wert auf 12 IE/l ab, um bis Woche 6 wieder auf 20 IE/l zu steigen. Bis Woche 6 stiegen die PYD-Konzentrationen an, in Woche 6 fielen sie auf 6,2 nmol/l.

4.2.6.3 OHX-Gruppe

In Tabelle 19 werden die Parameter errechneter Zyklusstand, Progesteron, Östradiol, BAP und PYD der OHX-Gruppe miteinander verglichen.

Tabelle 19: Alter in Wochen, errechneter Zyklusstand, mittlere Konzentrationen von Progesteron (MW \pm STABW) in ng/ml, Östradiol (MW \pm STABW) in pg/ml, BAP(MW \pm STABW) in IE/l und PYD(MW \pm STABW) in nmol/l im Serum der Minipigs der OHX-Gruppe (n=4) zu ausgewählten Zeitpunkten nach OHX

Wochen nach OHX	Errechneter Zyklusstand	Progesteron ng/ml	Östradiol pg/ml	BAP IE/l	PYD nmol/l
0	Diöstrus	14,96 \pm 0,01	41,99 \pm 22,12	18,33 \pm 3,07	4,98 \pm 1,33
2	Metöstrus	11,28 \pm 13,80	14,68 \pm 9,03	15,47 \pm 2,93	4,42 \pm 2,87
4	Proöstrus	11,74 \pm 17,61	16,59 \pm 16,06	25,30 \pm 3,61	6,79 \pm 2,20
6	Metöstrus	9,83 \pm 14,02	15,27 \pm 8,41	22,34 \pm 2,11	5,27 \pm 2,04

Bei der OHX-Gruppe fielen in den Wochen nach OHX sowohl die Progesteron- als auch die Östradiol-Konzentrationen deutlich ab. BAP fiel in Woche 2 auf 15,5 IE/l, um in Woche 4 auf 25,3 IE/l anzusteigen und bis Woche 6 wieder auf 22,3 IE/l zu fallen. In Woche 6 wies der PYD-Wert einen Peak von 6,8 nmol/l auf.

5 Diskussion

5.1 Aufbau und Durchführung des Versuchs

Ziel dieser Studie war es, am Tiermodell Minipig eine eventuelle Zyklusabhängigkeit des Knochenstoffwechsels zu zeigen und im weiteren Verlauf der Studie die Auswirkung der Ovariohysterektomie bei diesem Großtiermodell auf den Knochenstoffwechsel anhand von ausgewählten Knochenmarkern zu untersuchen.

In einem weiteren Aspekt dieser Arbeit wurde überprüft, ob eine reduzierte Calciumzufuhr bei diesem Tiermodell von entscheidender Bedeutung ist.

Um dies zu untersuchen, wurden sowohl die Knochenmarker Knochenspezifische Alkalische Phosphatase und Pyridinolin als auch die Hormone Progesteron und Östradiol aus Serumproben gemessen.

Über einen Versuchszeitraum von 65 Wochen vor und 8 Wochen nach Ovariohysterektomie wurden in bestimmten Abständen Serumproben gewonnen. Um circadiane Schwankungen zu vermeiden, wurde immer zur gleichen Uhrzeit am nüchternen Tier Blut genommen. Das Blut wurde unmittelbar nach der Entnahme zentrifugiert, das Serum abpipettiert und bei -80°C eingefroren, um die Stabilität der Knochenmarker zu gewährleisten.

Der Versuch wird am Institut für Tierernährung und Diätetik weitergeführt. Die Knochendichte wird im weiteren Versuchsverlauf gemessen.

5.2 Wahl des Tiermodells ovariohysterektomiertes Minipig

Laut „Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the treatment or prevention of postmenopausal osteoporosis“ der „Food and Drug Administration“ von 1994 sollen Wirkstoffe jeweils an zwei Tiermodellen untersucht werden, der ovariektomierten Ratte, sowie einem Großtiermodell.

Durch die größere Körpermasse besitzen Großtiere natürlich ein um ein Vielfaches größeres Blutvolumen als z.B. die Ratte. Dies ist bei wiederholten Blutentnahmen

ebenso von Vorteil wie bei der Durchführung von mehreren Tests, bei denen größere Blutmengen benötigt werden. Außerdem können Großtiermodelle wie z.B. Schaf und Schwein zur Testung von orthopädischen Implantaten genutzt werden und es können häufiger Knochenbiopsien entnommen werden.

Das Durchschnittsgewicht von 150 kg eines ausgewachsenen Schweins wie z.B. Deutsche Landrasse verursacht allerdings einen enormen Platzbedarf bei einer Versuchstierhaltung. Minipigs sind kleiner, das Göttinger Minipig wiegt ausgewachsen bis zu 60 kg, das Dresdner Minipig, wie in dieser Studie verwendet, wiegt als adultes Tier nur zwischen 30 und 40 kg. Dadurch können sie platzsparender untergebracht werden und verbrauchen weniger Futter. Trotzdem besitzen sie noch eine ausreichende Größe, um Implantate zu testen.

Das Tiermodell Minipig wurde aber hauptsächlich wegen der starken Ähnlichkeit des weiblichen Zyklus und des Knochenstoffwechsels zwischen Mensch und Schwein ausgewählt. Bei der Wahl des Tiermodells sollten sowohl die Remodelingaktivität, als auch die altersbedingten Veränderungen des Knochens denen der postmenopausalen Frau ähnlich sein.

Das ovariectomierte Minipig wurde bereits in einigen Studien als Tiermodell verwendet: In einer Studie von Mosekilde et al (1993) wurde das ovariectomierte Minipig mit restriktiver Calciumgabe verwendet, um ein Großtiermodell mit trabekulärem und kortikalem Knochenremodeling zu definieren, das für die weitere Medikamentenprüfung zuverlässig genug ist, um eine therapeutische Wirksamkeit während des Versuches zu zeigen. Die Studie deckte eine durch OVX verursachte Abnahme in der Mineraleichte des vertebrealen Knochens (BMD) und eine Abnahme im trabekulären Knochenvolumen auf (BV/TV). Die Strukturveränderungen waren ausgeprägter bei der OVX-Gruppe mit restriktiver Calciumgabe (Mosekilde, 1993).

In einer weiteren Studie mit ovariectomierten Sinclair-S1 Minipigs bei einer Fütterung mit auf 0,75% reduziertes Calcium war eine Reduzierung der vertebrealen Knochenmassedichte (BMD) in 12 Monaten erkennbar (Bouchard et al, 1997). Borah et al (2002) nutzten das ovariectomierte Minipig mit restriktiver Calciumgabe als Tiermodell, um den Effekt von Risedronate auf den Knochenstoffwechsel zu testen.

In diesem Versuch erhielt Kontrollgruppe 1 (vor OHX Gruppe 1) das Futter 1 mit 0,9% Ca-Gehalt. Kontrollgruppe 2 und die OHX-Gruppe (vor OHX zusammen Gruppe 2) erhielt Futter 2 mit 0,69% Ca-Gehalt, der sich an der unteren Grenze des Ca-Bedarfs befand.

In anderen Studien am OHX-Minipig wurde vorausgesetzt, dass ein Knochenmasseverlust nur bei gleichzeitiger Reduzierung des Calcium-Gehalts herbeigeführt werden kann. In dieser Untersuchung kann nun, aufgrund der zwei Kontrollgruppen mit unterschiedlichem Calciumgehalt im Futter, die Bedeutung einer Calciumreduktion auf den Knochenstoffwechsel näher untersucht werden.

5.3 Gewichtsentwicklung der Minipigs

Anhand der Gewichtsentwicklung aller Tiere wird deutlich, dass sich die Minipigs zu Versuchsbeginn noch im Wachstum befanden. Zwischen den einzelnen Gruppen kam es zu keinem Zeitpunkt zu signifikanten Gewichtsunterschieden. Die Tiere wurden nach Gewicht randomisiert in die Gruppen eingeteilt.

Die konstante Gewichtszunahme während des Wachstums ist im Hinblick auf die kontinuierlichen Knochenumbauvorgänge wichtig. Gewichtsschwankungen können Einfluss auf die biochemischen Marker des Knochenstoffwechsels in Bezug auf den Zyklus haben. Ricci et al (2001) beschrieben im Zusammenhang mit einer Reduktion der Körperfettmasse einen einhergehenden Abfall des Serumöstrogens.

Dies wiederum hat negativen Einfluss auf den Knochenaufbau. Die konstante Gewichtsentwicklung mit Vermeidung von extremen Gewichtszu oder -abnahmen eines jeden Schweins über den gesamten Versuchszeitraum hinweg war jedoch gewährleistet, so dass man mögliche Auswirkungen auf den Knochen ausschließen konnte.

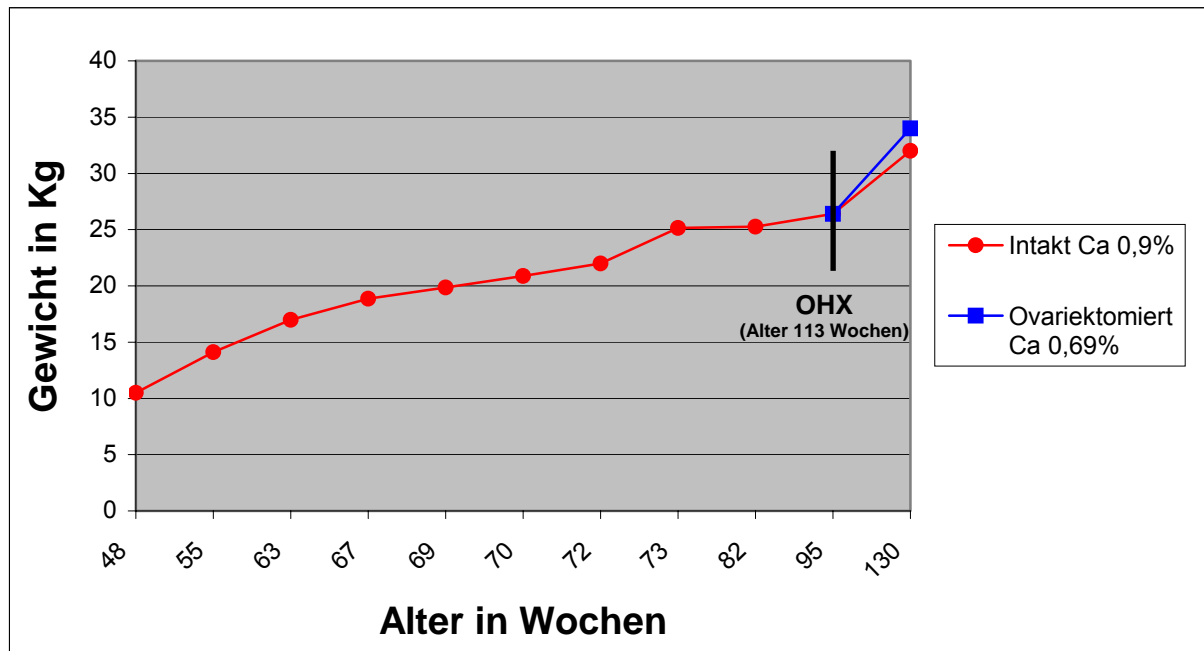


Abbildung 1: mittlere Gewichte der Minipigs in kg während des gesamten Versuchszeitraums

Durch das Wegfallen von Östrogen nach Ovariohysterektomie kann es zu einer Hemmung des Sättigungshormons kommen, die z.B. bei Beagle mit Fütterung ad libitum zu einer extremen Gewichtszunahme führen kann (Jeusette et al, 2006). Eine Gewichtszunahme der Minipigs der OHX-Gruppe konnte in diesem Versuch nicht festgestellt werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass jedes Tier zweimal täglich eine definierte Futtermenge zugeteilt bekam. Bei einer Fütterung ad libitum wären ebenfalls Gewichtszunahmen zu erwarten gewesen.

