

**Aus der Klinik für Pferde, Allgemeine Chirurgie und Radiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin**

**Einfluss der Kastration auf die Steroidhormone und den Knochenstoffwechsel
beim Hengst**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Martin Jürgen Thunig
Tierarzt aus Berlin-Spandau**

Berlin 2020

Journal-Nr.: 4097

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Prof. Dr. Bianca Carstanjen
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Handler
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): stallions, metabolism, bones, hormones, biochemical markers, blood samples, osteocalcin, phosphatases, estradiol, testosterone, collagen

Tag der Promotion: 25.05.2020

Meiner Familie

meinem Opa Friedrich Giese

und meinen Kindern Julian und Florian

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Methodisches Vorgehen	2
3	Grundlagen	2
3.1	Aufbau, Struktur und Funktionen des Knochengewebes	2
3.1.1	Aufbau des Knochengewebes	2
3.1.1.1	Organische Matrix	3
3.1.1.2	Anorganische Matrix	3
3.1.1.3	Zellen des Knochens	3
3.1.1.3.1	Osteoblasten	3
3.1.1.3.2	Osteozyten	5
3.1.1.3.3	Osteoklasten	6
3.1.2	Struktur des Knochengewebes	8
3.1.2.1	Aufbau Primärstruktur	8
3.1.2.2	Aufbau Sekundärstruktur	8
3.1.2.2.1	Substantia compacta	8
3.1.2.2.2	Substantia spongiosa	9
3.1.2.2.3	Weitere Strukturen	10
3.1.3	Funktionen des Knochengewebes	10
3.1.3.1	Biomechanische Aspekte	10
3.1.3.2	Mechanotransduktions-Kaskade	11
3.1.3.3	Zelluläre Mechanismen	11
3.1.3.4	Knochenwachstum und Regeneration (Modeling)	12
3.1.3.5	Adaptation des Knochengewebes (Remodeling)	13
3.2	Knochenmarker beim Pferd	14
3.2.1	Nichtkollagene Aufbauprodukte	15
3.2.1.1	Osteokalzin	15
3.2.1.2	Alkalische Phosphatase des Knochens	17
3.2.3	Nichtkollagene Abbaumarker: Tartrat-resistente saure Phosphatase-5b	19
3.2.4	Nichtkollagene Abbaumarker: Bone Sialoprotein, Kathepsin K	19
3.2.5	Kollagenabbauprodukte: Pyridinolin, Deoxypyridinolin, Hydroxyprolin, Carboxy-terminales Telopeptid des Typ-I-Kollagens, Carboxy-terminales Telopeptid-Fragment des Typ-I-Kollagens (durch Matrix-Metalloproteinase getrennt)	20
3.3	Geschlechtshormone beim Hengst und deren Regulation	22
3.3.1	Geschlechtshormone	22
3.3.1.1	Steroidhormone	22
3.3.1.1.1	Androgene	22
3.3.1.1.2	Östrogene	23

Inhaltsverzeichnis

3.3.1.2	Proteohormone	24
3.3.1.2.1	Gonadoliberin	24
3.3.1.2.2	Follikelstimulierendes Hormon	24
3.3.1.2.3	Luteinisierendes Hormon	24
3.3.1.2.4	Prolaktin.....	25
3.3.1.2.5	Inhibin	25
3.3.2	Hormonale Steuerung der Gonadenfunktion beim fertilen Hengst.....	25
3.3.3	Hormonelle Konsequenzen nach der Kastration	26
3.4	Einfluss der Steroidhormone auf den Knochenstoffwechsel.....	27
3.4.1	Physiologische Effekte der Östrogene	27
3.4.2	Physiologische Effekte der Androgene.....	28
3.4.3	Transduktion durch Sexualsteroid-Rezeptoren	28
3.4.4	Molekulare Mediatoren der Sexualsteroidwirkung bei Knochenzellen	32
3.4.5	Einfluss des Östrogendefizits auf die Adaptationsfähigkeit des Knochengewebes	33
4	Eigene Untersuchungen	34
4.1	Material und Methoden	34
4.1.1	Versuchsziel	34
4.1.2	Gruppeneinteilung Hengste	34
4.1.2.1	Kastratengruppen	34
4.1.2.2	Kontrollgruppe.....	35
4.1.2.3	Althengste.....	35
4.1.3	Versuchskonzept	36
4.1.4	Versuchsdurchführung.....	36
4.1.4.1	Allgemeine Untersuchung	36
4.1.4.2	Durchführung Blutentnahme	37
4.1.4.3	Aufbereitung Blutproben	37
4.1.4.4	Kastration und Kastrationstechnik.....	37
4.1.5	Laboruntersuchungen	37
4.1.5.1	Messung Osteokalzin-Konzentration.....	37
4.1.5.2	Messung Bone Alkaline Phosphatase-Aktivität.....	38
4.1.5.3	Messung der Konzentration des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I- Kollagens	39
4.1.5.4	Messung Östradiol-Konzentration	39
4.1.5.5	Messung Testosteron-Konzentration.....	40
4.1.5.6	Blutuntersuchung	40
4.1.5.7	Fibrinogenbestimmung.....	41

Inhaltsverzeichnis

4.1.5.8	Creatinin- und gamma-Glutamyltransferase-Konzentration	41
4.1.6	Statistische Methoden.....	41
4.2	Ergebnisse	42
4.2.1	Bone Alkaline Phosphatase	43
4.2.1.1	Einzelwerte Bone Alkaline Phosphatase-Aktivität.....	43
4.2.1.2	Mittelwerte Bone Alkaline Phosphatase-Aktivität.....	47
4.2.1.3	Einordnung der Bone Alkaline Phosphatase-Aktivität der nachträglich Kastrierten in Feld C	48
4.2.1.4	Ergebniszusammenfassung für Bone Alkaline Phosphatase.....	49
4.2.2	Osteokalzin	50
4.2.2.1	Einzelwerte Osteokalzin-Konzentration.....	50
4.2.2.2	Mittelwerte Osteokalzin-Konzentration	52
4.2.2.3	Einordnung der Osteokalzin-Werte der nachträglich Kastrierten aus Feld C	54
4.2.2.4	Ergebniszusammenfassung für Osteokalzin.....	54
4.2.3	Carboxy-terminales Telopeptid des Typ-I-Kollagens	54
4.2.3.1	Einzelwerte für die Konzentration des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I Kollagens	54
4.2.3.2	Mittelwerte der Konzentration des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I-Kollagens.....	59
4.2.3.3	Einordnung der Werte des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I- Kollagens der nachträglich Kastrierten aus Feld C.....	60
4.2.3.4	Ergebniszusammenfassung für die Konzentration des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I-Kollagens	61
4.2.4	Testosteron.....	62
4.2.4.1	Einzelwerte für die Testosteron-Konzentration	62
4.2.4.2	Mittelwerte Testosteron-Konzentration	63
4.2.4.3	Ergebniszusammenfassung für Testosteron	64
4.2.5	Östradiol	64
4.2.5.1	Einzelwerte Östradiol-Konzentration	64
4.2.5.2	Mittelwerte Östradiol-Konzentration	65
4.2.5.3	Ergebniszusammenfassung für Östradiol.....	66
4.2.6	Verhältnis Knochenstoffwechselmarkern zu Steroidhormonen.....	66
4.2.6.1	Einzelwerte des Verhältnisses von Knochenstoffwechselmarkern zu Geschlechtshormonen	66
4.2.6.2	Mittelwerte des Verhältnisses von Knochenstoffwechselmarkern zu Geschlechtshormonen	67

Inhaltsverzeichnis

4.2.6.3	Ergebniszusammenfassung des Verhältnisses Knochenstoffwechselmarker zu Steroidhormonen	68
4.2.7	Korrelationen	68
4.2.7.1	Darstellung der Korrelationen nach Pearson	68
4.2.7.2	Darstellung der Korrelationen nach Spearman	69
4.2.8	Verhältnis Knochenaufbau zu Knochenabbau	71
4.2.8.1	Einzelwerte Verhältnis Knochenaufbau zu Knochenabbau	71
4.2.8.2	Mittelwerte Verhältnis Knochenaufbau zu Knochenabbau	73
4.2.9.3	Einordnung Verhältnis Knochenaufbau zu Knochenabbau bei den nachträglich Kastrierten aus Feld C	75
4.2.8.4	Ergebniszusammenfassung für das Verhältnis Knochenabbau zu Knochenaufbau	75
4.2.9	Abweichungen der Laborergebnisse	76
5	Diskussion	76
5.1	Methodenkritik	76
5.1.1	Pferde, Haltung und Fütterung	76
5.1.2	Versuchsdurchführung	77
5.1.3	Auswahl der Untersuchungsparameter	77
5.2	Vergleichbarkeit der Ergebnisse zum wissenschaftlichen Kontext	78
5.2.1	Vergleichbarkeit der Messergebnisse für Bone Alkaline Phosphatase	78
5.2.2	Vergleichbarkeit der Messergebnisse für Osteokalzin	79
5.2.3	Vergleichbarkeit der Messergebnisse für die Konzentration des Carboxyterminalen Telopeptids des Typ-I-Kollagens	80
5.2.4	Vergleichbarkeit der Messergebnisse für Testosteron	81
5.2.5	Vergleichbarkeit der Messergebnisse für Östradiol	81
5.3	Einfluss des Alters auf die Knochenstoffwechselmarker	82
5.4	Einfluss der Kastration auf den Knochenstoffwechsel	82
5.5	Schlussbemerkung	84
6	Zusammenfassung	86
7	Summary	88
8	Literaturübersicht	89
9	Anhang	117
10	Danksagung	125
11	Selbständigkeitserklärung	126

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
¹²⁵ I	Jod-Isotop (125)
3-D	3-Dimensional
Abb.	Abbildung
ABP	Androgen-binding Protein
ACT	Aktivin
AG	Aktiengesellschaft
AND	Androstendiol
AP	Alkalische Phosphatase
apoptot.	Apoptotisch
AR	Androgenrezeptor
A-R-F	Aktivierung-Resorption-Formation
ArKO	Aromatase knockout mouse
ATP	Adenosintriphosphat
BALP	Bone Alkaline Phosphatase
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMU	Bone Multicellular Unit
BSA	Bovine Serum-Albumin
BSP	Bone-Sialo Protein
B-Zelle	Lymphozyt aus dem Knochenmark
C	Chemisches Element: Kohlenstoff
Ca	Chemisches Element: Kalzium
ca.	circa
c-Fos	Proto-Onkogen; frühes Wachstumsregulator-Gen
CKII	Osteocyte-derived-Casein-Kinase II
c-Jun	Proto-Onkogen; frühes Wachstumsregulator-Gen
cpm	counts per minute
c-Src	Tyrosinkinase
C-terminal	Carboxy-terminal
CTX-I	Carboxy-terminales Telopeptid des Typ I Kollagens
CTX-MMP	Carboxy-terminales Telopeptid-Fragment des Typ-I-Kollagens (durch Matrix-Metalloproteinase getrennt)
DERKO	double ER knockout mouse
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DIMDI	Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information
Dkk	Dickkopf-1 Protein
Dlx5	distal-less homeobox 5
DMD	Dorsal Metacarpal Disease
DMP-1	Dentin Matrix Protein-1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPD	Deoxypyridinolin
Dr.	Doktor
E	Östrogene
E ₁	Östron
E11	Antigenstruktur auf Osteoblasten und Osteozyten
E ₂	Östradiol
E ₃	Östriol
ECLIA	Electrochemiluminiszent sandwich antibody assay
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay
ER-α	Östrogenrezeptor α
ER-β	Östrogenrezeptor β
et al.	lat.: und weitere

Abkürzungsverzeichnis

Fa.	Firma
FGF	Fibroblast Growth Factor
FRA1	FOS-related antigen
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FU	Freie Universität
G	Gauge-Wert: Außendurchmesser
g	Gravitationskonstante
ggf.	gegebenenfalls
GmbH	Gemeinschaft mit beschränkter Haftung
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GnRH	Gonadotropin releasing Hormon
h	Engl.: hour = Stunde
HCl	Salzsäure
HEDTA	Hydroxyethyl-ethylendiamintriessigsäure
HSD	Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase
HYP	Hydroxyprolin
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IGF-I	Insulin Growth Factor I
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
INH	Inhibin
JunD	ein Aktivatorprotein-1 (AP-1); reguliert die Knochenmasse
kDa	kilo-Dalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LH	Luteinisierendes Hormon
LRP5	Lipoprotein
LRP5/ 6	spezifisches Rezeptorprotein
LSD	engl.: Least significance Difference
M	Molzahl
M.v.	Mutter von
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
M-CSF	Makrophage colony stimulating factor
MEPE	Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP II	Matrix-Metallo-Proteinase II
mol	Mol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MsX	msh homeobox homologue 2
Mw	Mittelwert
n	Anzahl
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFAT	Nuclear Factor of activated T-Cells
NGF	Nerve Growth Factor
nm	Nanometer
NNR	Nebennierenrinde
NO	Stickoxid
NTX	N-terminal Telopeptid des Typ I Kollagens
OC	Osteokalzin
OH-	Hydroxy-
OPG	Osteoprotegerin

Abkürzungsverzeichnis

Osx	Osterix
P	Irrtumswahrscheinlichkeit (Probabilität)
PG	Prostaglandin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
pH	lat.: potentia Hydrogenii: Maß für eine saure oder alkalische Reaktion einer wässrigen Lösung
PICP	Carboxy-terminales Propeptid des Typ I Kollagens
p-NPP	p-Nitrophenylphosphat
pOC	Osteoklasten-Precursorzelle
Precursor	engl.: Vorläufer
PTH	Parathormon
PYD	Pyridinolin
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RANKL	Rezeptor activator of NF- κ B-Ligand
resp.	Respektive
RIA	Radioimmunoassay
RLU	Relative Light Units
r _P	Korrelationskoeffizient nach Pearson
r _{Sp}	Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho
RunX	runt-related Transkriptionsfaktor 2
SD	Standartabweichung
SHBG	Sexual-Steroid bindendes Globulin
SI	Système international d' unités
Sig.	Signifikanz
SOST	Sclerostin
T	Testosteron
TFR	testikular feminisierte Ratte
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TPP	Thiaminpyrophosphat
TRAF6	TNF-Receptor-associated Faktor 6
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Umdrehungen
U/l	Units/liter
UV	Ultraviolett
v.	von
WGL	Wheat-germ-lectin: Weizenkeim-Lektin
WIF-1	Wnt-inhibitory-Faktor-1
Wnt	Ligand der sich aus Wg für Wingless und Int-1 zusammensetzt
α ERKO	ER- α knockout mouse
β ERKO	ER- β knockout mouse
γ -GT	gamma-Glutamyltransferase

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wnt- und β -Catenin-Signale regulieren die Knochenbildung durch unterschiedliche Mechanismen.....	4
Abbildung 2: Regulation der Osteoklastogenese	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Osteoklasten-Differenzierung und Funktion	7
Abbildung 4: Aufbau und Struktur des Knochengewebes	9
Abbildung 5: Kollagenmolekül mit Angriffsstellen der Propeptidasen.....	21
Abbildung 6: Schematische Darstellung der derzeit verwendeten Knochenmarker aus der Kollagen-Degradation	21
Abbildung 7: Überblick Stoffwechsel und Wirkung der Sexualsteroiden beim Mann.....	23
Abbildung 8: Darstellung des universellen Modells für Knochenschwund beim Mann	27
Abbildung 9: Modell für die Vermittlung der Effekte der Östrogene und Testosteron	33
Abbildung 10: Liniendiagramm der Bone Alkaline Phosphatase-Aktivität zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probandengruppen (Feld A bis D).....	43
Abbildung 11: Boxplot zur Bone Alkaline Phosphatase-Aktivität der Felder A und C im Vergleich	48
Abbildung 12: Liniendiagramm der Osteokalzin-Konzentration zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probandengruppen (Feld A bis D)	50
Abbildung 13: Vergleichende Boxplotdarstellung zur Osteokalzin-Konzentrationen der Felder A und C (links) sowie der Felder B und D (rechts) zu den jeweiligen Zeitpunkten.....	53
Abbildung 14: Liniendiagramm der Konzentration des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I Kollagens zu den Zeitpunkten der Probandengruppen (Feld A bis D)....	56
Abbildung 15: Vergleichende Boxplotdarstellung zur Konzentration des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I Kollagens der Felder A und C (links) sowie der Felder B und D (rechts) zu den jeweiligen Zeitpunkten	60
Abbildung 16: Liniendiagramm zur Darstellung der Testosteron-Konzentrationen zu den jeweiligen Zeitpunkten für Feld A bis C	62
Abbildung 17: Liniendiagramm zur Darstellung der Östradiol-Konzentrationen zu den jeweiligen Zeitpunkten für Feld A bis C	64
Abbildung 18: Liniendiagramme für Feld C der Knochenmarker.....	67
Abbildung 19: Liniendiagramme für Feld C der Knochenmarker.....	67
Abbildung 20: Liniendiagramme der Quotienten aus Verhältnis Knochenaufbau zu Knochenabbau mit zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probandengruppen (Feld A bis D).....	71
Abbildung 21: Boxplot-Darstellung des Verhältnisses Knochenaufbau zu Knochenabbau der Felder A und C im Vergleich	74

Abbildung 22: Boxplot-Darstellung des Verhältnisses Knochenaufbau zu Knochenabbau der
Felder B und D im Vergleich74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht zu Vorkommen, Wirkung und Phänotyp bei Deletion der Rezeptortypen	31
Tabelle 2: Nummer und Geburtsmonat der Probanden aus Feld A.....	34
Tabelle 3: Nummer und Geburtsmonat der Probanden aus Feld B.....	35
Tabelle 4: Nummer und Geburtsmonat der Probanden aus Feld C.....	35
Tabelle 5: Nummer und Geburtsmonat der Probanden aus Feld D.....	36
Tabelle 6: Übersicht der Mittelwerte und Standardabweichung der Bone Alkaline Phosphatase-Aktivität in den Feldern A bis D.....	47
Tabelle 7: Darstellung Bone Alkaline Phosphatase-Einzelaktivitäten der nachträglich Kastrierten aus Feld C zu den Mittelwerten	48
Tabelle 8: Übersicht der Mittelwerte und Standardabweichung der Osteokalzin-Konzentration in den Feldern A bis D	52
Tabelle 9: Darstellung Osteokalzin-Einzelwerte der nachträglich Kastrierten aus Feld C zu den Mittelwerten.....	54
Tabelle 10: Übersicht der Mittelwerte und Standardabweichung der Konzentration des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I Kollagens in den Feldern A bis D.....	59
Tabelle 11: Darstellung der Konzentration des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I Kollagens der nachträglich Kastrierten aus Feld C zu den Mittelwerten	60
Tabelle 12: Übersicht der Mittelwerte und Standardabweichung der Testosteron-Konzentrationen in den Feldern A bis C	63
Tabelle 13: Übersicht der Mittelwerte und Standardabweichung der Östradiol-Konzentrationen in den Feldern A bis C.....	65
Tabelle 14: Darstellung der Korrelationen nach Pearson für die untersuchten Parameter	68
Tabelle 15: Darstellung der Korrelationen nach Pearson für die Parameter Osteokalzin und das Geburtsdatum.....	69
Tabelle 16: Darstellung der Korrelationen nach Spearman-Rho für die untersuchten Parameter	69
Tabelle 17: Darstellung der Korrelationen nach Spearman-Rho für die Parameter OC und das Geburtsdatum.....	70
Tabelle 18: Mittelwerte und Standardabweichungen des Verhältnisses Knochenaufbau zu Knochenabbau für die Felder A bis D.....	73
Tabelle 19: Darstellung der Einzelwerte des Verhältnisses Knochenaufbau zu Knochenabbau der nachträglich Kastrierten aus Feld C zu den Mittelwerten	75
Tabelle 20: Referenzwerte für Pferde (Kraft und Dürr 2005)	117
Tabelle 21: Laborwerte der Probanden aus Feld A zum Zeitpunkt T _{4D}	117
Tabelle 22: Laborwerte der Probanden aus Feld B zum Zeitpunkt T _{4D}	117
Tabelle 23: Laborwerte der Probanden aus Feld C zum Zeitpunkt T _{4D}	117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 24: Laborwerte der Probanden aus Feld D zum Zeitpunkt T_{4D}	118
Tabelle 25: Werte aller untersuchten und errechneten Parameter aller Probanden zu den jeweiligen Zeitpunkten.....	118

1 Einleitung

Seit geraumer Zeit stellen Erkrankungen des Bewegungsapparates und insbesondere der Knochen bei Freizeit- und Sportpferden ein erhebliches sozio-ökonomisches Problem dar (Estberg, Stover et al. 1996; Cogger, Evans et al. 2008). Diese Tatsache macht den enormen Stellenwert der Forschung deutlich, welche sich mit den Ursachen und Prädispositionen dieser Erkrankungen befasst.

In jährlich veröffentlichten Statistiken werden die Zahlen fataler Knochenbrüche bei Rennpferden und die Risikofaktoren für deren Ätiologie identifiziert. Dabei wurden einerseits Studien publiziert, in denen das Geschlecht keinen Einfluss auf eine generelle Frakturinzidenz auszuüben scheint (Cohen, Dresser et al. 1999). Andererseits konnten Studien bei Pferden unterschiedlicher Nutzungsrichtungen belegen, dass Wallache häufiger von Frakturen der distalen Gliedmaßen betroffen sind als gleichaltrige Hengste oder Stuten (Hernandez, Hawkins et al. 2001; Wilsher, Allen et al. 2006).

Frakturen der proximalen Gliedmaßeile und der spongiosareichen Knochen sind in letzter Zeit vermehrt in den Fokus der Betrachtung gerückt. Insbesondere bei älteren Wallachen tritt eine gehäufte Anzahl von Stressfrakturen des Beckens auf (Hausler und Stover 1998). Auch bei renn-assoziierten Frakturen der Scapula sind Wallache ebenfalls häufiger betroffen als gleichaltrige Stuten oder Hengste (Vallance, Case et al. 2012). Auch bei einer Studie zum szintigraphischen Nachweis der „Endostitis-like-lesions“ diverser Nutzungsrichtungen waren Wallache mit 48,1% im Verhältnis zu Stuten mit 29,1% und Hengsten mit 22,8% überrepräsentiert (Ahern, Boston et al. 2014).

Als Stressfrakturen werden Knochenbrüche bezeichnet, die bei einem gesunden Patienten mit normalen Knochentexturen auftreten, verursacht durch repetitiven Stress mit einem resultierenden Fehler in der Integrität des kortikalen Knochens (Apley, Solomon et al. 2010). Auch beim Rennpferd gilt der Konsens, dass Knochengewebsverletzungen Folge von wiederholten Extrembelastungen des Skeletts sind, die zu einer strukturellen Schwäche des Knochengewebes geführt haben (Pinchbeck, Clegg et al. 2013).

Eine bislang nicht identifizierte Prädisposition dieser Stressfrakturen beim Wallach könnte eine Osteopenie sein, wie sie unter anderem bei Immobilisationen auftritt (Buckingham und Jeffcott 1991) und bereits aus der Humanmedizin bekannt ist. Osteopenie stellt sich mit einer reduzierten Knochendichte zwischen der 1 bis 2,5fachen Standardabweichung zum Altersdurchschnitt dar. Bei einer Osteoporose kommt es zusätzlich zu einer mikroarchitektonischen Verminderung des Knochengewebes mit konsequentem Zuwachs an Knochenbrüchigkeit. Der Grad des Knochenschwundes definiert dabei den Begriff (Kanis 1994).

Beim alternden Mann stellen der schleichende Hypogonadismus und die Kastration die Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung des Osteopenie- und Osteoporose-Syndroms mit einem Verlust von bis zu 15% der Knochenmasse dar (Stepan, Lachman et al. 1989; Anderson, Francis et al. 1998). Ab einem gewissen Grad des Knochenschwundes treten vermehrt Frakturen der Hüfte, des Oberschenkelhalses, der Wirbel sowie der Unterarme auf.