5.4 Ovariohysterektomie

Bei einer Ovariectomie werden nur die Ovarien entfernt, der Uterus wird im Tier belassen. Durch die Hormonveränderung können jedoch krankhafte Veränderungen des Uterus auftreten. Aus diesem Grund wurde eine Ovariohysterektomie durchgeführt. Durch das Entfernen von Ovarien und Uterus konnte eine Aufhebung des Sexualzyklus mit Einstellung der Hormonproduktion sichergestellt, sowie Komplikationen durch eventuelle Metropathien verhindert werden. Nach der OHX verstarb ein Minipig, bei den anderen Tieren verlief die Rekonvaleszenz bis auf ein Schwein komplikationslos.

Anhand der Bestimmung von Progesteron-Konzentrationen im Serum über den gesamten Versuchszeitraum und der Bestimmung von Serum-Östradiol-Konzentrationen zu ausgewählten Zeitpunkten, wurde der Erfolg der OHX verifiziert.

Es wurde bereits die Auswirkung von einer OHX/OVX mit einer einhergehenden restriktiven Calciumgabe auf den Knochenstoffwechsel in anderen Studien mit Hilfe einer Knochendichtemessung, DEXA oder Mikro-CT an Minipigs untersucht. Bei diesen Verfahren handelt es sich um die Darstellung des Knochens zu einem bestimmten Zeitpunkt. Um eine Veränderung des Knochens durch eine dieser Methoden sichtbar machen zu können, muss man bis zu mehreren Monaten nach OHX/OVX warten (Borah et al, 2002; Mosekilde et al, 1993).

In diesem Versuch wurde die Auswirkung der Ovariohysterektomie anhand von Knochenmarkern untersucht. Da es sich bei diesen Parametern nicht um statische Größen handelt, können dynamische Vorgänge innerhalb kürzester Zeit nachgewiesen werden.

5.5 Knochenmarker

Zur Bestimmung von Knochenmarkern aus dem Serum werden meist ELISAs verwendet, da sie einfach zu handhaben und in kürzester Zeit durchführbar sind. Die meisten auf dem Markt vorhandenen Assays für Knochenmarker sind humanspezifisch. Für die Beurteilung des Knochenstoffwechsels am Tiermodell sind nur wenige speziesspezifische Assays vorhanden, wie z.B. ein Osteocalcin-Assay für Ratten. Da es unrentabel wäre, für viele verschiedene Tierarten viele verschiedene Tests zu produzieren, werden humanspezifische Assays dafür genutzt. Humanspezifische Assays müssen allerdings für die Anwendung bei der jeweiligen Tierart validiert werden, um zu sehen, ob es zu einer Kreuzreaktivität kommt. Allen et al untersuchte 2003 viele humanspezifische Assays für Knochenmarker auf die Kreuzreaktivität für verschiedene Tierarten.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Knochenstoffwechsel anhand des Knochenformationsmarkers BAP und des Knochenresorptionsmarker PYD untersucht. Beide Marker wurden mit einem ELISA der Firma Metra Quidel bestimmt, da diese

eine Kreuzreaktivität und Speziespezifität für das Schwein aufwiesen. Im Rahmen derselben Studie wurden ebenfalls der Knochenformationsmarker Osteocalcin und der Knochenresorptionsmarker Crosslaps bestimmt.

5.5.1 Knochenspezifische Alkalische Phosphatase

Der Knochenformationsmarker Knochenspezifische Alkalische Phosphatase wurde mit einem ELISA, der Firma Metra Quidel, gemessen, für den Allen (2003) eine Kreuzreaktion für das Schwein fand. BAP ist ein hochspezifischer, akkurater Marker für die knochenbildende Aktivität der Osteblasten (Dresner-Pollak et al, 1996), daraus ergab sich die Entwicklung von BAP zum Standardmarker der Knochenformation.

Beide Gruppen wiesen einen Abfall der Werte über den gesamten Versuchszeitraum vor OHX auf, wobei die BAP-Konzentrationen der Gruppe 1 größeren Schwankungen unterworfen waren als die der Gruppe 2, die kontinuierlicher abfielen. Mit zunehmendem Alter nimmt die Aktivität des Knochenstoffwechsels ab, die Werte sinken.

In einem Alter von 18 bis 22 Monaten schließen sich die Wachstumsfugen, die endgültig vorgesehene Knochenmasse wird erreicht (Tsutsumi, 2004). BAP ist als Knochenmarker der Formation ein Indikator für erhöhten Knochenumsatz. Wenn das Knochenwachstum mit zunehmendem Alter nachlässt, sinkt auch die BAP-Konzentration (Inui, 2003). Bei diesen Minipigs war das bis zur 67. Lebenswoche der Fall.

Der Knochenaufbau schien hiermit abgeschlossen zu sein, da die BAP-Werte bis zu diesem Zeitpunkt absanken und danach annähernd konstant blieben. Beim ausgewachsenen Minipig pendelt sich die Serum-BAP-Konzentration auf einem niedrigeren Level ein (Tsutsumi, 2004).

Ein direkter Einfluss des Zyklus auf BAP war zu keiner Zeit erkennbar. Beim Knochenformationsmarker Osteocalcin konnte dagegen neben dem altersabhängigen Verlauf auch eine Abhängigkeit zum Zyklus dargestellt werden. Osteocalcin stieg gleichzeitig mit Östradiol an, im Alter von 72 Wochen zum Zeitpunkt des Diöstrus konnte eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$) nachgewiesen werden (Brenda Babel, 2007).

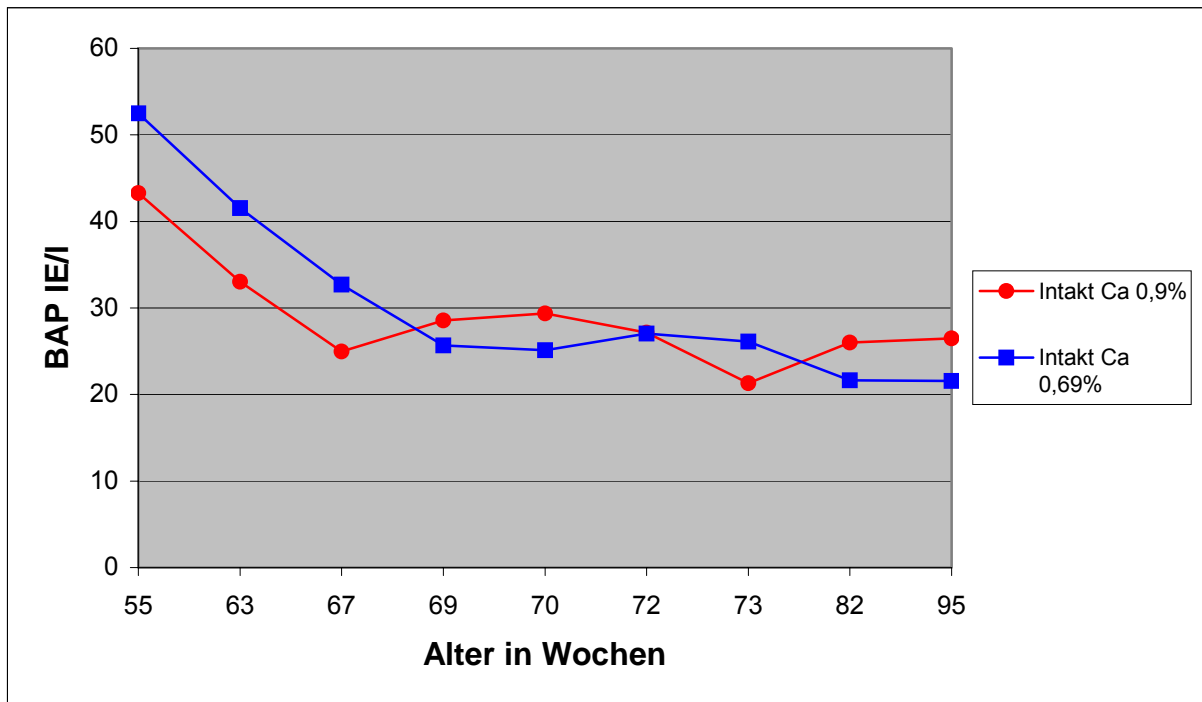


Abbildung 2: mittlere BAP-Konzentrationen in IE/I vor OHX der Gruppe 1 (Intakt Ca 0,9%) und Gruppe 2 (Intakt Ca 0,69%)

Nach der OHX begann der BAP-Wert in der OHX-Gruppe auf 25 IE/I bis Woche 4 deutlich anzusteigen. Das zeigt, dass der Knochen auf das fehlende Östrogen und den damit einhergehenden Knochenabbau reagierte.

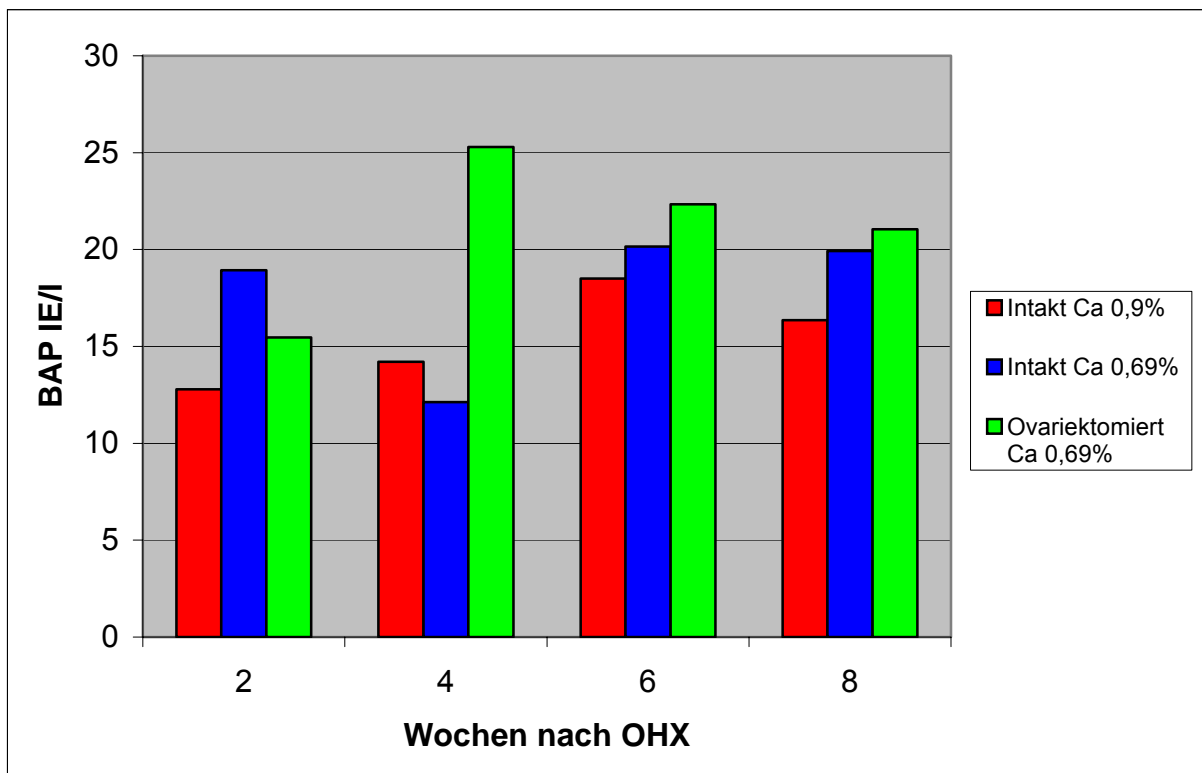


Abbildung 3: mittlere BAP-Konzentrationen in IE/I nach OHX aller Gruppen

Nach Woche 4 fiel in der OHX-Gruppe die BAP-Konzentration wieder ab, blieb aber deutlich über denen der Kontrollgruppen. Nach einem gesteigerten Knochenumsatz - erhöhte BAP-Konzentration - wie man ihn hier erkennen kann, kommt es wieder zu einer Normalisierung der BAP-Werte. Dieses Phänomen ist auch bei anderen OHX/OVX-Modellen wie z.B. der Ratte zu sehen (Sims et al, 1996).