Weltweit wird in jedem Jahr der größte Anteil nicht zur Körung zugelassener Hengste im Alter von ein bis drei Jahren kastriert. Denn bei einer frühzeitigen Kastration der jungen Hengste entfällt das ausgeprägte Sexualverhalten fast vollständig, so dass auch eine komplikationslose Haltung zusammen mit Stuten und anderen Wallachen möglich wird. Allerdings haben die hormonellen Konsequenzen der Kastration auch einen entscheidenden Einfluss auf den Habitus und letztlich auch auf den Hormon- und Knochenstoffwechsel des Kastraten. Grundsätzlich verzögert die Kastration den Schluss der noch offenen Epiphysenfugen, woraus ein größeres Längenwachstum resultiert (Green 2001).

Mit der Kastration der Hengste werden hormonelle Voraussetzungen geschaffen, die mit den Ursachen für das Osteopenie- und Osteoporose-Syndrom beim Mann vergleichbar sind.

Da bislang nicht alle Pathomechanismen für die Entstehung der Osteopenie und Osteoporose aufgeklärt sind, ist eine Innovation in der Wahl der Modelle für das Aufdecken der Pathophysiologie erforderlich.

Ziel dieser Arbeit soll es somit sein, mit Hilfe der Messung biochemischer Knochenmarker den Einfluss der Kastration auf den Knochenstoffwechsel beim männlichen Pferd zu untersuchen, wobei die biochemischen Marker gezielt die Raten des Knochenaufbaus und des Knochenabbaus anzeigen sollten. Die Altersabhängigkeit der verwendeten Untersuchungsparameter wurde dabei berücksichtigt.

Die Arbeit zeigt den Versuch ein neues Modell für die Osteopenie- und Osteoporoseforschung zu schaffen, ähnlich bereits bestehender Modelle bei Mensch und Tier: Denn die derzeit für die Forschung verwendeten Nicht-Primaten-Modelle (Ratte, Maus, Hund, Schaf und Minipig) zeigen verschiedene Probleme: Beispielsweise sind die untersuchten Tiere nicht durchweg Monogastrier, zeigen unterschiedliche Vitamin-D-Stoffwechsel (zwei Paare von Nebenschilddrüsen beim Schaf und beim Hund), ein unterschiedliches Ca : Phosphat Verhältnis bei der täglichen Aufnahme und eine unterschiedliche Fortpflanzungsperiodik. Das Knochenremodelling ist beispielsweise bei der Ratte anders als bei größeren Tieren, ebenso besitzen Ratten kein Havers'sches System. Vitamin-D-Mangel führt zu hohen Phosphatspiegeln bei der Ratte, beim Hund und Menschen nicht. Schweine haben im Vergleich zum Menschen eine dichtere Knochenmasse und stören dadurch den direkten Vergleich (Malluche und Rodgers 1993).

Die Vorteile der Modelltierart Pferd liegen in der besonderen Anatomie, überaus belastbaren Herz-Kreislaufphysiologie sowie der Länge der Knochen und den dort angreifenden großen Kräften, die zum einen aus der enormen Muskelkraft, zum anderen aus der hohen Gewichtskraft der Tiere resultieren. Das Pferd lässt sich als hochspezialisierter Läufer unter kontrollierten Bedingungen trainieren, was bei anderen Tierarten schwer durchzuführen ist.

2 Methodisches Vorgehen

Zur Bearbeitung der vorgestellten Thematik soll zunächst ein Überblick über den aktuellen Forschungsstand im jeweiligen Bereich geschaffen werden. Dabei werden die drei Hauptschwerpunkte auf die Knochenbiologie, die Fortpflanzungsendokrinologie des Hengstes und die Prinzipien der Knochenstoffwechselmarker beim Pferd gelegt.

Auf dieser Grundlage soll anschließend die Durchführung der eigenen Untersuchungen besprochen und diskutiert werden.

Für die Aufarbeitung der Literatur wurde auf Quellen im National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov), auf die Datenbanken des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) (www.dimdi.de) und auf die Datenbanken und Präsenzbestände der Veterinärmedizinischen und Medizinischen Fakultäten weltweit zurückgegriffen.

3 Grundlagen

3.1 Aufbau, Struktur und Funktionen des Knochengewebes

Zunächst sollen der Aufbau und die Zusammensetzung des Knochengewebes besprochen werden. Im Anschluss wird dessen Funktion näher erläutert.

3.1.1 Aufbau des Knochengewebes

Die Knochen eines Wirbeltieres sind nicht nur das Stützgewebe seines Körpers. Als solides Gerüst des Organismus schützt das Knochengewebe die inneren Organe, ermöglicht Fortbewegung und ist damit auch Grundlage für eine höhere Entwicklung. Knochen ist aber auch ein Organ mit weiteren, verschiedenen Funktionen wie der Speicherung von Kalzium und Phosphat.

Wenn man das Knochengewebe aus seinem funktionellen Zusammenhang löst und isoliert betrachtet, so besteht es aus der Knochenmatrix, der unbelebten Textur des Knochens, und den darin enthaltenen, lebenden Zellen. Die Knochenmatrix wird in zwei Substanzklassen eingeteilt: zum einen besteht sie aus organischem, zum anderen aus anorganischem Material.

3.1.1.1 Organische Matrix

Der organische Anteil der Knochenmatrix setzt sich zu 90% aus Kollagen und glykosaminreicher Grundsubstanz zusammen. Diese Proteinverbindung dient den mineralischen Anteilen im Knochen als eine Art Armierung (Kristallisationskern) für eine appositionelle Anlagerung (Liebich 2009). Die Kollagenanteile bestehen zu 95% aus Typ I Kollagen und etwa zu 5% aus Typ V Kollagen, welches die Fasern kopolymerisiert (Niyibizi und Eyre 1994) und die Funktion besitzt, den Durchmesser der Kollagenfasern auf 400 nm zu limitieren (Adachi und Hayashi 1985).

Etwa 1 bis 2% der organischen Gesamtmasse werden von Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen gebildet (Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat). Zusammen mit 5 bis 9% Lipiden ergibt dies etwa ein Drittel der Trockenmasse des Knochengewebes (König und Liebich 2001). Den nicht-mineralisierten Anteil der Knochenmatrix bezeichnet man als Osteoid.

3.1.1.2 Anorganische Matrix

Der anorganische Teil der Knochenmatrix beträgt etwa $\frac{2}{3}$ der Gesamtmasse und wird zu 85 bis 90% aus Kalziumphosphat, zu 8 bis 10% aus Kalziumkarbonat, zu 1,5% aus Magnesiumphosphat und zu 0,3% aus Kalziumfluorid gebildet (König und Liebich 2001).

Diese Elemente liegen in Form von Kristallen in sogenannten Ionengittern vor. Nadelförmige, kristalline Raumgitter des Kalziumhydroxylapatits $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ lagern sich den Kollagenfasern außen an, umgeben von proteoglykanreicher Grundsubstanz (Boskey und Posner 1984; Malluche und Rodgers 1993). Die oberflächlichen Hydroxylapatite haben zusätzlich noch eine Hydrathülle aus Wassermolekülen, welche die Ionen aus der Ionengitterstruktur lösen und für den Stoffwechsel bereitstellen (Junqueira, Carneiro et al. 2002).

3.1.1.3 Zellen des Knochens

Um die Zusammenhänge zum Auf- und Abbau von Knochensubstanz zu verstehen, werden nachfolgend die zellulären Anteile erläutert, die in der Lage sind, die Matrix um sich herum zu verändern. Dabei können zunächst zwei Zelllinien gemäß ihrer Entwicklung identifiziert werden: Zum einen die Knochenmatrix-formenden Zellen (Osteoblasten, Osteozyten, Knochen-Lining-Cells) und zum anderen die Knochenmatrix-resorbierenden Zellen (Osteoklasten). Alle genannten Zellen kommen aber stets zusammen mit ihren Precursor-Zellen und den assoziierten Zellen vor, wie beispielsweise Endothelzellen und Nervenzellen, in speziellen Einheiten, den Bone Multicellular Units (BMU) (Frost 1983).

3.1.1.3.1 Osteoblasten

Die Osteoblasten gehören zu den Knochenmatrix-formenden Zellen. Sie entwickeln sich über Stadien von Vorläuferzellen der Osteoblastenreihe (Osteoprogenitorzellen) aus mesodermalen Stammzellen, dem Stroma, einem nicht-hämatopoetischen Kompartiment des Knochenmarks (Friedenstein, Ivanov-Smolenski et al. 1978).

Die Osteoprogenitorzellen, die den Fibroblasten sehr ähnlich sind, liegen in der Regel in der Kambiumschicht der Knochenhaut und entlang der Gefäße des primären Knochenmarks. Sie charakterisieren sich zum einen durch ihre hohe Teilungsintensität und werden dementsprechend als Präosteoblasten bezeichnet. Zum anderen wird diesen Zellen der Knochenoberflächen neben einem osteogenen Potential auch die Fähigkeit der Barrierebildung als „Lining-Cells“ zugesprochen. Ihnen obliegt die Regulation des Mineralisationsprozesses und des Knochenstoffwechsels (Krstic´ 1988; Junqueira, Carneiro et al. 2002).

Durch Einwirkung von Lipoproteinen (LRP5) und Glykoproteinen (Wnt, β -Catenin) sowie deren Antagonisten (Dkk, WIF-I) entwickeln sich die Präosteoblasten weiter zu Osteoblasten (Krishnan, Bryant et al. 2006). In Abbildung 1 werden diese Faktoren mit den Zellstadien für eine bessere Übersicht illustriert (modifizierte Zeichnung nach der Vorlage Krishnan, Bryant et al. (2006), Figur 2, Seite 1204).

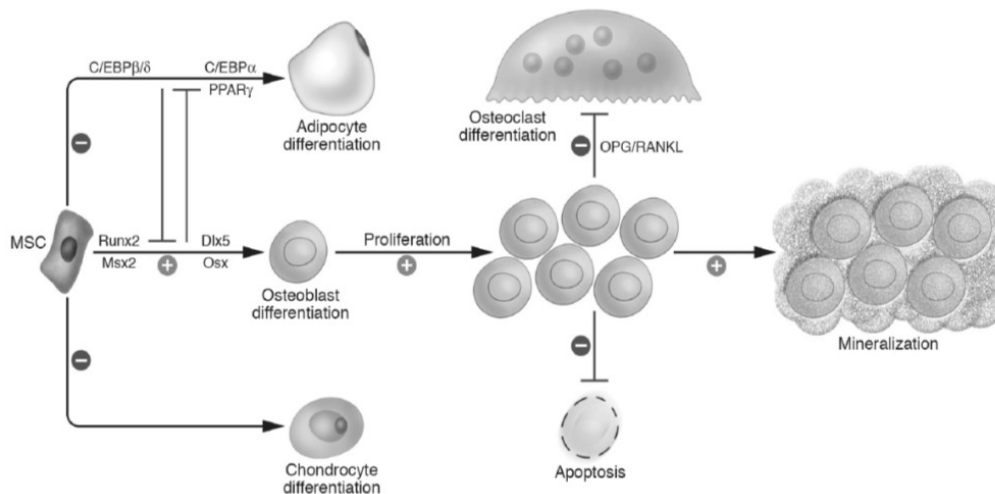


Abbildung 1: Wnt- und β -Catenin-Signale regulieren die Knochenbildung durch unterschiedliche Mechanismen

Die genaue Entwicklung der Osteoblasten folgt einem Kurs der lokalen Proliferation mesenchymaler Stammzellen. Dabei wird die Expression der Transkriptionsfaktoren runt-related Transkriptionsfaktor-2 (RunX), distal-less homeobox-5 (Dlx5) und msh homeobox homologue-2 (MsX) benötigt, um die Entwicklung der Precursorzellen in Richtung Osteoblasten-Zelllinie zu bewegen und nicht in Richtung Adipozyten-, Myozyten- oder Chondrozyten-Zelllinie, welche ebenfalls von den mesenchymalen Stammzellen abstammen (siehe Abbildung 1).

Die weitere Differenzierung des Präosteoblasten in eine reife Osteoblastenzelle benötigt die Expression von RunX (runt-related Transkriptionsfaktor 2), Osx (Osterix) und einigen Faktoren der Wnt-Signalkaskade (Bendall und Abate-Shen 2000; Nakashima, Zhou et al. 2002; Robledo, Rajan et al. 2002; Glass, Bialek et al. 2005).