Daher ist die Messung vom Knochenformationsmarker BAP zur Bestimmung von Knochenturnovervorgängen beim ovariectomierten Minipig geeignet. Dies wird durch die Tatsache bestärkt, dass keine begleitende Behandlung mit Glukokortikoiden wie beim Schaf notwendig ist, um einen Knochenmasseverlust zu induzieren. Ein deutlicher Effekt der Calcium-Reduktion auf BAP ist nicht erkennbar.

5.5.2 Pyridinolin

Pyridinolin wurde ebenfalls mit einem ELISA der Firma Metra Quidel gemessen, für den Allen (2003) eine Kreuzreaktion für das Schwein fand.

In Gruppe 1 sanken die PYD-Konzentrationen kontinuierlich bis zum Alter von 95 Wochen auf 2,83 nmol/l ab. Die Werte der Gruppe 2 blieben abgesehen von leichten Schwankungen insgesamt konstanter auf einem höheren Level vor OHX als die der Gruppe 1, es ließ sich kein eindeutiger Abstieg der Werte in den Wochen 72 bis 95 erkennen.

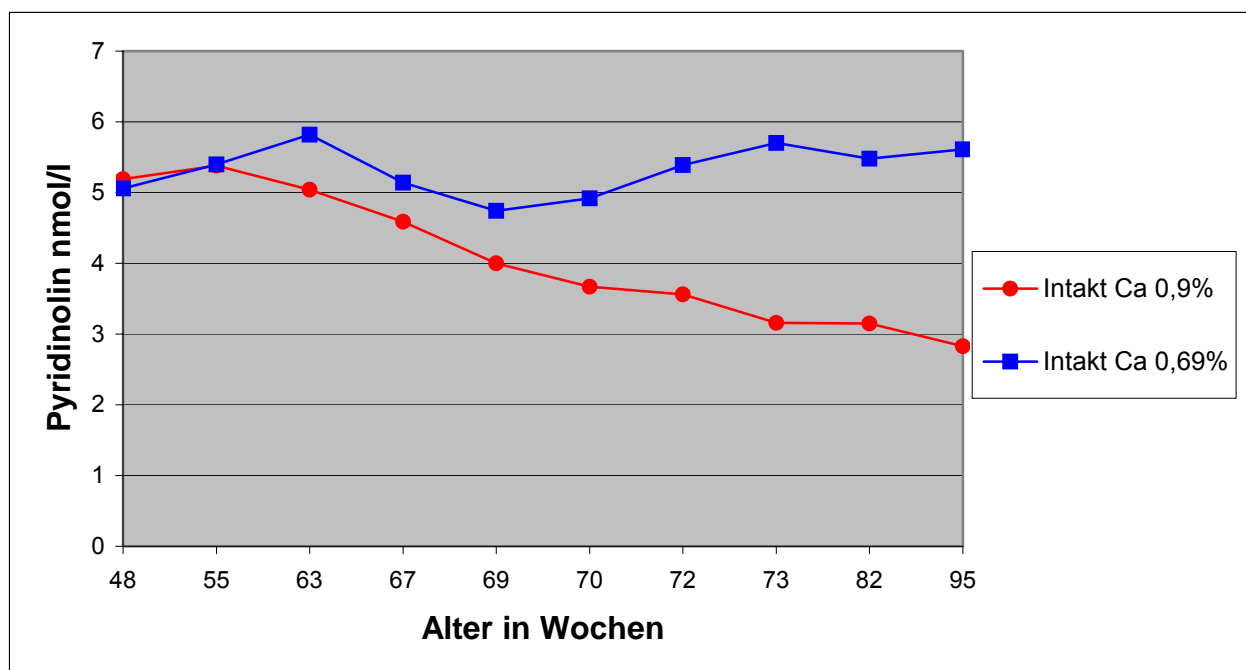


Abbildung 4: mittlere Pyridinolin-Konzentrationen in nmol/l vor OHX der Gruppe 1 (Intakt Ca 0,9%) und Gruppe 2 (Intakt Ca 0,69%)

Ebenso wie bei BAP kann man in Gruppe 1 den alters- und wachstumsbedingten Abfall der Pyridinolin-Konzentrationen vor OHX feststellen. Das Knochenwachstum und der damit einhergehende Knochen turnover wurden im Laufe des Versuchszeitraums geringer.

Die PYD-Werte der Gruppe 2 lagen vor OHX auffallend höher als die der Gruppe 1 ohne abzusinken. Dies kann man auf die niedrigere Calciumgabe der Gruppe 2 zurückführen, was einen Anstieg von Parathormon und Calcitriol bewirkt, wodurch wiederum die Osteoklasten aktiviert werden, die den Knochen entmineralisieren: der Resorptionsmarker Pyridinolin stieg an.

Ein direkter Einfluss des Zyklus auf PYD war nicht erkennbar. Dagegen konnte beim Knochenresorptionsmarker Crosslaps neben der altersbedingten auch eine Zyklusabhängigkeit nachgewiesen werden. Hohe Konzentrationen wurden im Östrus, niedrige im Diöstrus festgestellt. Es wurden signifikante Korrelationen ($p < 0,05$) zwischen Crosslaps, Progesteron und Östradiol dargestellt.

Nach OHX blieben die PYD-Konzentrationen der Kontrollgruppe 1 niedriger als die der Kontrollgruppe 2 und der OHX-Gruppe. In der OHX-Gruppe kam es in der Woche 4 nach OHX zu einem Anstieg, danach sanken die Werte wieder.

Auch nach OHX lagen die Pyridinolin-Werte der Kontrollgruppe 2 und der OHX-Gruppe mit 0,69% Calcium-Fütterung deutlich höher als die der Kontrollgruppe 1 mit 0,9% Calcium-Fütterung, was wieder auf den generell erhöhten Knochenumsatz durch die restriktive Calcium-Gabe zurückzuführen sein könnte.

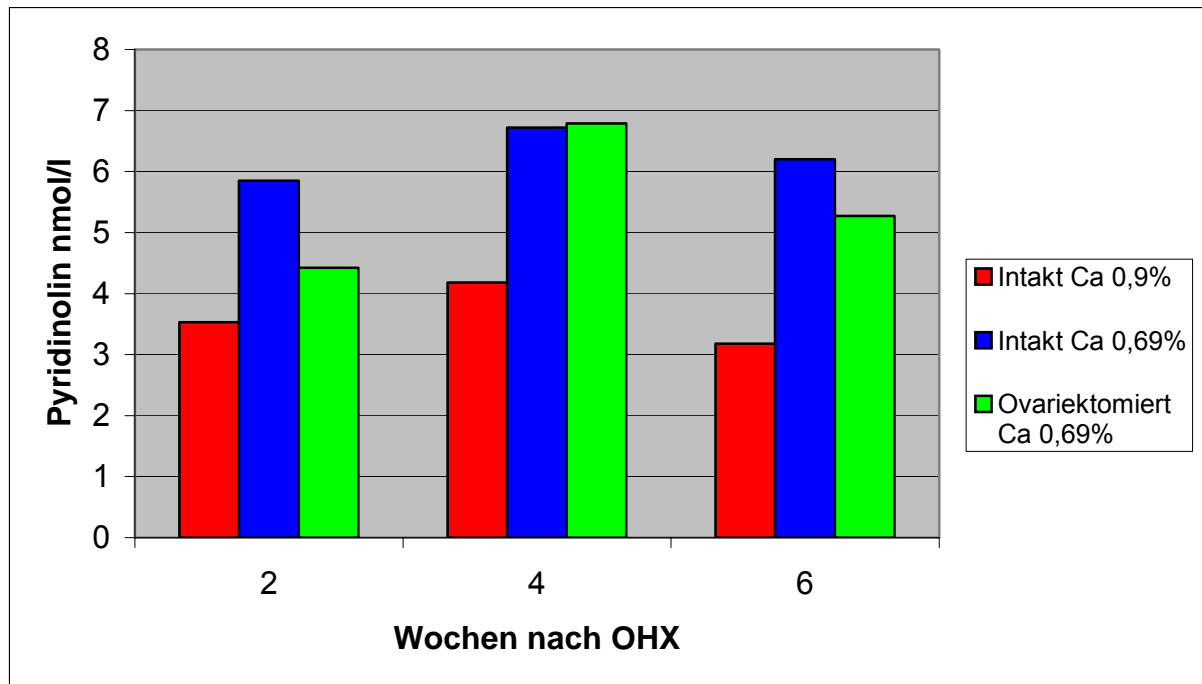


Abbildung 5: mittlere Pyridinolin-Konzentrationen in nmol/l nach OHX aller Gruppen

Ein direkter Effekt der OHX auf die Konzentration von PYD in der OHX-Gruppe war im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen nicht erkennbar. Dies ließe sich eventuell darauf zurückführen, dass eine Wirkung der OHX auf Pyridinolin zeitnäher zur Ovariohysterektomie geschieht (Knochenresorption nach 7-10 Tagen).

Um dies zu evaluieren, müssten die Entnahmezeitpunkte in kürzeren Abständen zueinander erfolgen. Ein anderer Grund könnte darin bestehen, dass eine Bestimmung von PYD aus dem Serum mittels eines ELISAs beim Schwein nicht sensitiv genug ist.

Da Pyridinolin über die Niere ausgeschieden wird und im Urin nachweisbar ist, wäre eine HPLC-Messung des Urins der Minipigs eine mögliche genauere Bestimmung von Pyridinolin mit gleichzeitiger Messung von Creatinin.

Auf eine Urinentnahme wurde in diesem Versuch verzichtet, da entweder durch Cystozentese Harn entnommen hätte werden müssen, was nur eine Momentaufnahme der Pyridinolinausscheidung zu einem bestimmten Zeitpunkt gewesen wäre, oder die Minipigs hätten in einen Stoffwechsellkäfig verbracht werden müssen, um 24-Stunden-Urin zu gewinnen, worauf aus tierschutzrechtlichen und praktischen Gründen verzichtet wurde.

Die restriktive Calcium-Gabe wirkte sich durch erhöhte PYD-Werte auf den Knochenstoffwechsel aus, was scheinbar ebenfalls eine Verfälschung der PYD-Konzentrationen bewirkt hat.

Die Bestimmung von Serum-Crosslaps erwies sich dagegen als nützlich zum Nachweis der Auswirkung der OHX auf die Knochenresorption mit statistisch signifikanten Unterschieden zwischen der OHX-Gruppe und der Kontrollgruppe 1 in der 6. und 8. Woche nach OHX mit $p=0,016$ (Brenda Babel, 2007).

Die Bestimmung von Pyridinolin aus dem Serum eignet sich beim Schwein nicht dazu, Knochenstoffwechselforgänge nach OHX nachzuweisen. Zu diesem Zweck ist die Bestimmung von Serum-Crosslaps geeigneter.

5.6 Zyklus und Knochenstoffwechsel

Der weibliche Zyklus setzt sich aus vier Phasen zusammen: dem Östrus, Metöstrus, Diöstrus und Proöstrus. Während des Östrus (Tag 1-3) sinkt Östrogen, im Metöstrus (Tag 4-7) steigt die Progesteronkonzentration, im Diöstrus (Tag 8-17) beginnt Progesteron wieder zu sinken, während des Proöstrus (Tag 18-21) kommt es zum Östrogen-Peak.

Der Zyklus des Schweins ähnelt dem der Frau sehr, allerdings ist die Zykluslänge mit durchschnittlich 21 Tagen (17 bis 25 Tage) etwas kürzer. Knox et al (2003) fanden heraus, dass es einen Progesteron-Peak an Tag 10 des Zyklus bei Schweinen gab mit niedrigem Östradiol-Level und einen Anstieg der Östradiol-Konzentration 5 Tage vor dem Östrus.

In diesem Versuch wurde eine Synchronisation vorgenommen, um die Durchführung des Versuchs zu vereinfachen. Alle Tiere sollten im ungefähr gleichen Zyklusstand sein, um einen Bezug des Hormonstatus auf den Knochenstoffwechsel gewährleisten zu können.

Trotz Synchronisation und Verifizierung der Progesteron- und Östradiol-Konzentrationen durch Rauschebeobachtung, waren große Schwankungen der Zyklusphasen nicht zu vermeiden. Mit 16 Tieren war die Versuchstieranzahl zu gering, um einheitlichere Werte zu erlangen, dazu müsste der Versuch mit einer wesentlich höheren Versuchstieranzahl wiederholt werden.

Der Zusammenhang zwischen Zyklusphasen, den damit einhergehenden Hormonverläufen und dem Knochenstoffwechsel konnte beim Menschen nachgewiesen werden. Massafra et al (1999) konnten bei jungen gesunden Frauen zwischen 20 und 29 Jahren einen signifikanten Zusammenhang zwischen wiederkehrenden Schwankungen von Parathormon, Osteocalcin und Calcitonin und dem Östrogen im Zyklus sowie dem Ausbleiben der Schwankungen ohne Zyklus herstellen.

Zittermann et al (2000) wiesen ebenfalls an jungen und gesunden Frauen monatliche Schwankungen von Knochenformation und Knochenresorption entsprechend dem zyklischen Östrogen nach.

Ein direkter Zusammenhang zwischen den Knochenmarkern Knochenspezifische Alkalische Phosphatase und Pyridinolin und dem Zyklus konnte in diesem Versuch beim Minipig nicht gezeigt werden.

Um dies zu zeigen, müssten eventuell über einen längeren Zeitraum regelmäßig Blutproben in kürzeren Abständen genommen werden, in dieser Untersuchung waren die Abstände eventuell zu lang.

Außerdem sollte die Versuchstieranzahl um ein Vielfaches größer sein, um statistisch signifikante Unterschiede zu erlangen. Bei der Bestimmung von Osteocalcin und Crosslaps im Rahmen dieses Versuchs konnte allerdings ein Zusammenhang zwischen Knochenstoffwechsel und Zyklus nachgewiesen werden.

5.6.1 Progesteron

Progesteron ist ein Steroidhormon, das in den Gelbkörpern, den Follikeln, der Plazenta, aber auch in der Nebennierenrinde gebildet wird. Zum Zeitpunkt des Östrus ist die Progesteron-Konzentration niedrig, im Metöstrus steigt sie an und erreicht im Diöstrus ihren Peak, um bis zum Östrus wieder abzusinken.

Der Progesteron-Test Coat-a-Count RIA wurde gewählt, da er für das Schwein validiert war und komplikationslos durchzuführen war.

Die Bestimmung von Progesteron wurde vorgenommen, um zum einen den Zyklusverlauf zu bestimmen und zum anderen den Erfolg der OHX zu beweisen. In der Graphik ist der Zyklusverlauf erkennbar: im Alter von 48 bis 63 Wochen, dies entspricht der Pubertät beim Menschen, ist die Progesteron-Konzentration sehr gering. Der Östrus ist im Alter von 70 Wochen durch eine niedrige, der Diöstrus im Alter von 72 Wochen durch eine hohe Progesteron-Konzentration gekennzeichnet.

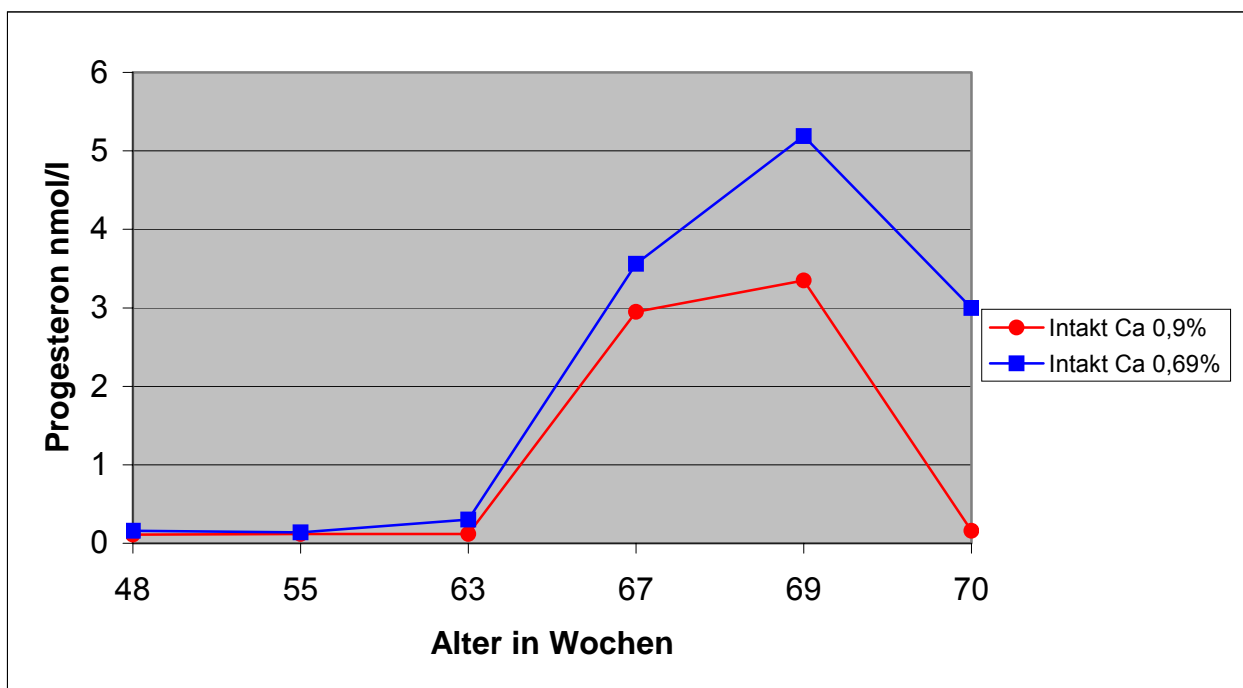


Abbildung 6: mittlere Progesteron-Konzentrationen in nmol/l vor OHX der Gruppe 1 (Intakt Ca 0,9%) und Gruppe 2 (Intakt Ca 0,69%)

Nach OHX fiel die Progesteron-Konzentration der OHX-Gruppe ab, auch wenn sie in Woche 2 und 4 so hoch war wie die der beiden Kontrollgruppen. Dies kann daran liegen, dass die OHX-Gruppe vor der Ovariohysterektomie zwei Wochen lang

Altrenogest, ein synthetisches Progesteron, zugefüttert bekam, um den Östrus zu unterdrücken und damit Blutungen während der Ovariohysterektomie zu vermeiden.

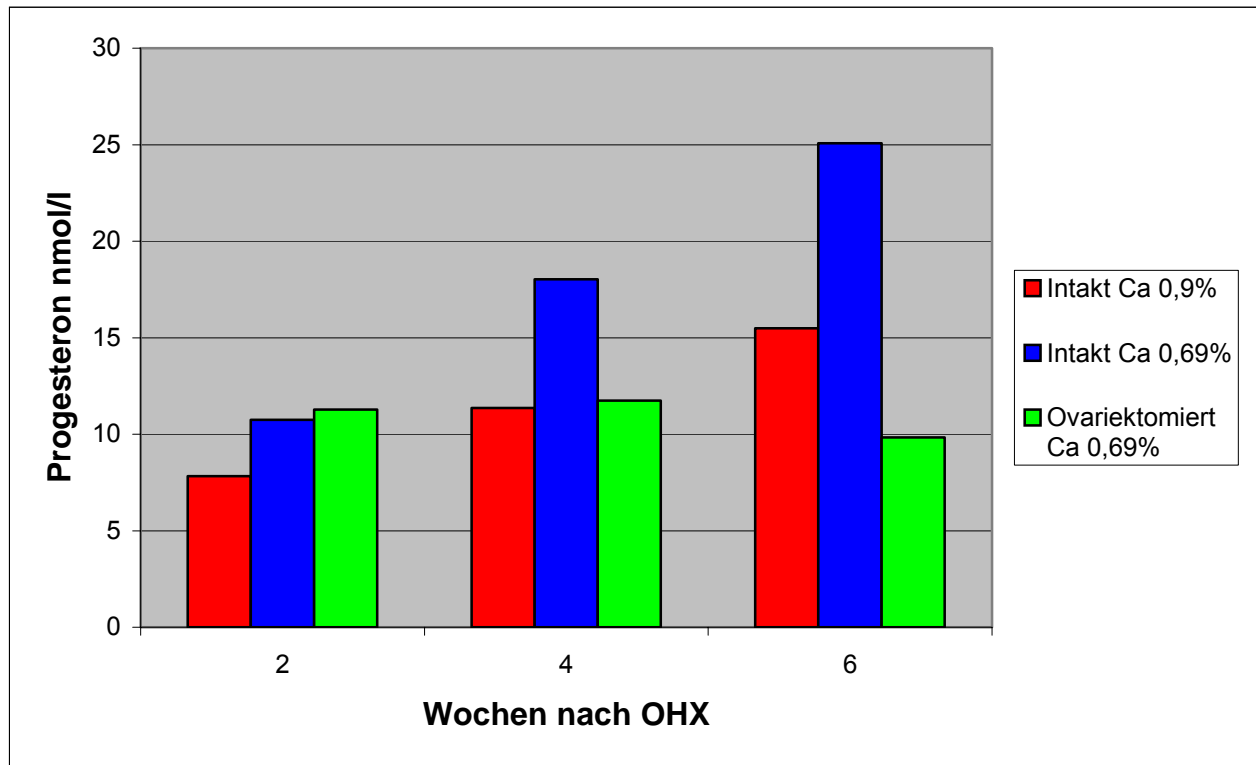


Abbildung 7: mittlere Progesteron-Konzentrationen in nmol/l nach OHX aller Gruppen

In den Wochen 6 und 8 nach OHX lagen die Konzentrationen der beiden Kontrollgruppen zum Zeitpunkt des Diöstrus hoch, die Progesteronwerte der OHX-Gruppe lagen dagegen deutlich niedriger. Dass die Progesteron-Konzentration in der OHX-Gruppe noch weiter abfiel, war nicht zu erwarten, da die Nebennierenrinde auch Progesteron produziert und somit ein gewisser Level bestehen bleibt.