Der reife Osteoblast exprimiert das Matrixprotein Typ-I-Kollagen, Osteokalzin (OC) und knochenspezifische Alkalische Phosphatase (BALP: ein Schlüsselenzym im Mineralisationsprozess) für die Synthese der Matrix, sobald er in Kontakt mit kollagenhaltiger Umgebung steht (Franceschi, Xiao et al. 2003). Osteoblasten treten oft in größeren Gruppen auf und bilden dabei einen Saum. Der Grad der Matrixbildung ist abhängig von der Anzahl der aktiven Osteoblasten, weniger von der Leistungsfähigkeit der Einzelzelle.

Osteoblasten sind nicht mehr teilbar und übernehmen die Hauptaufgabe der Knochenbildung. Sie weisen an ihrer Oberfläche zahlreiche Fortsätze auf und stehen über Nexus und Gap junctions miteinander in Verbindung. Zusätzlich stehen Osteoblasten mit entfernten Osteozyten, den eingemauerten Zellen im Knochen, über Knochenkanälchen und den darin enthaltenen Zellausläufern über Gap junctions in direktem Kontakt.

Es lassen sich aktive und ruhende Osteoblasten differenzieren, wobei die aktiven Osteoblasten auf der Oberfläche von Knochenstangen einen epithelartigen Saum bilden. Ruhende Osteoblasten hingegen erscheinen spindelartig abgeflacht.

Als Beweis einer vermehrten Knochenbildung gilt die gestiegene Anzahl der Präosteoblasten im Pool der Vorläuferzellen.

Der unmineralisierte Anteil der Knochenmatrix, das Osteoid, entsteht aus ungeordneten Kollagenfibrillen und der Knochengrundsubstanz. Der Prozess der Fibrillenbildung des Kollagens beginnt bereits in den Matrixvesikeln der Osteoblasten. Er wird außerhalb der Zelle vollendet und die Fibrillen werden an die unverkalkte Matrix angeknüpft. Die Faserbündel des Kollagens, die aus vielen Einheiten zusammengesetzt werden, sind durch andere Proteine, Lipide, Glykosaminoglykane und Proteoglykane maskiert, das heißt zu einem optisch nicht zu differenzierenden Material verknüpft. Nicht kollagene Proteine wie OC, Osteonektin, Osteopontin und Bone-Sialoprotein (BSP) regulieren dabei die Mineralisation, und gleichzeitig binden diese Substanzen mit hoher Affinität Kalziumionen

und Hydroxylapatit aus dem Blut. Das unverkalkte Osteoid wird innerhalb von acht bis zehn Tagen nach der Mineralisation zum Ossein, der verkalkten Matrix (Liebich 2009).

Ein von den Osteoblasten aktiv gebildeter Osteoidsaum entfernt sich von einzelnen Osteoblasten, die in der Matrix zurückbleiben und als Osteozyten in die Matrix eingemauert werden. Diese frühen Osteozyten beginnen zu reifen und aktivieren weitere Genpakete, die folgende Proteine codieren: Dentin Matrix Protein-1 (DMP-1), Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE) und Sclerostin (SOST) zum Erhalt der Osseinsubstanz (Toyosawa, Shintani et al. 2001; Nampei, Hashimoto et al. 2004).

Etwa 10 bis 20% der Osteoblasten differenzieren sich zu Osteozyten (Aubin und Turksen 1996; Marotti 1996).

Osteoblasten beeinflussen schließlich auch die Osteoklastenfunktion. Durch Abgabe neutraler Proteine und Kollagenasen wird nicht-mineralisierte Matrix für eine nachfolgende Resorption freigelegt. Zudem kommt ihnen auch eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle zwischen Formation und Resorption zu, deren Regulation durch kalziotrope Hormone, wie PTH (Parathormon), Kalzitinin, Steroidhormone und eine Vielzahl von Zytokinen gesteuert wird. Beim Pferd konnte dies für PTH, Calcitonin und E_2 (Östradiol) gezeigt werden (Chiba, Kanematsu et al. 2000; Lemazurier, Toquet et al. 2002; Weisrock, Winkelsett et al. 2011).

3.1.1.3.2 Osteozyten

Aus den Osteoblasten gehen die Osteozyten hervor und formieren sich innerhalb von drei Tagen zu einer dendritischen Zelle mit fingerförmigen Zytoplasmfortsätzen, die von mineralisierter Matrix umgeben sind und in schmalen Lakunen liegen (Bonewald 2007).

Durch den Einmauerungsprozess der Osteoblasten als Osteozyten in die Matrix werden weitere Gene aktiviert und folgende Proteine exprimiert: Dentin Matrix Protein I (DMP1), Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE) und Sclerostin (SOSTs). Sobald Faktor E11, ein früher Osteozytenmarker, hochreguliert worden ist, werden sie als reife Osteozyten bezeichnet (Wetterwald, Hoffstetter et al. 1996). Der Osteozyt erhält dabei den Kontakt mit den umgebenden Osteoblasten. Das umgebende Osteoid wird unter Kontrolle des Enzyms Osteocyte-derived-Casein-Kinase II (CKII) mineralisiert (Suzuki, Kubota et al. 1996).

Es wird vermutet, dass Osteozyten die Knochenzubildungsrate durch eine Signalproduktion herabsetzen und eine Differenzierung der Osteoblasten einleiten, während die Osteoblasten das Basic Multicellular Unit (BMU) mit Osteoid füllen (Marotti 1996).

Die Hauptrezeptoren auf den reifen Osteozyten sind: Östrogenrezeptor α (ER α) und Östrogenrezeptor β (ER β), PTH-Rezeptor, Vitamin D_3 -Rezeptor, Kortikosteroid-Rezeptor und der Transforming Growth Faktor- β -Rezeptor (TGF- β -Rezeptor).

Osteozyten haben mit dem Nervensystem vergleichbare Rezeptoren und auch molekulare Mechanismen, weshalb man annimmt, dass sie eine Rolle bei der Innervierung des Knochengewebes spielen. Sie exprimieren Glutamatrezeptoren (Mason, Suva et al. 1997) und produzieren beispielsweise nach einer Fraktur Nerve Growth Factor (NGF).

Die metabolische Aktivität der Osteozyten nimmt durch die Einmauerung erheblich ab. Sie erhalten jedoch weiterhin die umgebende Matrix und nehmen an der Feinregulation der Blut-Kalzium-Homöostase teil. Osteozyten vermögen aber auch Matrix zu synthetisieren.

Durch die dendritischen Zytoplasmaausläufer zueinander entwickeln die Osteozyten eine größtmögliche Oberfläche zur Knochenmatrix. Dieses kanalikuläre System enthält zwar nur etwa 1% der Flüssigkeit des Knochens; aber durch seine enorme Oberfläche sorgt es für einen umfangreichen Ionen- und Stoffaustausch. Errechnet bedeutet dies etwa die 400fache Oberfläche des Blutgefäßsystems (Bonewald 2007).

Ein Netz extrazellulärer Substanz, hauptsächlich Proteoglykane, ist in den Canaliculi vorhanden, unterstützt und verstärkt den Flüssigkeitsfluss, der aus der mechanischen Belastung des Knochens resultiert (Han, Cowin et al. 2004). Änderungen der mechanischen Kräfteinwirkungen auf das Knochengewebe führen zu strukturellen Anpassungen des kommunizierenden Netzes aus Osteoblasten und Osteozyten und ziehen unverzüglich Veränderungen der metabolischen Aktivität der reifen Knochenzellen (mechanosensitive Zellen), sowie der Revitalisierung toten Gewebes und Reparatur von Mikrofrakturen nach

sich. Die Umsetzung der Schwingungen in intrazelluläre Impulse soll durch verschiedene extrazelluläre Proteine geschehen (Knothe Tate 2003).

Durch die extrazellulären Flüssigkeitsbewegungen werden die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Osteozyten massiv gefördert (Knothe Tate 2003). Untersuchungen konnten zeigen, dass bei unbelasteten Knochen vermehrt hypoxie-bedingte Proteine exprimiert werden. Bei Knochenbioplaten, die physischen Belastungen ausgesetzt wurden, zeigte sich eine geringere Apoptoserate bei den Osteozyten als bei unbelasteten Gewebe (Gross, Akeno et al. 2001).

Osteozyten haben zusätzlich die Funktion, eine weitere Mineralisation auf dieser Oberfläche der Canaliculi zu minimieren. Denn in Abwesenheit von Osteozyten füllen sich die Kanalsysteme mit mineralisierter Matrix: ein Phänomen, welches Mikropetrose genannt wird (Frost 1960). Diese mit „Kalk“ durchbauten Areale führen bei mechanischer Belastung zu Mikrofrakturen. Die Matrix-Metallo-Proteinase II (MMP II) hat entscheidenden Einfluss zur Minimierung von Mikropetrose, Arthropathie und Osteolyse. Ihre Abwesenheit, beispielsweise bei Knockout-Mäusen, geht mit einer reduzierten Anzahl der Osteozyten einher (Inoue, Mikuni-Takagaki et al. 2006).

3.1.1.3.3 Osteoklasten

Der Osteoklast stellt sich als eine, nach amitotischer Teilung entstandene, vielkernige Riesenzelle dar, die das Ossein abbaut. Osteoklasten sind reich an Mitochondrien und betreiben aeroben Stoffwechsel. Es handelt sich um sehr motile Zellen mit ausgeprägter pinocytotischer Aktivität. Osteoklasten leben etwa sechs Wochen, bevor sie apoptotisch werden. Durch Fusion mit mononukleären Vorläuferzellen kann diese Zeitspanne verlängert sein.

Wenn hämatopoetische Stammzellen stimuliert werden, mononukleäre Zellen zu generieren, beginnt die Osteoklastogenese, hier in Abbildung 2 schematisch dargestellt, modifiziert nach Lian und Stein, Kapitel 14, S. 239, Seibel (2006). Die Stammzellen entwickeln sich dann zu Präosteoklasten, werden in den Blutstrom integriert und schließlich zu ihrem Wirkort transportiert.

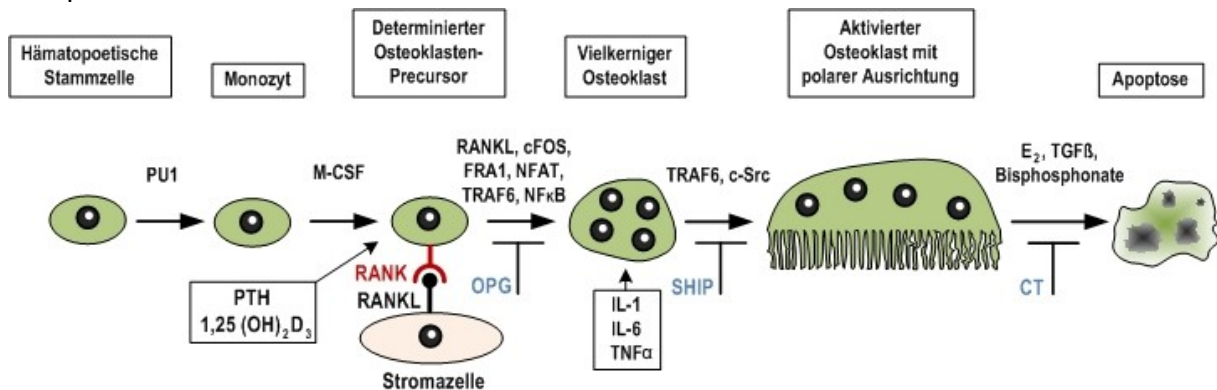


Abbildung 2: Regulation der Osteoklastogenese

Die Stufen der Osteoklastendifferenzierung werden durch die Transkriptionsfaktoren (PU1, cFos, NFAT, NF-κB, FRA1), Zytokine (Interleukine, TGF-β, RANKL, M-CSF), Hormone (PTH, 1,25(OH)₂D₃, E₂) sowie extra- und intrazelluläre Signalfaktoren (Integrine, c-Src, Traf6) kontrolliert.

Zur Bildung eines Polykaryons sind die Faktoren Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) und Receptor activator of NF-κB-Ligand (RANK-L) notwendig, wobei mit einer erfolgreichen Bildung des Polykaryons auch die Expression von Tartrate resistente alkaline Phosphatase (TRAP) verbunden ist (Blair, Robinson et al. 2005). Die weitere Differenzierung der Riesenzelle geschieht unter dem Einfluss des Faktors RANK-L, dessen zugehöriger Rezeptor (RANK) sich sowohl auf dem Osteoklasten als auch auf den Vorläufern befindet (Anderson, Maraskovsky et al. 1997).