5.6.2 Östradiol

Östradiol wurde bestimmt, um mit einem weiteren Parameter die Zusammenhänge zwischen dem Knochenstoffwechsel und dem Zyklus darstellen zu können und die Auswirkung der OHX zu bestätigen. Da es sich bei der Östradiolbestimmung allerdings um einen sehr aufwendigen Test handelt, wurden nur ausgewählte Entnahmezeitpunkte gemessen. Östradiol wird ebenfalls in den Ovarien, der Plazenta und der Nebennierenrinde gebildet.

Durch die Synchronisation vor der Woche 67 können die Östradiol-Konzentrationen beeinflusst worden sein. Dieser Umstand würde auch erklären, dass zum Zeitpunkt der OHX in Woche 0 in der OHX-Gruppe Östradiol deutlich erhöht war.

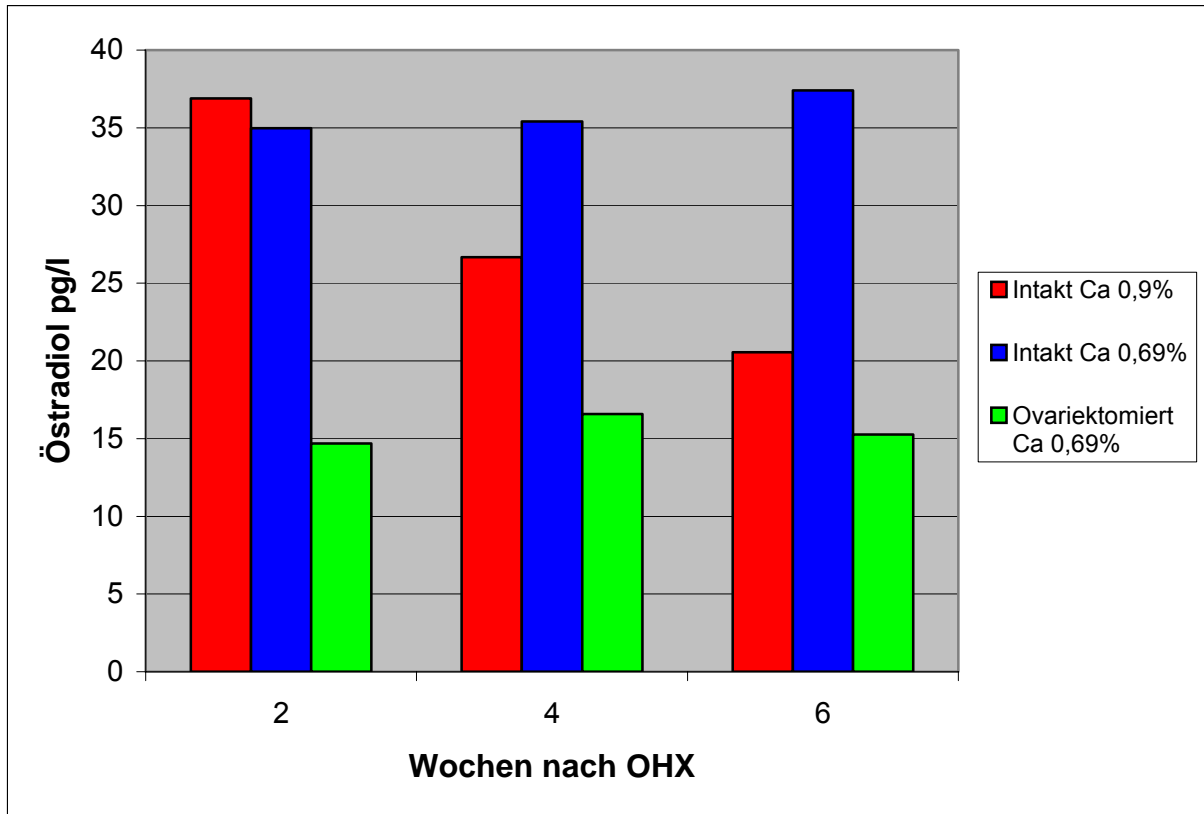


Abbildung 9: mittlere Östradiol-Konzentrationen in pg/l nach OHX aller Gruppen

In den Wochen 2, 4 und 6 nach OHX lagen die Östradiol-Konzentrationen der OHX-Gruppe deutlich unter denen der beiden Kontrollgruppen, dies bestätigte den Erfolg der Ovariohysterektomie. Ein weiteres Absinken von Östradiol war nicht zu erwarten, da die Nebennierenrinde Östradiol produziert und somit eine gewisse Konzentration bestehen bleibt. Auch anhand des Verlaufs von Östradiol war zu erkennen, dass die Entnahmezeitpunkte nicht die Zyklusphasen widerspiegelten.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, am Tiermodell Minipig eine eventuelle Zyklusabhängigkeit des Knochenstoffwechsels zu zeigen und im weiteren Verlauf der Studie die Auswirkung der Ovariohysterektomie bei diesem Großtiermodell auf den Knochenstoffwechsel anhand von ausgewählten Knochenmarkern zu untersuchen.

Die Bestimmung von biochemischen Knochenmarkern hat sich als Osteoporose-Monitoring zur Analyse des Knochenstoffwechsels weit verbreitet. Bei Frauen konnte in diesem Zusammenhang eine Abhängigkeit vom Zyklus nachgewiesen werden.

Für diese Untersuchung wurden 16 weibliche intakte Minipigs nach Gewicht randomisiert in drei Versuchsgruppen eingeteilt. Alle Tiere erhielten ein bedarfsgerechtes Futtermittel, wobei der Calciumgehalt in zwei Gruppen 0,69% und in der dritten Gruppe 0,9% betrug. Die Tiere einer Gruppe wurden nach 65 Wochen ovariohysterektomiert (OHX) und noch weitere 8 Wochen betrachtet. Während des gesamten Versuchszeitraums wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Blutproben entnommen. In diesen Proben wurden zur Kontrolle des Zyklusstands die Hormone Progesteron und Östradiol und zur Beurteilung des Knochenstoffwechsels die Marker Knochenspezifische Alkalische Phosphatase (BAP) und Pyridinolin (PYD) bestimmt.

Die Entwicklung der Knochenmarker BAP und PYD zeigte vor Ovariohysterektomie einen Zusammenhang mit dem altersbedingten Wachstum, wobei bei Pyridinolin ein starker Effekt im Zusammenhang mit der Calciumreduktion zu beobachten war. Dies kann auf einen Anstieg von Parathormon und Calcitriol bei gleichzeitiger Aktivierung der Osteoklasten zurückzuführen sein. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Zyklus und Knochenstoffwechsel konnte nicht belegt werden. Es ist zu überlegen, ob dieser Zusammenhang eventuell in einem Versuch mit größerer Tierzahl und häufigeren Blutentnahmen über einen längeren Zeitraum gezeigt werden könnte.

Nach Ovariohysterektomie konnte der high turnover des Knochenstoffwechsels in einem deutlichen Anstieg der BAP-Konzentration in Woche 4 post OHX gezeigt werden. Bei der Bestimmung von Pyridinolin zeigte sich zu den jeweiligen Probezeitpunkten kein Effekt der OHX.

Diese Studie bestätigt den Nutzen des Minipigs als Osteoporosemodell im Hinblick auf die Verwendung des Knochenformationsmarker Knochenspezifische Alkalische Phosphatase, um dynamische Knochenstoffwechsellvorgänge darzustellen.

7 Summary

Kathrin Reif:

Examination of bone metabolism by means of the bone markers bone specific alkaline phosphatase and pyridinoline in intact and ovariohysterectomized minipigs as an animal model of osteoporosis

The aim of this study was to show a possible estrus cycle dependence of the bone metabolism in the animal model minipig and to examine the effect of the ovariohysterectomy of this large animal model on the bone metabolism on the basis of selected bone markers in the further process of the study.

The determination of biochemical bone markers has been widely established as osteoporosis monitoring for the analysis of the bone metabolism. In women a dependence on the cycle could be proven in this connection.

For this investigation, 16 female intact minipigs were randomized divided into three experimental groups according to weight. All animals received a feed according to need, whereas the calcium content in two groups amounted 0.69% and in the third group 0.9%. The animals of one group were ovariohysterectomized after 65 weeks (OHX) and regarded further 8 weeks. During the entire experiment period, blood samples were taken at different extraction times. In these samples the hormones progesterone and estradiol as a control of the cycle stage and for the evaluation of the bone metabolism the markers bone specific alkaline phosphatase (BAP) and pyridinoline (PYD) were determined.

The development of the bone markers BAP and PYD showed a connection with age related growth before ovariohysterectomy, whereas pyridinoline a strong effect was to be observed in connection with the calcium reduction. This can be due to a rise of parathormone and calcitriol at simultaneous activation of the osteoclasts. A clear connection between cycle and bone metabolism could not be proven.

It is to be considered whether this connection could be possibly shown in an examination with larger animal numbers and more frequent blood sample extractions during a longer period.

After ovariectomy high turnover of bone metabolism could be shown in a clear rise of the BAP concentration in week 4 post OVX. The analysis of pyridinoline pointed no effect of the OVX itself to the respective sample times.

This study confirms the use of the minipig as an animal model of osteoporosis regarding the use of bone formation marker bone specific alkaline phosphatase, in order to represent dynamic bone turnover.

8 Literaturverzeichnis

- Aerssens J, Boonen S, Lowet G and Dequeker J (1998)
Interspecies differences in bone composition, density, and quality: Potential implications for in vivo bone research.
Endocrinology **139**: 663-670
- Allen LC, Allen MJ, Breur GJ, Hoffmann WE, Richardson DC (2000)
A comparison of two techniques for the determination of serum bone-specific alkaline phosphatase activity in dogs.
Res Vet Sci **68**(3): 231-235
- Allen MJ (2003)
Biochemical Markers of Bone Metabolism in Animal: Uses and Limitations.
Vet Clin Path **3**: 101-113
- Anzenbacher P, Soucek P, Anzenbacherova E, Gut I, Hruby K, Svoboda Z, Kvetina J (1998)
Presence and activity of cytochrome P450 isoforms in minipig liver microsomes. Comparison with human liver samples.
Drug Metab Dispos **26**(1): 56-59
- Anzenbacherova E, Anzenbacher P, Zuber R (2002)
Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism.
J Cell Mol Med. **6**(2): 189-198
- Babel B (2007)
Investigations on bone metabolism in intact and ovariohysterectomised miniature pigs.
Vet Med Diss, München
- Bentouimou N, Vaugelade P, Bernard F, Cherbut C, Darcy-Vrillon B (1997)
Compared metabolism effects of seaweed fibres in pigs and humans.
EAAP Publication **88**: 57-60
- Bonde M, Qvist P, Fledelius C, Riis BJ, Christiansen C (1995)
Applications of an enzyme immunoassay for a new marker of bone resorption (CrossLaps): follow-up on hormone replacement therapy and osteoporosis risk assessment.
J Clin Endocrinol Metab **80**(3): 864-868
- Bouchard GF, Durham HE, McOsker JE, Krause GF, Eilersieck MR, Reddy CS (1995)
Determination of the Peak Bone Mass and whole body composition in Sinclair miniature swine
J Bone Miner Res **10** (Suppl.): 476
- Bouchard GF, Boyce RW, Paddock CL, Durham HE, Reddy CS, Tumbleson ME, Schook LB (1997)
Standardization of adult Sinclair miniature swine osteopenia model-preliminary results.
J Bone Miner Res **12** (Suppl.): T500

Boyce RW, Franks AF, Jankowsky ML, Orcutt CM, Piacquadio AM, White JM, Bevan JA (1990)

Sequential histomorphometric changes in cancellous bone from ovariectomized dogs.