Receptor activator of NF- κ B Ligand wird über einen löslichen Köderrezeptor, Osteoprotegerin (OPG), reguliert (Yasuda, Shima et al. 1998). Die Funktion von OPG besteht darin, durch kompetitive Bindung der RANK-L-Stroma-Bindungsseite des RANK-Rezeptors auf den Präosteoklasten und seinen späteren Stadien die Osteoklastogenese zu reduzieren (Simonet, Lacey et al. 1997; Yasuda, Shima et al. 1998).

Stromazellen können die Osteoklastogenese in positiver Weise kontrollieren. Durch vermehrte Expression von RANK-L und reduzierter Expression von OPG kommt es zu einer Steigerung der Osteoklastogenese. Bei einer Verschiebung der Verhältnisse in die andere Richtung wird das resorptive Potential vermindert. Andere Faktoren (wie PTH, PG, IL, Vitamin D₃ und Kortikosteroide), die einen starken Effekt auf die Resorption ausüben, vermitteln dies über Osteoblasten und Stromazellen, die diese Faktoren in Signale umcodieren und eine adäquate RANK-L und OPG-Antwort modulieren, um die Osteoklastenentwicklung zu kontrollieren und damit auch die Resorption verzögern zu können (Martin 2004).

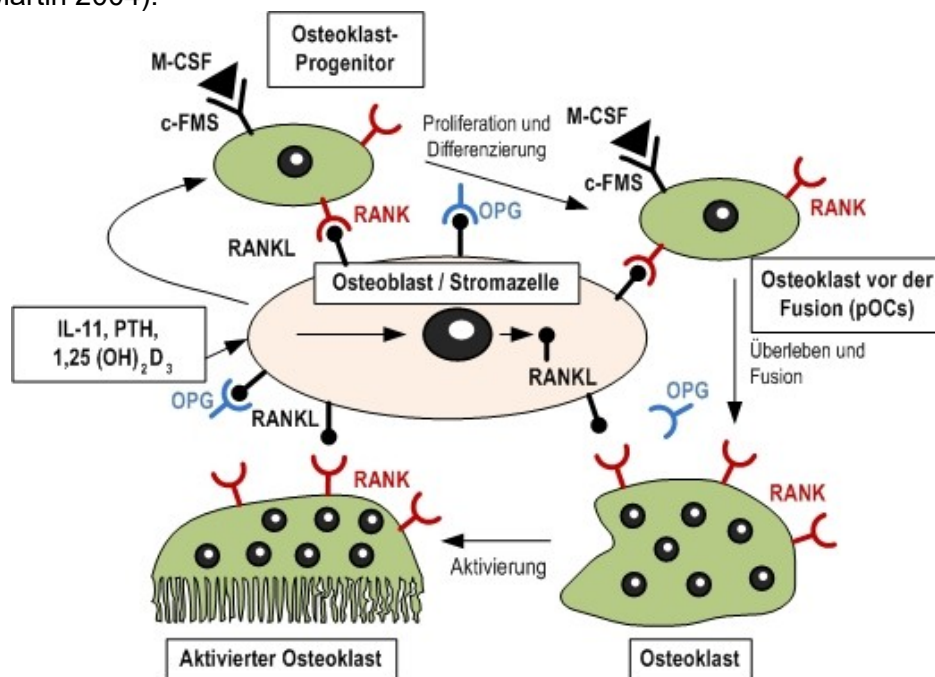


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Osteoklasten-Differenzierung und Funktion. Unter Einfluss der Osteoblasten und Stromazellen werden die Osteoklastenprecursor durch RANKL und OPG zur Differenzierung und Aktivierung angeregt, modifiziert nach Suda, Takahashi et al. (1999), Figur 8, Seite 355.

Die Knochenresorption erfolgt zum einen in den Howship-Lakunen, in dem sich der Osteoklast dem verkalkten Knochen anlegt und beginnt, ihn enzymatisch zu resorbieren (lakunäre Resorption). Zum anderen wird verkalktes Gewebe entlang der versorgenden Gefäße (perforierende Resorption) abgebaut. Dabei wird die Knochenresorption von zwei verschiedenen Zelltypen bewerkstelligt. Die Osteoklasten demineralisieren den Knochen und die nicht-kollagene Matrix. Die somit freigelegten Kollagenfibrillen werden nachfolgend von mononukleären, Fibroblasten-ähnlichen Zellen aus der monozytären Entwicklungsreihe phagozytiert (Krstic´ 1988; Junqueira, Carneiro et al. 2002).

In den Lakunen wird die polare Orientierung der Osteoklasten deutlich. Die basolaterale Zelloberfläche liegt der vaskulären Seite an. Die apikale Plasmamembran bildet zur Oberflächenvergrößerung zahlreiche Villi (ruffled border) mit verzweigten Resorptionsstrukturen in Richtung der Knochenoberfläche aus. Diese Feinstrukturen weisen Mikrovilli auf, deren anliegende Vesikel die Hydroxylapatit-Kristalle angreifen. Dies geschieht durch rezeptorvermittelte Sekretion und Wiederaufnahme lysosomaler Enzyme [Carboanhydrase, Adenosintriphosphatase (ATPase), Thiaminpyrophosphatase (TPPase), alkalische p-Nitrophenylphosphatase (p-NPPase), saure und neutrale Phosphatasen und

Zytochromoxidase] in das Mikrokompartiment (Liebich 2009). Die Kompartimentbildung für die Sekretion und Wiederaufnahme wird über β -Integrine (Transmembranproteine) vermittelt (McHugh, Hodivala-Dilke et al. 2000). Durch die Wirkung von Protonen-Pumpen wird die mineralische Komponente der Matrix aufgelöst, gefolgt von der Sekretion der Proteasen, die die organische Phase degradieren.

Der Knochenoberfläche abgewandt, erscheint im Osteoklasten die Clear-Zone, die der Adhäsion des Osteoklasts an die extrazelluläre Matrix dient. Hierfür werden Podosomen verantwortlich gemacht.

Osteoklasten enthalten komplexe Netze aus Proteinfilamenten (F-Aktin), Mikrotubuli und Intermediärfilamenten (Vimentin). Die ringförmige Anordnung der F-Aktin-Fasern ist dabei ein morphologischer Ausdruck erhöhter Zellaktivität, hormonell durch Kalzitinin und PTH reguliert. Durch Kalzitinin kann die Aktivität der Osteoklasten gehemmt und durch Vitamin D₃ und PTH gefördert werden. Ein Mangel an Vitamin D₃ führt zu einer Zunahme unmineralisierter Knochensubstanz und fördert das bekannte Krankheitsbild der Rachitis.

Ein Osteoklast baut pro Zeiteinheit dreifach mehr Matrix ab, als ein Osteoblast aufbaut. In ihrer Struktur sind die Osteoklasten den Chondroklasten gleich (Noble 2008).

3.1.2 Struktur des Knochengewebes

Nach der Erläuterung der einzelnen Komponenten des Knochengewebes und ihrer Bedeutung werden nachfolgend der Aufbau der Primär- und der Sekundärstruktur dargestellt.

3.1.2.1 Aufbau Primärstruktur

Der Aufbau des Knochengewebes folgt einer einfachen Struktur: Jeder Knochen charakterisiert sich durch seine lamellar geschichteten, kleinen Knochensäulen, auch Osteone genannt, die im Innern axial je ein Havers'sches Gefäß für die Blutversorgung enthalten. In der verkalkten Matrix dieser Osteone lassen sich polarisationsmikroskopisch Kollagenfasern nachweisen, die rechts- und linksgewunden sowie flach und steil geschraubt angeordnet sind und damit fast einen rechten Winkel zueinander bilden. Dieser Aufbau verleiht dem Knochen einerseits eine enorme Zug- und Druckfestigkeit, andererseits aber auch ein hohes Maß an Elastizität.

In den Osteonen lagern sich in den konzentrisch geschichteten Lamellen jeweils Osteozyten ein, die miteinander durch Gap junctions in Verbindung stehen und somit Kommunikation und Stoffaustausch ermöglichen (Budras, Fricke et al. 2000; König und Liebich 2001; Junqueira, Carneiro et al. 2002; Liebich 2009).

Primärosteone können im Laufe der Entwicklung des Lebewesens und der Anpassung des Knochens an seine Umwelt teilweise wieder entfernt werden. Einzelne Fragmente bleiben als sogenannte Schaltlamellen zurück (Budras, Fricke et al. 2000).

Auch der embryonal entstandene Geflechtknochen wird durch Osteoklasten abgebaut und von Osteoblasten durch Lamellenknochen ersetzt (Liebich 2009).

3.1.2.2 Aufbau Sekundärstruktur

Der Aufbau der Sekundärstruktur verschiedener Knochen wird in Abhängigkeit von Lokalisation und Funktion des Knochens teilweise erheblich differenziert. Immer gleichbleibend zeigen sich konzentrisch geschichtete Knochenblättchen als sogenannte äußere Generallamelle, die den Umfang des Knochens abgrenzen und eine feste Oberfläche schaffen. Eine innere Generallamelle kleidet die Markhöhle aus.

Die stabile Substantia compacta ist in ihrem Aufbau deutlich von der Substantia spongiosa zu differenzieren und wird im Knochen je nach Bedarf für eine optimale Zug- und Druckanpassung bei maximaler Materialersparnis verwendet (Budras, Fricke et al. 2000).

3.1.2.2.1 Substantia compacta

Die Substantia compacta des Knochens besteht aus dichten Bündeln von Osteonen zwischen der äußeren Generallamelle und der inneren Generallamelle. Innen angrenzend liegt die Markhöhle, die den Speicher für Stammzellen, hämatopoetische Zellen und

Fettzellen darstellt. Vorherrschend sind hier die parallele Ausrichtung der Osteone und die solide Ausbildung von Oberflächen, die für eine optimale Ableitung der Druckkräfte konstruiert sind. So besteht das Mittelstück oder die Diaphyse der langen Röhrenknochen beispielsweise nur aus der Markhöhle und der umgebenden Substantia compacta, dem Knochenmantel. Hier spricht man äquivalent auch von der Substantia corticalis (Budras, Fricke et al. 2000).

3.1.2.2.2 Substantia spongiosa

Im Inneren der Substantia corticalis befindet sich grundsätzlich die Substantia spongiosa, die fast ausschließlich aus typischem Lamellenknochengewebe besteht. Sie lässt einen trajektorialen Aufbau erkennen, da sowohl Tubuli, Lamellen als auch Bälkchen entlang den Zug- und Drucklinien der auf den Knochen einwirkenden physikalischen Kräfte angeordnet sind. Beispielsweise die Knochenenden werden von einer dünnen Substantia corticalis überzogen. Darunter sitzt die feinporige, schwammartig aufgebaute Substantia spongiosa, die sich je nach Aufbau (Röhrchen-, Blättchen- oder Bälkchenstruktur) nochmals in eine Tertiärstruktur aufteilen lässt (Budras, Fricke et al. 2000).