J Bone Miner Res **5**(9): 947-953.

Boyce RW, Ebert DC, Youngs TA, Paddock CL, Mosekilede Li, Stevens ML, Gundersen HJG (1995)

Unbiased estimation of vertebral trabecular connectivity in calcium-restricted ovariectomized minipigs.

Bone **16**: 637-642

Bracamonte MP, Rud KS, Owen WG, Miller VM (2002)

Ovariectomy increases mitogens and platelet induced proliferation of arterial smooth muscle.

Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**: 853-860

Brommage R (2001)

Perspectives on using nonhuman primates to understand the etiology and treatment of postmenopausal osteoporosis.

J Musculoskel Neuron Interact **1**: 307-325

Büchter A, Kleinheinz J, Wiesmann HP, Kersken J, Nienkemper M, von Weyrother H, Joos U, Meyer U (2004)

Biological and biomechanical evaluation of bone Remodeling and implant stability after using an osteotome technique.

Clin Oral Impl Res **16**: 1-8

Carter SD, Cromwell GL, Combs TR, Colombo TR, Fanti P (1996)

The determination of serum concentrations of Osteocalcin in growing pigs and its relationship to end-measures of bone mineralization.

J Anim Sci **74**: 2719-2729

Calvo MS, Eyre DR and Gundberg CM (1996)

Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover.

Endocr Rev **17**: 333-336

Cantatore FP and Pipitone V (1999)

Markers of bone turnover: consideration on their clinical application in osteoporosis.

Panminerva Med **41**: 247-251

Chailurkit L, Ongphiphadhanakul NP, Saetung S, Rajatanavin R (2001)

Biochemical markers of bone turnover and response of bone mineral density to intervention in early postmenopausal women: an experience in a clinical laboratory.

Clin Chem **47**: 1083-1088

Claes L, Augat P (1999)

Models in fracture healing.

Report from the Reisingburg workshop

- Consensus development conference (1993)
Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis.
Am J Med **94**: 646-650
- Dannucci GA, Martin RB and Patterson B-P (1987)
Ovariectomy and trabecular bone Remodeling in the dog.
Calcif Tissue Int **40**: 194-199
- Davidson MK, Lindsey JR, Davis JK (1987)
Requirements and selection of an animal model.
Isr J Med Sci **23**: 551-555
- Delmas PD (1986)
Serum bone gla protein (BGP) and other markers of bone mineral metabolism in postmenopausal osteoporosis.
Calcif Tissue Int **39**: 230-233
- Delmas PD (1993)
Biochemical markers of bone turnover for the clinical investigation of osteoporosis.
Osteoporos Int **3**: 81-86
- Dixon JL, Stoops JD, Laughlin MH, Weisman GA, Sturek M (1999)
Dyslipidemia and vascular dysfunction in diabetic pigs fed an atherogenic diet.
Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**: 2981-2992
- Dresner-Pollak R, Parker RA, Poku M, Thompson J, Seibel MJ and Greenspan SL (1996)
Biochemical markers of bone turnover reflect femoral bone loss in elderly women.
Calcif Tissue Int **59**: 328-333
- Ebeling PR, Atley LM, Guthrie JR, Burger HG, Dennerstein L, Hopper JL and Wark JD (1996)
Bone turnover markers and bone density across the menopausal transition.
J Clin Endocrinol Metab **81**: 3366-3371
- Egermann M, Goldhahn J, Schneider E (2005)
Animal models for fracture treatment in osteoporosis.
Osteoporos Int **16**: 129-138
- Eisman JA (1999)
Genetics of Osteoporosis.
Endocrine Reviews **6**: 788-804
- Eriksen EF, Hodgson SF, Eastell R, Cedel SL, O'Fallon WM, Riggs BL (1990)
Cancellous bone remodelling in type 1 (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels.
J Bone Miner Res **5**: 309-311

- Eyre DR, Dickson IR and Van N-K (1988)
Kollagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues.
Biochem J **252**: 495-500
- Faugere MC, Friedler RM, Fanti P and Malluche HH (1990)
Bone changes occurring early after cessation of ovarian function in beagle dogs: A histomorphometric study employing sequential biopsies.
J Bone Miner Res **5**: 263-272
- Fini M, Pierini G, Giavaresi G, Biagini G, Mattioli Belmonte MM, Nicoli Aldini N, Rocca M, Martini L, Giardino R (2000)
The ovariectomised sheep as a model for testing biomaterials and prosthetic devices in osteopenic bone: a preliminary study on iliac crest biopsies.
Int J Artif Organs **23**: 275-281
- Filipponi P, Cristallini S, Policani G, Schifini MF, Casciari C, Garinei P (2000)
Intermittent versus continuous clodronate administration in postmenopausal women with low bone mass.
Bone **26**(3): 269-274
- Finnern HW and Sykes DP (2003)
The hospital cost of vertebral fractures in the EU: estimates using national datasets.
Osteoporos Int **14**: 429-436
- Fritsche A, Stefan N, Hardt E, Haring H, Stumvoll Mm (2000)
Characterisation of beta-cell dysfunction of impaired glucose tolerance: evidence for impairment of incretin-induced insulin secretion.
Diabetologia **43**(7): 852-858
- Gallagher JC (1990)
The pathogenesis of osteoporosis.
Bone Miner **9**: 215-227
- Ganong WF (1991a)
Circulating body fluids.
Appleton & Lange: 479-503
- Ganong WF (1991b)
Endocrine functions of the pancreas.
Appleton & Lange: 312-333
- van Gessel YA, Mani S, Bi S, Hammamieh R, Shupp JW, Das R, Coleman GD, Jett M (2004)
Functional piglet model for the clinical syndrome and postmortem findings induced by staphylococcal enterotoxin B.
Exp Biol Med (Maywood) **229**(10): 1061-1071
- Götte S, Dittmar K (2001)
Epidemiologie und Kosten der Osteoporose.
Der Orthopäde **30**: 402-404

- Gore AV, Liang AC, Chien YW (1998)
Comparative biomembrane permeation of Tacrine using Yucatan Minipigs and Domestic Pigs as the animal model.
J Pharm Sci **87**(4): 441-447
- Grundberg CM, Markowitz ME, Mizruchi M, Rosen JF (1985)
Osteocalcin in human serum: a circadian rhythm.
J Clin End Metab **60**: 736
- Guo CY, Ward W, Cairns P, Atkinson S (2000)
Comparative response in growth and bone status to three dexamethasone treatment regimens in infant piglets.
Pediatr Res **48**: 238-243
- Hartke J (1998)
Non-primate models of osteoporosis.
Lab Anim Sci **48**: 623-629
- Heaney RP (1996)
Bone mass, nutrition, and other lifestyle factors.
Nutr Rev **54**: 3-10
- Hornby SB, Ford SL, Mase CA, Evans GP (1995)
Skeletal changes in the ovariectomized ewe and subsequent response to treatment with 17 beta oestradiol.
Bone **17**: 389-394
- Hueber-Becker F, Nohynek GJ, Meuling WJA, Benesch-Kieffer F, Toutain H (2004)
Human systemic exposure to a [¹⁴C]-para-phenylenediamine-containing oxidative hair dye and correlation with in vitro percutaneous absorption in human or pig skin.
Food Chem Tox **42**: 1227-1236
- Järvinen TLN, Kannus P, Sievänen H (2003)
Estrogen and Bone—a Reproductive and Locomotive Perspective.
J Bone Miner Res **18**(11): 1921-1931
- Jay TR, Heald KA, Carless NJ, Topham DE, Downing R (1999)
The distribution of porcine pancreatic beta-cells at ages 5, 12 and 24 weeks.
Xenotransplantation. **6**(2): 131-140
- Jayo MJ, Jerome CP, Lees CJ, Rankin SE, Weaver DS (1994)
Bone mass in female cynomolgus macaques: a cross-sectional and longitudinal study by age.
Calcif Tissue Int **54**: 231-236
- Jerome CP, Carlson CS, Register TC, Bain FT, Jayo MJ, Weaver DS, Adams MR (1993)
Bone functional changes in intact, ovariectomized, and ovariectomized, hormone-supplemented adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) evaluated by serum markers and dynamic histomorphometry.
J Bone Miner Res **9**: 527-540

Jeusette P, Detilleux J, Cuvelier C, Istasse L, Diez M (2004)
Ad libitum feeding following ovariectomy in female Beagle dogs: effect on maintenance
Energy requirement and on blood metabolites.
J Anim Physiol Anim Nutr **88**: 117-121

Ikeda S, Morishita M, Tsutsumi H, Arita S, Nakamura T (2001)
Characterization of bone mass, strength and turnover in Prednisolone administered
minipigs as a model of steroid induced osteoporosis.
Joint Meeting IBMS/ECTS P455T

Ismail AA, Pye SR, Cockerill WC, Lunt M, Silman AJ, Reeve J, Banzer D,
Benevolenskaya LI, Bhalla A, Bruges AJ, Cannata JB, Cooper C, Delmas PD,
Dequeker J, Dilsen G, Falch JA, Felsch B, Felsenberg D, Finn JD, Gennari C,
Hoszowski K, Jajic I, Janott J, Johnell O, Kanis JA, Kragl G, Lopez VA, Lorenc R,
Lyritis G, Marchand F, Masaryk P, Matthis C, Miazgowski T, Naves DM, Pols HA, Poor
G, Rapado A, Raspe HH, Reid DM, Reisinger W, Scheidt NC, Stepan J, Todd C,
Weber K, Woolf AD and O'Neill TW (2002)
Incidence of limb fracture across Europe: results from the European Prospective
Osteoporosis Study (EPOS).
Osteoporos Int **13**: 565-571

Kalu DN (1991)
The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss.
Bone Miner **15**: 175-191

Kern S (2004)
Der Einfluss von Phytoöstrogenen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Vitamin D und
K auf den Knochenstoffwechsel und die Mikroarchitektur des Knochens:
Untersuchungen am intakten und ovariohysterektomierten Beagle.
Vet Med Diss, München

Knox RV, Vatzias G, Naber CH, Zimmermann DR (2003)
Plasma gonadotropines and ovarian hormones during the estrous cycle in high
compared to low ovulation rate gilts.
J Anim Sci **81**: 249-260

Kobayashi T, Taniguchi S, Ye Y, Niekrasz M, Nour B, Cooper DK (1998)
Comparison of bile chemistry between humans, baboons, and pigs: implications for
clinical and experimental liver xenotransplantation.
Lab Anim Sci. **48**(2):197-200

De Korte CL, Sieresvogel MJ, Mastik F, Strijder C, Schaar JA, Velema E, Pasterkamp
G, Serruys PW, van der Steen AFW (2002)
Identification of atherosclerotic plaque components with intravascular ultrasound
elastography in vivo.
Circulation **105**: 1627-1630

Krammer SJM (2001)
Das Osteoporosemodell Ratte: Einfluss von Phytoöstrogenen, mehrfach ungesättigten
Fettsäuren sowie Vitamin D und K.
Vet Med Diss, München

Kraenzlin ME (1995)

Sinnvolle Osteoporose-Diagnostik in der Praxis

Osteoporose: Moderne Diagnostik - Therapeutische Konsequenzen für Klinik und Praxis (ed: Seibel, MJ and Kraenzlin, ME), 24-29, Karger, Freiburg

Krickhahn M, Meyer T, Buhler C, Thiede A, Ulrichs K (2002)

Highly efficient isolation of porcine islets of Langerhans for xenotransplantation: numbers, purity, yield and in vitro function.