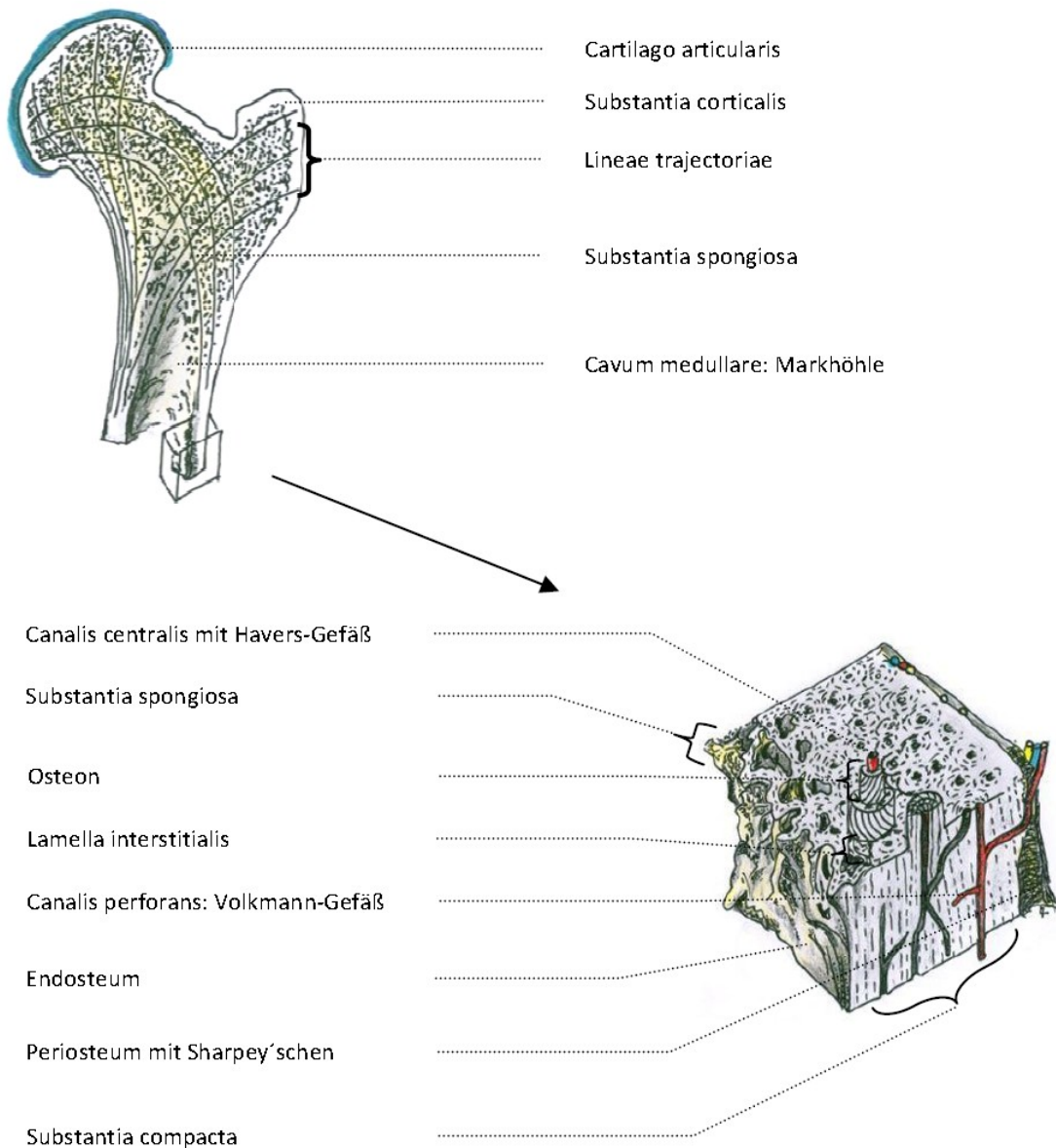


Abbildung 4: Aufbau und Struktur des Knochengewebes

3.1.2.2.3 Weitere Strukturen

Ein weiterer zentraler Bestandteil für vitales Knochengewebe ist die intakte Blutversorgung. Die Blutversorgung des Knochengewebes mit circa 5 bis 10% des Herzauswurfvolumens erfolgt periostal und zunächst medullär in die Diaphyse (Liebich 2009). Mit der Entstehung von Epiphyse und Apophyse sowie deren eigenständiger Blutversorgung werden auch die Wachstumszonen beim juvenilen Organismus durchblutet, so dass auch hier die Versorgung eines intensiv expandierenden Gewebes sichergestellt ist. Eine Verbindung mit den medullären Gefäßen erfolgt erst nach vollständigem Schluss der Epiphysenfugen.

Die Versorgung der Substantia compacta wird nur bis zu einem Drittel über das Kambium gedeckt. Der Rest wird durch die Blutgefäße im Knochen gesichert, die durch Versorgungslöcher in den Knochen eintreten und sich hier aufspalten. Abbildung 4 (modifiziert, nach Budras und Fricke, 2000, Abbildung Seite 141) zeigt den Aufbau und die Struktur des Knochens und illustriert den differenzierten Aufbau.

Die Knochenoberfläche wird durch eine Hülle, das Periost, überzogen. Außen ist das Periost mit dem Stratum fibrosum, einer bindegewebigen, derben Hülle versehen und etwas tiefer mit einer zellreichen, lockeren Schicht, dem Kambium. Die sogenannte „Fibrosa“ sendet bindegewebige (Sharpey'sche) Fasern in den Knochenmantel, so dass eine Verankerung stattfindet. Aus dem Kambium entspringen zahlreiche, feine Gefäße, die quer zur Längsachse des Knochens verlaufen (Volkmann-Gefäße) und das Gefäßbett der Havers'schen Gefäße speisen. Sehr große Gefäße dringen via Foramina nutricia in die Markhöhle ein und sichern hier die Blutversorgung (Budras, Fricke et al. 2000; Locke 2004).

3.1.3 Funktionen des Knochengewebes

Neben der passiven Kräfteableitung ist das Knochengewebe in der Lage, sich aktiv den einwirkenden Kräften anzupassen. Für eine Gewichtsreduktion wird auch Knochengewebe abgebaut, sobald es funktionslos geworden ist (Frost 1990a; Frost 1990b; Frost 1990c; Frost 1990d).

Knochengewebe verfügt dabei über einen Mechanismus, Spannungen und Kräfte zu messen und in Signale umzusetzen, so dass bestimmte Bereiche gezielt in ihrer Struktur optimiert und damit verdickt oder ausgedünnt werden können.

3.1.3.1 Biomechanische Aspekte

Knochengewebe zeigt makroskopisch und mikroskopisch deutliche Anpassungen an die vielseitige, mechanische Beanspruchung des Einzelknochens und des gesamten Skeletts sowohl bei Menschen (Frost 1990a; Frost 1990b) als auch bei Pferden (Van Harveld, Lillich et al. 2002). Im Knochen folgen die Trabekel der Substantia spongiosa den Hauptspannungslinien, den sogenannten Druck- und Zugtrajektoren. Dabei richten sich insbesondere im Bereich der Substantia spongiosa die einzelnen Trabekel so aus, dass eine Gitterkonstruktion, die infolge von Umbauprozessen entsteht, einwirkende Kräfte neutralisiert und nach dem Bogenbauprinzip axial auf die Substantia compacta ableitet. So kann mit einem Minimum an Material ein Maximum an Leistung, Stabilität und gleichzeitig Flexibilität erreicht werden. Je einfacher die auf den Knochen einwirkenden Kräfte sind, desto einfacher ist auch der Aufbau des Knochens gehalten, wie am Beispiel eines platten Wirbelkörpers zu erkennen ist. Entscheidend ist, dass die einzelnen Trabekel der Substantia spongiosa in die Substantia compacta des Knochens einstrahlen und in den Osteonen innerhalb der Substantia compacta ihre Fortsetzung finden. Die hohle Konstruktion der langen Röhrenknochen setzt den einwirkenden Kräften im Verhältnis mehr Widerstand entgegen als ein solider Stab (Seibel 2006; Liebich 2009).

Die Knochenzellen, hauptsächlich jedoch die Osteozyten, sind dehnungsempfindlich und können mechanische Belastungen in Signale transferieren, die einen verminderten Knochenabbau bewirken und zu einer verstärkten Neubildung und höherer Dichte des Knochengewebes beim Pferd führen (Price, Jackson et al. 1995b).

Der Umkehrschluss wird durch die nachfolgende Studie verdeutlicht: Bei einer Untersuchung zum Effekt von Tiludronat-Salzen wurden Wallache für acht Wochen durch einen Cast-Verband immobilisiert und anschließend die Wirkung getestet. Dabei ergab sich eine

Abnahme der Knochenmineraldichte um zehn Prozent nach 140 Tagen Immobilisation im Bereich des Metacarpus, wohingegen der oberflächliche Cortex des Metacarpus nicht betroffen war (Delguste, Amory et al. 2007). Der Cortex war einer fortwährenden Belastung durch die Gewichtskraft ausgesetzt. Durch die gleiche Belastungsart wurde die Substantia spongiosa reduziert. Nach der Gabe der Substanz wurde im Verhältnis zur Kontrollgruppe eine signifikant geringere Konzentration des Kollagenabbaumarkers Carboxy-terminales Telopeptid des Typ I Kollagens (CTX-I, siehe auch Kapitel 3.3.4) gemessen (Delguste, Amory et al. 2008).

3.1.3.2 Mechanotransduktions-Kaskade

Lange Zeit ging man bei Osteozyten und „Lining-Cells“ davon aus, dass sie terminal differenziert und metabolisch inaktiv sind. Aber ihre Vielzahl und ihre Vernetzung untereinander macht sie zu einer „virtuellen Antenne“ für die Messung mechanischer Kräfte. Sie kommunizieren über ihre Zellausläufer durch Gap junctions. „Lining-Cells“ erhalten die Verbindung zu Osteozyten und Osteoblasten ebenfalls via Gap junctions (Junqueira, Carneiro et al. 2002).

Mechanische Spannungen und Kräfte können Reaktionen der Osteozyten in vivo bewirken. Sie reagieren jedoch nicht direkt auf die mechanischen Spannungen oder Verformungen der Matrix, sondern indirekt über den Fluss der Extrazellulärflüssigkeit durch entstehende Potentiale. In vitro entlassen die „gestressten“ Osteozyten Messenger, wie Prostaglandine (PG) (Jee, Mori et al. 1990) und Stickoxid (NO) (Fan, Roy et al. 2004). Osteoblasten entlassen ebenfalls Messenger und exprimieren verschiedene Wachstumsfaktoren (Reich, Gay et al. 1990).

Die bei Belastungen entstehenden Spannungen und Verformungen der Matrix bewirken vergrößerte hydrostatische Drücke im Knochenmark, was wiederum die Stromazellen im Knochenmark aktiviert, eine Osteoklastendifferenzierung zu verringern. Die Expression des Faktors RANK-L wird reduziert (Rubin, Murphy et al. 2000). Schnelle, durch Kräfteeinwirkung auf das Knochengewebe entstehende Spannungsänderungen fördern den extrazellulären Flüssigkeitsfluss und die Interaktion der sich bewegenden Flüssigkeit mit den Knochenzellen: das ist der Schlüssel der Mechanotransduktion (Weinbaum, Cowin et al. 1994).

Wegen der zusammenlaufenden Kräfte rund um den Osteozyten funktionieren die Lakunen wie Gehäuse von Pumpen, welche die Flüssigkeit bei der Belastung des Knochens entlang von Kanälchen drücken. Der Flüssigkeitsfluss entlang der Zellkörper und die Trägheitskräfte der Zelle bewirken eine Schubspannung, wodurch ein elektrisches Potential entsteht (Streaming-Potential oder stress-generiertes Potential). Jedes dieser Potentiale kann Knochenzellen aktivieren, wobei Experimente mit Zellkulturen zeigten, dass die Zellen sensibler auf Flüssigkeitsbewegungen reagierten als direkt auf elektrische Potentiale (Reich, Gay et al. 1990; Hung, Allen et al. 1996).

Belastungen des Knochengewebes stimulieren die Proliferation der Osteoblasten-Precursorzellen, die sich dann zu Osteoblasten weiter differenzieren. Sie reduzieren auch die Rate der Apoptose bei Osteozyten und wahrscheinlich auch bei aktiven Osteoblasten (Noble und Reeve 2000; Pavalko, Gerard et al. 2003). Mechanische Belastung verlängert die Zeitspanne der Matrixsynthese jedes Osteoblasten. Aktuell wurden Faktoren am Osteozyten entdeckt, die als Osteozytenmarker gewertet werden und die Mechanotransduktion vermitteln sollen (de Rooij, van der Velde et al. 2015).

3.1.3.3 Zelluläre Mechanismen

Die mechanische Transduktion im Knochengewebe wird über Ionenkanäle [mechanosensitive Ionenkanäle (Li, Duncan et al. 2003) und L-Typ-Ca-Ionenkanäle], fokale Adhäsionen (Pavalko, Chen et al. 1998) und G-Protein gekoppelte Mechanotransducer der Osteozyten vermittelt (Reich, McAllister et al. 1997; de Rooij, van der Velde et al. 2015).

Bei der Mechanotransduktion spielt die α -1C-Isoform des L-Typ-Kalziumkanals eine Rolle (Miyachi, Notoya et al. 2000). Es ist möglich, dass die Verbindungen der extrazellulären

Matrix mit dem Zytoskelett als Verstärker der mechanischen Signale funktionieren, wie es auch bei anderen Mechanotransducern der Fall ist (Weinbaum, Guo et al. 2001).

Der ATP-Rezeptor P2Y2 scheint ein möglicher Kandidat für den G-Protein-gekoppelten Mechanotransducer zu sein. Dieser Rezeptor bindet ATP, das von den Knochenzellen innerhalb einer Minute nach einem mechanischen Stimulus entlassen wurde (Genetos, Geist et al. 2005), so dass es zu einer Freisetzung eines intrazellulären Kalziumsignals kommt (Jorgensen, Geist et al. 1997).

Der P2X7-Rezeptor ist ein ATP-abhängiger Ionenkanal, der einen zweiten Weg für die Kaskade darstellen könnte. Die Rezeptoraktivität ist direkt mit einer Freisetzung von PG bei den Knochenzellen verbunden (Noble und Reeve 2000).

Prostaglandine und NO sind bedeutende biochemische Mediatoren mechanischer Belastung von Knochengewebe.

Gewisse PG, wie teilweise Prostaglandin E2 (PGE₂), wirken anabolisch mit einer Steigerung der Osteoblastenaktivität und einer Knochengewebsneubildung (Jee, Mori et al. 1990). Dieser anabolische Effekt wird durch den EP4-Prostaglandin-Rezeptor vermittelt, welcher insbesondere für die Matrixsynthese ein wichtiger Rezeptor ist.

Stickstoffmonoxid ist ein potenter Inhibitor der Knochenresorption, der so arbeitet, dass er die Expression von RANK-L unterdrückt und die Expression von OPG steigert, was letztlich zu einer verminderten Rekrutierung der Osteoklasten führt (Fan, Roy et al. 2004).

3.1.3.4 Knochenwachstum und Regeneration (Modeling)

Zwei fundamental unterschiedliche Prozesse werden beim Knochenstoffwechsel differenziert: Modeling und Remodeling (Buckwalter, Glimcher et al. 1996). Modeling ist der primäre Mechanismus, durch den Knochengewebe wächst und seine maximale Geometrie erreicht. Die Knochenbildung und -resorption können dabei räumlich und zeitlich von einander getrennt stattfinden (Remodeling siehe 3.1.3.5).

Auch zwei Arten der Knochenbildung lassen sich zunächst differenzieren: die enchondrale und die pharmakologisch induzierte Ossifikation, die per se nichts mit Skelettwachstum zu tun hat und somit hier nicht weiter besprochen wird.

Bei der enchondralen Ossifikation ist ein Wachstum des Knorpels vorausgegangen, der über verschiedene Reifungsschritte durch Knochengewebe ersetzt wird. Dabei unterlaufen die Chondrozyten einer Proliferation und Hypertrophie mit einsetzender Verkalkung der Matrix. Zu diesem Zeitpunkt setzt auch eine Vaskularisierung ein. Kalziumsalze und Präosteoblasten und Präosteoklasten werden an ihren Wirkort transportiert. Zunächst wird die alte Matrix degradiert und Osteoblasten bilden neues Knochengewebe (Junqueira, Carneiro et al. 2002; Liebig 2009). Diese Knochenstruktur unterliegt einem Modeling-Prozess, der harte und belastbare Knochensubstanz schafft.

Ein Knochen vergrößert sich auch durch appositionelles Wachstum, beispielsweise beim Dickenwachstum. Hier werden Zelllagen außen angelagert und meist in geringerem Maße innen abgebaut.

Nach Verletzungen und Frakturen kann sich das Knochengewebe aus dem ummantelnden Gewebe regenerieren. Durch den Stimulus der Gewebetraumatisierung werden mitogene und chemotaktische Agentien freigesetzt, die die Proliferation und Reifung von Precursorzellen veranlassen. Diese Zellen produzieren Kollagensubstanz, um eine Matrix für das Kallusgewebe zu produzieren, welches zunächst knorpelige Eigenschaften besitzt und eine Befestigung der Fragmente erreichen soll. Dieser Kallus kalzifiziert nachfolgend und hat zu Beginn eine unorganisierte Struktur. Durch Remodeling (siehe unten) wird er aber mehr zunehmend zielgerichtet aufgebaut und erhält so eine organisierte Struktur (Junqueira, Carneiro et al. 2002).

Beim Fohlen ist jedoch bekannt, dass sich bei forciertem Training innerhalb der ersten fünf Monate die Dichte der Knochensubstanz zwar erhöht (Firth, van Weeren et al. 1999), aber der Kollagenstoffwechsel negativ beeinflusst wird (Billinghurst, Brama et al. 2003).

3.1.3.5 Adaptation des Knochengewebes (Remodeling)

Physiologisches Knochenremodeling ist ein koordinierter Prozess, der sowohl für die Knochenresorption und als auch für die Knochenbildung verantwortlich ist. Dies geschieht räumlich und zeitlich begrenzt. Dabei kann sich das Knochengewebe optimal adaptieren, um sich an die rasch entwickelnden, mechanischen Anforderungen anzupassen (Meunier 1986; Hillam und Skerry 1995). Mikrofrakturen, die durch die tägliche Belastung resultieren, werden als geschädigtes Knochengewebe abgeräumt und durch gesundes Knochengewebe ersetzt. Remodeling ist außerdem für die Aufrechterhaltung der Homöostase der Kalzium- und Phosphatkonzentrationen im Blut notwendig.

Die BMU ist dabei ein Mediator der Einzel-Zellaktivitäten zur gesamten Knochenmorphologie. Stets kommt es zur Abfolge einer bestimmten Sequenz: Aktivierung – Resorption – Formation (Lazenby 1990a).

Die Aktivierung erfolgt zum einen durch mechanische Reize, die bei strukturellen Schäden und Apoptose von Osteozyten entstehen (Verborgt, Tatton et al. 2002). Diese produzieren normalerweise TGF- β , der die Osteoklastogenese blockiert. Eine Aktivierung erfolgt zum anderen auch durch PTH und beispielsweise durch Östrogene (E). So konnte eine Studie die anabole Langzeitwirkung durch equines PTH auf den Knochenstoffwechsel beim Wallach mit einer Zunahme von bis zu 8% der Knochenmasse belegen (Weisrock, Winkelsett et al. 2011).

Die Wirkung der Hormone wird durch die „Lining-Cells“ am Knochengewebe vermittelt, welche die Precursorzellen der Osteoklastenreihe mit Hilfe von M-CSF, MCP-1 und RANK-L aktivieren, die Reifung der Vorläuferzellen zu Osteoklasten und die anschließende Resorption einzuleiten. Zeitgleich werden die Precursorzellen der Osteoblasten aktiviert und zur Reifung gebracht, so dass die Osteoblasten anschließend damit beginnen können, neue Matrix zu synthetisieren.

Auch Immunzellen sind in den Aktivierungsprozess involviert (Weitzmann und Pacifici 2007). Insbesondere B-Lymphozyten scheinen eine Rolle zu spielen, da sie mehr als 50% des OPGs am Knochen produzieren (Li, Toraldo et al., 2007).

Die Knochenresorption erfolgt in zwei Phasen: In der ersten extrazellulären Phase werden hydrolytische Enzyme und Prokollagenase in den Raum zwischen Osteoklast und Knochenmatrix entlassen, die die Disaggregation der interfibrillären Grundsubstanz induzieren. Am Ende dieser Phase finden sich freie Hydroxylapatitkristalle, Fragmente von Kollagenfibrillen und Grundsubstanz zwischen Osteoklast und Knochen. In der zweiten Phase werden diese Fragmente durch die ruffled border phagozytiert. Der weitere Abbau der anorganischen Substanz findet in den zytoplasmatischen Vakuolen und den Lysosomen des Zytoplasmas eines Osteoklasten statt. Den Osteoklasten folgt eine Gruppe mononukleärer Zellen, die während der Phasenumkehr von der Resorption der Knochensubstanz bis zu deren Aufbau die Resorptionsbucht auskleiden. Obwohl die exakte Funktion dieser Zellen bisher unklar geblieben ist, scheinen sie die ausgehöhlte Oberfläche der Resorptionszone zu glätten und Kollagenfasern zu phagozytieren; in Vorbereitung auf die Ablagerung einer Umkehrlinie (Reversal-line). Bei dieser Linie handelt es sich um eine dünne, unmineralisierte, schwefelreiche Schicht von Matrix, die ein Osteon von den interstitiellen Lamellen trennt (Schaffler, Burr et al. 1987; Eriksen und Langdahl 1995). Hinter diese mononukleären Zellen heften sich durch TGF- β rekrutierte Reihen von Osteoblasten an die Umkehrlinie und legen Schichten von Osteoid ab. Die Größe des Remodeling-Raumes verengt sich zunehmend mit den konzentrisch abgelagerten und mineralisierten Osteoidlamellen. An einem bestimmten Punkt stockt die Produktion und ein Havers'scher Kanal bleibt in der Mitte des neu geformten Osteons zurück.

Die Terminierungssequenz wird von Osteozyten eingeleitet. Sie produzieren SOST, ein lösliches Molekül, was sich an den LRP5/6-Rezeptor der Osteoblasten bindet und die Wnt-Kaskade blockiert, einen Inducer der Knochenbildung. Somit wird eine weitere Knochenbildung unterbunden (Robling, Niziolek et al. 2008).

Gewebemakrophagen im Knochengewebe haben ebenfalls einen hohen Stellenwert bei der Erhaltung der Homöostase, Entwicklung und Reparatur des Knochengewebes. Sie sind wichtig für eine vollständige Differenzierung der Osteoblasten (Chang, Raggatt et al. 2008)

und formen einen Baldachin über der Resorptionslakune, schaffen also eine Nische, in der die Sequenz „Aktivierung-Resorption-Formation“ abläuft.

Intrakortikale BMUs halten die charakteristische 3-D-Struktur des Knochens aufrecht, wenn sie sich durch eine lange Diaphyse in nahezu Längsorientierung bewegen (Hert, Fiala et al. 1994; Parfitt 1994). Die Kopfreion der BMU ist vergleichbar mit einem schneidenden Kegel, der speziell für die Resorption mit Osteoklasten ausgekleidet ist. Der Durchmesser des Tunnels, den die Osteoklasten aushöhlen, beträgt circa 250 – 300 µm. Das entspricht auch der Querschnittsfläche des entstehenden sekundären Osteons. Das Remodeling der trabekulären und endokortikalen Oberflächen folgt grundsätzlich demselben Muster, mit der Ausnahme, dass die Zellen keine Tunnel anlegen und diese wieder verschließen.

Wenn die skeletale Reife erreicht ist, wird das Remodeling auf ein Basislevel verringert, im Verhältnis zu dem Umsatz beim Wachstum (Lazenby 1990b).

Vermehrtes Remodeling kann in bestimmten Krankheitsstadien auftreten oder wenn sich Einrichtungen der mechanischen Belastung grundlegend ändern. Der Nettobetrag zwischen abgebauter Knochensubstanz und neu aufgebauter Knochensubstanz während eines Remodelingzyklus beträgt eine gewisse Menge, die als Knochenbalance bezeichnet wird.

Während die Abfolge der Sequenz bei Stoffwechselstörungen selten betroffen ist, kann die Knochenbalance in vielen Krankheitsstadien weit differieren, zum Beispiel bei der Osteoporose. Hier sind die Resorption und Bildung des Knochengewebes vorhanden, aber es besteht eine negative Knochenbalance. Es wird mehr Knochen resorbiert, als im typischen BMU produziert wird (Schaffler, Burr et al. 1987).

Beim Pferd konnte durch mehrere Studien sicher nachgewiesen werden, dass durch Stallruhe oder Immobilisation ein Verlust an Knochensubstanz erreicht wird. Dies konnte radiographisch (Van Harreveld, Lillich et al. 2002) und mit den unten aufgeführten Knochenmarkern dargestellt werden (Hoekstra, Nielsen et al. 1999; Delguste, Amory et al. 2007).