Ann Transplant. **6**(3): 48-54

Kuhn JL, Goldstein SA, Ciarelli MJ and Matthews LS (1989)

The limitations of canine trabecular bone as a model for human: A biomechanical study.

J Biomech **22**: 95-107

Kvetina J, Svoboda Z, Nobilis M, Pastera J, Anzenbacher P (1999)

Experimental Goettingen minipig and beagle dog as two species used in bioequivalence studies for clinical pharmacology (5-aminosalicylic acid and atenolol as model drugs).

Gen Physiol Biophys. Spec No (**18**): 80-85

Lafage HM, Balena R, Battle MA, Shea M, Seedor JG, Klein H, Hayes WC, Rodan G, (1995)

Comparison of alendronate and sodium fluoride effects on cancellous and cortical bone in minipigs.

J Clin Invest **95**: 2127-2133

Lane NE, Sanchez S, Genat HK, Jenkins DK, Arnaud CD (2000)

Short-term increase in bone turnover markers predict parathyroid hormone-induced spinal bone mineral density gains in postmenopausal women with glucocorticoid-induced osteoporosis.

Osteoporos Int **11**(5): 434-442

Larsen MO, Rolin B, Sturis J, Wilken M, Carr RD, Porksen N, Gottfredsen CF (2006)

Measurements of insulin responses as predictive markers of pancreatic beta-cell mass in normal and beta-cell-reduced lean and obese Gottingen minipigs in vivo.

Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(4): 670-677

Larsen MO, Rolin B, Gottfredsen CF, Carr RD, Holst JJ (2004)

Reduction of beta cell mass: partial insulin secretory compensation from the residual beta cell population in the nicotinamide-streptozotocin Gottingen minipig after oral glucose in vivo and in the perfused pancreas.

Diabetologia. **47**(11): 1873-1878

Larsen MO, Rolin B, Ribel U, Wilken M, Deacon CF, Svendsen O, Gottfredsen CF, Carr RD (2003)

Valine pyrrolidide preserves intact glucose-dependent insulinotropic peptide and improves abnormal glucose tolerance in minipigs with reduced beta-cell mass.

Exp Diabetes Res. **4**(2): 93-105

Larsen MO, Rolin B, Wilken M, Carr RD, Svendsen O, Bollen P (2001)
Parameters of glucose and lipid metabolism in the male Gottingen minipig: influence of age, body weight, and breeding family.
Comp Med. **51**(5): 436-442

Larsen MO, Rolin B (2004)
Use of the Gottingen minipig as a model of diabetes, with special focus on type 1 diabetes research.
ILAR J **45**: 303-313

Looker AC, Bauer DC, Chesnut Iii CH, Gundberg CM, Hochberg MC, Klee G, Kleerekoper M, Watts NB and Bell NH (2000)
Clinical use of biochemical markers of bone Remodeling: Current status and future directions.
Osteoporos Int **11**: 467-480

Lundon K, Dumitriu M, Grynopas M (1994)
The long-term effect of ovariectomy on the quality and quantity of cancellous bone in young macaques.
Bone Miner **24**(2): 135-49

Majkic-Singh N, Ilic M, Ignjatovic S and Aleksandra-Postic-Grujin (2002)
Assessment of four biochemical markers of bone metabolism in postmenopausal osteoporosis.
Clin Lab **48**: 407-413

Maier GW, Kreis ME, Zittel TT, Becker HD (1995)
Calcium regulation and bone mass lost after total gastrectomy in pigs.
Ann Surg **225**(2): 181-192

Malluche HH, Faugere MC, Rush M and Friedler R (1986b)
Osteoblastic insufficiency is responsible for maintenance of osteopenia after loss of ovarian function in experimental beagle dogs.
Endocrinology **119**: 2649-2654

Malluche HH, Faugere MC, Friedler RM and Fanti P (1988)
1,25-Dihydroxyvitamin D-3 corrects bone loss but suppresses bone Remodeling in ovariectomized beagle dogs.
Endocrinology **122**: 1998-2006

Martin RK, Albright JP, Jee WS, Taylor GN and Clarke WR (1981)
Bone loss in the beagle tibia: influence of age, weight, and sex.
Calcif Tissue Int **33**: 233-238

Massafra C, De Felice C, Agnusdei DP, Gioia D, bagnoli F (1999)
Androgens and Osteocalcin during menstrual cycle.
J Clin End Met **84**: 971-974

Meyer H and Zentek J (1998)
Ernährung des Hundes
3. Auflage, Parey Buchverlag, Berlin

- Miller LC, Weaver DS, McAlister JA, Koritnik DR (1986)
Effects of ovariectomy on vertebral trabecular bone in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*).
Calcif Tissue Int **38**: 62-65
- Monier-Faugere MC, Friedler RM, Bauss F and Malluche HH (1993)
A new bisphosphonate, BM 21.0955, prevents bone loss associated with cessation of ovarian function in experimental dogs.
J Bone Miner Res **8**: 1345-1355
- Monier-Faugere MC, Geng Z, Qi Q, Arnala I and Malluche HH (1996)
Calcitonin prevents bone loss but decreases osteoblastic activity in ovariectomized beagle dogs.
J Bone Miner Res **11**: 446-455
- Monier-Faugere MC, Geng Z, Paschalis EP, Qi Q, Arnala I, Bauss F, Boskey AL and Malluche HH (1999)
Intermittent and continuous administration of the bisphosphonate ibandronate in ovariectomized beagle dogs: effects on bone morphometry and mineral properties.
J Bone Miner Res **14**: 1768-1778
- Monshouwer M, Villar D, Furusawa N, Van Miert AS (1998)
Novobiocin inhibits both UDP-glucuronosyltransferase and cytochrome P450-mediated enzyme activities in pig liver microsomes.
Vet Res Commun. **22**(6): 405-414
- Mori R, Kodaka T, Soeta S, Sato J, Kakino J, Hamato S, Takahi H, Naito Y (2005)
Preliminary study of histological comparison on the growth patterns of long-bone cortex in young calf, pig and sheep.
J Vet Med Sci **67**(12): 1223-1229
- Mosekilde L, Kragstrup J, Richards A (1987)
Compressive strength, ash weight and volume of vertebral trabecular bone in experimental fluorosis in pigs.
Calcif Tissue Int **40**: 318-322
- Mosekilde L, Weisbrode SE, Safron JA, Stills HF, Jankowsky ML, Ebert DC, Danielsen CC, Sogaard CH, Franks AF, Stevens ML, Paddock CL, Boyce RW (1993a)
Calcium-restricted ovariectomized Sinclair S-1 minipigs: An animal model of osteopenia and trabecular plate perforation.
Bone **14**: 379-382
- Mosekilde L, Weisbrode SE, Safron JA, Stills HF, Jankowsky ML, Ebert DC, Danielsen CC, Sogaard CH, Franks AF, Stevens ML, Paddock CL, Boyce RW (1993b)
Evaluation of the skeletal effects of combined mild dietary calcium restriction and ovariectomy in Sinclair S-1 minipigs: a pilot study.
J Bone Miner Res **8**: 1311-1321

- Murakami T, Hitomi S, Ohtsuka A, Taguchi T, Fujita T (1997)
Pancreatic insulo-acinar portal systems in humans, rats, and some other mammals: scanning electron microscopy of vascular casts.
Microsc Res Tech: **37**(5-6): 478-488.
- Newman E, Turner AS and Wark JD (1995)
The potential of sheep for the study of osteopenia: Current status and comparison with other animal models.
Bone **16**: 277-284
- Nishizawa Y, Nakamura T, Ohata H, Kushida K, Gorai I, Shiraki M, Fukunaga M, Hosoi T, Miki T, Nakatsuka K and Miura M (2001)
Guidelines on the use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis
J Bone Miner Metab **19**: 338-344
- O'Halloran DJ, Tsatsoulis A, Whitehouse RW (1993)
Increased bone density after growth hormone (HGH) therapy in adults with isolated HGH deficiency.
J Clin Endo Metab **76**: 1344-1348
- Ohta H, Makita K, Komukai S and Nozawa S (2002)
Bone resorption versus estrogen loss following oophorectomy and menopause.
Maturitas **43**: 27-33
- Onishi H, Inoue K, Osaka H, Nagatomo H, Ando N, Yamada Y, Suzuki K, Hanihara T, Kawamoto S, Okuda K (1991b)
MELAS associated with diabetes mellitus and point mutation in mitochondrial DNA.
No To Shinkei **44**(3): 259-264
- Oursler MJ, Cortese C, Keeting P, Anderson MA, Bonde SK, Riggs BL, Spelsberg TC (1991)
Modulation of transforming growth factor-beta production in normal human osteoblast-like cells by 17 beta-estradiol and parathyroid hormone.
Endocrinology **129**(6): 3313-3320
- Pedrazzoni M, Alfano FS, Girasole G (1996)
Clinical observations with a new specific assay for bone alkaline phosphatase: a cross-sectional study in osteoporotic and pagetic subjects and longitudinal evaluation of the response to ovariectomy, estrogens and bisphosphonates.
Calcif Tissue Int **59**: 334-338
- Pfeilschifter J, Chenu C, Mundy GR, Roodman GD (1988)
Transforming growth factor beta inhibits formation of osteoclast-like cells in long-term human marrow cultures.
Proc Natl Acad Sci USA **85**(15): 5683-5687
- Price CP, Thompson PW (1995)
The role of biochemical tests in the screening and monitoring of osteoporosis.
Ann Clin Biochem **32**: 1-17

Raisz LG (1999)

Physiology and pathophysiology of bone Remodeling.
Clin Chem **45**: 1353-1358

Rambeck WA, Birner H, Wehr U, Stempfle HU, Scholz-Ahrens K and Rambeck B (1996)

Urinary pyridinium crosslinks as markers of bone resorption in osteoporosis.
Osteoporosis **6**: Suppl. 1 PTu 771

Raschke M, Wildemann B, Inden P, Bail H, Flyvbjerg A, Hoffmann J, Haas NP, Schmidmaier G (2002)

Insulin-like Growth Factor-1 and Transforming Growth Factor- β 1 accelerates Oosteotomy healing using Polylactide-coated implants as a delivery system: a biomechanical and histological study in minipigs.
Bone **30**(1): 144-151

Recker RR, Kimmel DB, Parfitt AM, Davies KM, Keshawarz N, Hinders S (1988)
Static and tetracycline- based bone histomorphometric data from 34 normal postmenopausal females.

J Bone Miner Res **3**: 133-144

Resch H, Pietschmann P, Woloszczuk W, Krexner E, Bernecker P, Willvonseder (1992)

Bone mass and biochemical parameters of bone metabolism in men with spinal osteoporosis.

Eur J Clin Invest **8**: 542-545

Rico H, Arribas I, Villa LF, Casanova FJ, Hernandez ER and Cortes PJ (2002)

Can a determination of tartrate-resistant acid phosphatase predict postmenopausal loss of bone mass?

Eur J Clin Invest **32**: 274-278

Rieder MA (2000)

Knochenmarker bei ovariektomierten Ratten und Schafen: Tiermodelle der postmenopausalen Osteoporose.

Vet Med Diss, München

Riggs BL and Melton LJ (1995)

The worldwide problem of osteoporosis: Insights afforded by epidemiology.

Bone **17**: 505-511

Ritz E, Kuster S, Schmidt-Gayk H, Stein G, Scholz C, Kraatz G, Heidland A (1995)

Low-dose calcitriol prevents the rise in 1,84-iPTH without affecting serum calcium and phosphate in patients with moderate renal failure (prospective placebo-controlled multicentre trial).

Nephrol Dial Transplant **12**: 2228-2234

Rodgers JB, Monier-Faugere MC, Malluche H (1993)

Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function.

Bone **14**: 369-377

Roodman GD (1993)

Role of cytokines in the regulation of bone resorption.
Calcif Tissue Int **53**(Suppl 1): 94-98

Rosen CJ, Donahue LR, Hunter SJ (1994)

Insulin-like growth factors and bone: the osteoporosis connection.
Proc Soc Exp Biol Med **206**(2): 83-102

Ross PD (1998)

Osteoporosis: epidemiology and risk assessment.
J Nutr Health Aging **2**(3): 178-183

Ross PD, Knowlton W (1998)

Rapid bone loss is associated with increased levels of biochemical markers.
J Bone Miner Res **13**: 297-302

Scariano JK, Garry PJ, Montoya GD, Duran VE and Baumgartner RN (2002)

Diagnostic efficacy of serum cross-linked N-telopeptide (NTx) and aminoterminal proKollagen extension propeptide (PINP) measurements for identifying elderly women with decreased bone mineral density.
Scand J Clin Lab Invest **62**: 237-243

Schmolke B (2001)

Labordiagnostik der Osteoporose.
Orthopäde **30**: 425-436

Seifert-Klauss V, Mueller JE, Luppä P, Probst R, Wilker J, Hoss C, Treumann T, Kastner C and Ulm K (2002)

Bone metabolism during the perimenopausal transition: a prospective study.
Maturitas **41**: 23-33

Seibel MJ and Raue F (1993)

Biochemical markers of bone metabolism - Significance for evaluation of osteoporosis
Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels und ihre Bedeutung bei der Osteoporose-Diagnostik; Stellungnahme der Sektion "Calcium-regulierende Hormone und Knochenstoffwechsel", Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie.
Klin Labor **39**: 341-345

Sims NA, Morris HA, Moore RJ, Durbridge TC (1996)

Increased bone resorption precedes increased bone formation in the ovariectomized rats.
Calcif Tissue Int. **59**(2): 121-127

Skaanild MT, Friis C (1999)

Cytochrome P450 sex differences in minipigs and conventional pigs.
Pharmacol Toxicol. **85**(4): 174-180

Spencer GR (1979)

Pregnancy and lactational osteoporosis. Animal model: porcine lactational osteoporosis.
Am J Pathol **95**: 277-280

Stracke H (1992)

Osteoporose: Was ist gesichert in der Therapie?
Arcis Verlag, München

Swaminathan R (2001)

Biochemical markers of bone turnover.
Clinical Chimica Acta **313**: 95-105

Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM and Ke HZ (1995)

FDA guidelines and animal models for osteoporosis.
Bone **17**: 125-133

Turner, R. T. Evans, G. L. Wakley, G. K. (1993)

Mechanism of action of estrogen on cancellous bone balance in tibiae of ovariectomized growing rats: inhibition of indices of formation and resorption.
J Bone Miner Res (**8**): 359-366

Tsutsumi H, Inui A, Itamoto K, Takuma T, Tanigawa M, Hayasaki M, Taura Y, Mamba K (2004)

Age-related changes of bone mineral density and microarchitecture in miniature pigs.
J Vet Med Sci **66**(6): 599-609

Turner AS, Alvis M, Myers W, Stevens ML, Lundy MW (1995a)

Changes in bone mineral density and bone-specific alkaline phosphatase in ovariectomized ewes.
Bone **17**: 395-402

Turner AS, Mallinckrodt CH, Alvis MR, Bryant HU (1995b)

Dose-response effects of estradiol implants on bone mineral density in ovariectomized ewes.
Bone **17**: 421-427

Turner AS, Mallinckrodt CH, Alvis MR, Bryant HU (1995c)

Dual-energy X-ray absorptiometry in sheep: experiences with in vivo and ex vivo studies.
Bone **17**: 381-387

Turner AS (2001)

Animal Models of osteoporosis - necessity and limitations.
European Cells and Materials **1**: 66-81

Uiker SC, Bowman BM, Jee WSS (1995)

Available animal models of osteopenia: small and large.
Bone **17**: 117-125

Urena P, Ferriera A, Kung VT, Morieux C, Simon P, Ang KS, Souberbielle JC, Segre GV, Drueke TB, De Vernejoul MC (1995)

Serum pyridinoline as a specific marker of Kollagen breakdown and bone metabolism in hemodialysis patients.
J Bone Miner Res **10**(6): 932-939

- Vilei MT, Granato A, Ferrareso C, Neri D, Carraro P, Gerunda G, Muraca M (2001)
Comparison of pig, human and rat hepatocytes as a source of liver specific metabolic functions in culture systems--implications for use in bioartificial liver devices.
Int J Artif Organs **24** (6): 392-396
- Wehr U, Schlachter M, Lensing A, Scholz-Ahrens KE, Thielen C, Kienzle E and Rambeck WA (1997)
Biochemical markers of bone resorption in rats, pigs and horses.
Abstract book ESVCN Conference Munich 27
- Woitge HW, Seibel MJ and Ziegler R (1996)
Comparison of total and bone-specific alkaline phosphatase in patients with nonskeletal disorder or metabolic bone diseases.
Clin Chem **42**: 1796-1804
- 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
- Wirner M (1997)
Knochenresorptionsparameter bei Herztransplantationen. Osteoporoseprävention mit 1 alpha, 25 Dihydroxyvitamin D3.
Vet Med Diss, München
- Yamaura M, Nakamura T, Nagai Y, Yoshihara A, Suzuki K (1993)
Reduced mechanical competence of bone by ovariectomy and its preservation with 24R, 25- dihydroxyvitamin D3 administration in beagles.
Calcif Tissue Int **52**: 49-56
- Yilmaz N, Bayram M, Erbagci AB and Kilincer MS (1999)
Diagnostic value of biochemical markers of bone turnover and postmenopausal osteoporosis.
Clin Chem Lab Med **37**: 137-143
- Yoshida Y, Moriya A, Kitamura K, Inazu M, Okimoto N, Okazaki Y and Nakamura T (1998)
Responses of trabecular and cortical bone turnover and bone mass and strength to bisphosphonate YH529 in ovariectomized beagles with calcium restriction.
J Bone Miner Res **13**: 1011-1022
- Zittermann A, Schwarz I, Scheld K, Sudhop T, Berthold HK, Von Bergmann K, Van Der Ven H, Stehle P (2000)
Physiologic fluctuations of serum estradiol levels influence biochemical markers of bone resorption in young women
J Clin Endocrinol Metab **85**: 95

9 Danksagung

Bei Herrn Prof. W. A. Rambeck möchte ich mich besonders bedanken. Ihm danke ich für die Überlassung des Themas, sowie für seine Betreuung und Hilfe zu jeder Zeit.

Ein weiterer Dank gilt meinem Betreuer Uli Wehr, der sich für Fragen Zeit nahm und mir bei Problemen weiterhalf.

Den Mitarbeitern im Institut, besonders Herrn Werner Hesselbach danke ich für die Unterstützung, vor allem bei der Bedienung des ep-Motion für die ELISAs. Er hatte jederzeit ein offenes Ohr für alle Probleme und immer ein tröstendes Wort.

Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeitern am Oberwiesenfeld. Besonders Adrian, der sich um unsere Minipigs gekümmert hat.

Ein besonderer Dank geht an die Klinik für Schweine in Oberschleißheim. Herrn Professor Heinritzi danke ich für die Bereitstellung des OPs. Frau Astrid Mette gilt mein herzlicher Dank für die Anästhesie während der Ovariohysterektomie und der Klauenpflege. Bei Dr. Andreas Palzer und Dr. Matthias Ritzmann möchte ich mich für die medizinische Betreuung unserer Minipigs bedanken, jederzeit konnte ich mich auf ihre Unterstützung verlassen.

Herrn Professor Goldberg und Frau Sieglinde Hirmer gilt mein herzlicher Dank für die Benutzung des Isotopenlabors inklusive nützlicher Ratschläge. Bei Professor Ammer möchte ich mich ebenfalls für die Nutzung des Gamma-Counters bedanken.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt meiner Mitdotorandin Brenda Babel, ohne die ich diese Doktorarbeit nicht angefangen und nie geschafft hätte. Brenda hat sich von Anfang an viel Zeit für mich genommen und mich mit ihrer zielstrebigem Art stets motiviert.

Von Herzen danke ich meinen Eltern, die mich zu jeder Zeit unterstützt haben und immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten. Sie haben es stets verstanden mir Mut zu machen.

Ganz besonders danke ich meinem Mann Tino. Seinem Verständnis und seiner Unterstützung konnte ich mir immer sicher sein. Ohne ihn hätte ich es nicht geschafft.

Mein Dank gilt auch besonders Martina und Gabi, die mir immer wieder gute Tipps gaben und mich motivierten. Gabi gilt mein besonderer Dank für das unermüdliche Korrektur lesen.

Bei meiner ganzen Familie möchte ich mich bedanken: Tine, Henning, Sonja, Manfred, und der gesamten restlichen Familie. Sie haben mir immer wieder Mut gemacht, mich getröstet und bedauert.

Meinen Freundinnen Anika, Nicole, Amelie, Maria, Anne und allen anderen, die ebenfalls promovieren, danke ich herzlich: sie haben immer verstanden, mich aufzubauen und zu unterstützen.

Meinen Hunden Roxy und Bobby danke ich für die Ablenkung, sie haben mich immer wieder aufgemuntert.

Dr. House und Dr. Grey möchte ich für ihre fachliche Hilfe danken, auch wenn ich leider weder Lupus noch MS in dieser Dissertation unterbringen konnte.

10 Lebenslauf

Kathrin Reif geb. Doose

01.08.1976 geboren in Siegen als Tochter von Elke Doose, geb. Meier
und Werner Doose

1983 - 1987 Besuch der Grundschule in Obernetphen

19887 - 1996 Besuch des Fürst-Johann-Moritz Gymnasiums in Siegen

23.06.1996 Allgemeine Hochschulreife

1996 - 1998 Ausbildung zur Biol. Techn. Assistentin (BTA) an der Rheinischen
Akademie e.V. Köln

Januar 1999 -

Oktober 1999 angestellt als BTA am Dt. Krebsforschungszentrum in Heidelberg

1999 - 2005 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität
München

25.01.2005 3. Staatsexamen

22.02.2005 Approbation als Tierärztin

Juli 2005 Beginn der Arbeit an der vorliegenden Dissertation