3.2 Knochenmarker beim Pferd

Verschiedene Möglichkeiten den Knochen von Pferden auf seine charakteristischen Eigenschaften und Pathologien hin zu untersuchen sind beschrieben. Savage et al. berichten von der Biopsie am Hüfthöcker mit Histomorphometrie als invasive und sehr aufwendige Methode, Knochengewebe zu untersuchen (Savage, Tidd et al. 1991). Weniger invasive Methoden wie Röntgen, Computertomographie oder quantitativer Ultraschall zur Beurteilung der Dichte und der Elastizität des Knochens finden Anwendung in der Tiermedizin (Lepage, Carstanjen et al. 2001). Sie sind jedoch mit größerem apparativem Aufwand verbunden. Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels bieten einen sensitiven, schnellen und nicht-invasiven Zugang zur Knochenresorption und Knochenformation im Vergleich zu den vorgenannten Methoden (Lepage, Marcoux et al. 1990). Die Marker werden aus dem Blut oder dem Urin quantifiziert und geben Einblick in die Pathologie der Knochentextur und dienen als diagnostisches Hilfsmittel muskuloskelettaler Erkrankungen. So konnte bei einer Langzeitstudie mit einer Kombination aus Gelenk- und Knochenmarkern das Einsetzen einer Erkrankung mit 73,8% Sicherheit detektiert werden (Frisbie, Mc Ilwraith et al. 2010). Das Auftreten von Frakturen hingegen ist beim zwei- bis dreijährigen Pferd nicht sicher durch Knochenmarker nachzuweisen (Jackson, Dyson et al. 2009).

Knochenmarker stellen zum Zeitpunkt der Probenentnahme den gegenwärtigen Zustand der Knochenbilanz dar. Sie sind in der Hauptsache Enzyme oder Matrixkomponenten, die während des Knochenremodelings in die Blutzirkulation abgegeben werden und deren Aktivität oder Konzentration somit aus einer Blut- oder Urinprobe bestimmt werden kann. Grundsätzlich wird zwischen nicht-kollagenen Markern und kollagenen Markern differenziert: Während des Prozesses des Knochenaufbaus bilden Osteoblasten beim Pferd hauptsächlich Kalzium-bindende, nicht-kollagene Proteine und Typ-I-Kollagen. Als nicht kollagene Proteine der Knochenbildung können beim Pferd die Alkalische Phosphatase (AP), BALP, BSP und OC bestimmt werden. Ein verwendeter, kollagener Aufbau- oder Formationsmarker ist das Carboxy-terminale Propeptid des Typ-I-Kollagens (PICP).

Von den verschiedenen kollagenen Resorptionsmarkern, die beim Abbau der Knochenmatrix von den Osteoklasten freigesetzt werden, können beim Pferd CTX-I, das C-terminale Telopeptid-Fragment des Typ-I-Kollagens (CTX-MMP), das via enzymatischen Abbaus durch Matrix-Metalloproteinasen gebildet wird, Hydroxy-Prolin, und die beiden Kollagen-Brückenproteine Deoxypyridinolin (DPD) und Pyridinolin (PYD) quantifiziert werden. Als nicht-kollagener, spezifischer Marker der Knochengewebegradation kommt die Tartrat-resistente saure Phosphatase-5b (TRAP 5b) vor, die nur von Osteoklasten gebildet wird (Carstanjen 2006).

3.2.1 Nichtkollagene Aufbauprodukte

Nachfolgend werden die beiden Aufbaumarker OC und BALP ausführlich einzeln besprochen, da sie sehr gut erforscht sind und für diese Arbeit enormen Stellenwert besitzen.

3.2.1.1 Osteokalzin

Osteokalzin ist ein 5,8 kDa schweres Protein, welches Hydroxylapatit bindet und ausschließlich von Osteoblasten, Odontoblasten und hypertrophierenden Chondrozyten synthetisiert wird (Gallop, Lian et al. 1980).

Es enthält Glutamylreste, welche mit Hilfe des Cofaktors Vitamin K und des Enzyms Glutamylcarboxylase γ -carboxyliert werden müssen, bevor OC im Knochen Kalzium aktiv binden kann (Price, Fraser et al. 1987). An seinen C-terminalen Enden kann sich OC auch mit anderen Proteinen verbinden, auch mit oberflächlichen Zellrezeptoren der Osteozyten. Diese Funktion ermöglicht es dem OC, als ein Organisator der Extrazellulärmatrix zu agieren. Osteokalzin wird als spezifischer Knochenmarker der Osteoblasten bei Mensch und Pferd betrachtet (Brown, Delmas et al. 1984; Lepage, Marcoux et al. 1990). Es wird angenommen, dass direkt nach der Ausschüttung durch den Osteoblasten der größte Teil des neu synthetisierten Proteins in die extrazelluläre Knochenmatrix eingebettet wird. Dort macht es etwa 15% des nicht kollagenen Proteins aus.

Durch das Studium der OC-knockout-Maus konnte man bessere Erkenntnisse über die Funktion und Wirkungsweise des OCs gewinnen. Bei diesen Tieren werden eine verdickte Corticalis und verstärkte Trabekel ausgebildet. Ihr Knochengewebe scheint stabiler zu sein als bei den Wild-Typ-Mäusen. Offensichtlich ist OC in den Knochenumbauprozess involviert und könnte auch über einen negativen Feedback-Mechanismus auf die Knochensubstanz wirken (Ducy, Desbois et al. 1996).

Neben dem Einbau des OCs in die Knochenmatrix wird auch etwa 30% in die Blutzirkulation abgegeben (Carstanjen 2006), wo es über Immunoassays, pferdespezifische RIA (Carstanjen, Sulon et al. 2003) und kreuzreaktive RIA (Patterson-Allen, Brautigam et al. 1982; Lepage, Marcoux et al. 1990; de Behr, Daron et al. 2003) nachgewiesen werden kann. Serumwerte des immunoreaktiven OCs korrelieren gut mit der tatsächlichen Knochenaufbaurrate. Das Protein unterliegt jedoch einer schnellen Degradation im Serum, so dass neben dem vollständigen Protein auch Bruchstücke verschiedener Größen vorkommen. Sobald OC in die Knochenmatrix mit eingebunden ist, könnten seine Bruchstücke im Serum auch eine mögliche Knochenresorption anzeigen. Dies konnte bei menschlichen Individuen mit hohem Knochenstoffwechsel beobachtet werden, bei denen ein Teil kleinerer N-terminaler Fragmente des OCs vorkam (Seibel 2005). Denn OC ist als Kette von Aminosäuren auch Angriffspunkt verschiedener Proteasen. Eine Freisetzung bei der Knochenresorption wird diskutiert. Tierstudien legen nahe, dass das OC in der Blutbahn aus dem Knochenaufbau stammt (Carstanjen 2006). Die Gruppe um Carstanjen entwickelte ein pferde-spezifisches Antiserum gegen equines OC, das weder mit kleineren noch größeren Eiweißfragmenten kreuzreagierte, somit auch nicht mit fragmentierten Anteilen des OCs (Carstanjen, Sulon et al. 2003).

Im Zusammenhang mit der OC-Messung sollte auch die renale Exkretion gemessen werden, weil dies der Hauptweg der OC-Eliminierung ist (Price, Williamson et al. 1981; Melick, Farrugia et al. 1988). Bei Störungen der renalen Elimination erhält man artifiziell erhöhte OC-Werte.

Faktoren beim Pferd, die eine Blutkonzentration von OC beeinflussen, sind: Geschlecht, Rasse, Alter, zirkadianer Rhythmus, Jahreszeit, Haltungsform, Trainingseffekte, Traumatisierung und Heilung, exogene Kortikosteroide, Allgemeinanästhesie und auch die Mineralstoff- und Spurenelementzufuhr (Carstanjen 2006). In einer Arbeit konnten auch erhöhte Konzentrationen zum Ende der Trächtigkeit beim Haflinger gemessen werden (Greiner, Cavalier et al. 2012).

Stuten zeigen bei gleichem Körpergewicht und gleichem Alter erhöhte OC-Konzentrationen zu Beginn der Pubertät (Chiappe, Gonzalez et al. 1999). Trainierte Stuten zeigen im Vergleich zu trainierten Wallachen eine höhere OC-Konzentration, was mit der höherem Steriodhormonkonzentration erklärt wird (Fletcher, Topliff et al. 2000).

Bei der Untersuchung hinsichtlich Typ und Rasse der Pferde konnten keine signifikanten Unterschiede bei vier verschiedenen Pferderassen beobachtet werden; nichts desto trotz wurden bei Kaltblütern niedrigere Serum-OC-Spiegel im Vergleich zu Warmblütern gemessen. Dies mag den erblichen und charakteristisch physiologischen Effekt reflektieren, dass diese Pferde möglicherweise einen langsameren Knochenstoffwechsel haben (Lepage, Eicher et al. 1997; de Behr, Daron et al. 2003).

Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten die zirkadianen Schwankungen des OCs beim Pferd. Das beobachtete Muster zeigte entweder einen biphasischen Verlauf mit konstanten Raten am Tage und Schwankungen in den frühen Morgenstunden und gegen Abend (Jackson, Blumsohn et al. 2003) oder keine signifikanten Unterschiede (Carstanjen, Hoyle et al. 2004). Um mögliche zirkadiane Einflüsse einzugrenzen und Ergebnisse vergleichbar zu gestalten, sollten die Blutentnahmen deshalb tagsüber und zur gleichen Zeit entnommen werden (Lepage, DesCoteaux et al. 1991; Black, Schoknecht et al. 1999).

Saisonale Veränderungen bestehen im Verlauf eines Jahres (Maenpaa, Pirskanen et al. 1988). Im Rahmen einer sinusförmigen Schwingung kommt es zu Beginn des Frühjahres und im Spätsommer zu relativen Maxima, denen im späten Frühjahr und im Herbst jeweils relative Minima folgen (Pastoret, Carstanjen et al. 2007). Dies konnte für Jährlinge und Zweijährige hinreichend gezeigt werden (Price, Jackson et al. 1997). Möglicherweise kann dies über die engen Zusammenhänge, die zwischen der Kalziumkonzentration im Blut, dem PTH-, dem Vitamin D₃-Spiegel und dem Knochenstoffwechsel bestehen, erklärt werden. Beispielsweise fällt der Vitamin-D₃-Level bei gesteigerter Sonnenlichtexposition ab. Zusätzlich zur Aufnahme über Quellen in der Nahrung wird Vitamin D₃ über Provitamine in der Haut, unter dem Einfluss von UV-Licht, produziert. Daraufhin verändern sich jeweils der Kalziumspiegel im Blut und dessen hormonelle Regulation beim Menschen (Woitge, Scheidt-Nave et al. 1998). Eine Übertragbarkeit auf das Pferd ist nur begrenzt möglich, da insgesamt nur geringe Mengen Vitamin D₃ beim Pferd gemessen werden (Maenpaa, Pirhonen et al. 1988). Eine Supplementierung mit equinem PTH führt aber zu einer positiven Bilanz des Knochenstoffwechsels (Weisrock, Winkelsett et al. 2011).

Bei der Untersuchung hinsichtlich der OC-Serumkonzentration unterschiedlicher Altersgruppen konnten bei Jährlingen dreimal höhere Werte als bei ausgewachsenen Wallachen gemessen werden (Black, Schoknecht et al. 1999). Diese Ergebnisse werden von verschiedenen Gruppen berichtet, die eine inverse Korrelation zwischen der OC-Konzentration und dem Alter der Tiere vom Fohlen bis zum fünften Lebensjahr bei unkastrierten Hengsten und Stuten nachweisen konnten (Lepage, Marcoux et al. 1990; Siciliano, Kawcak et al. 2000; Price, Jackson et al. 2001).

Zusätzlich wurde im Rahmen verschiedener Studien bei den Probanden endogenes Kortisol gemessen. Jedoch wurde in keiner dieser Studien eine Korrelation zwischen Kortisol und OC beschrieben. Beim Menschen hingegen wurde ein Dosis-abhängiger Effekt exogenen Kortisols auf die OC-Synthese berichtet (Weinstein, Jia et al. 2004).

Beim Pferd sinkt die OC-Konzentration zwischen 24 und 48 Stunden nach einer intramuskulären (i.m.) Triamcinolongabe ab und kehrt innerhalb von 28 Tagen wieder zum Ausgangswert zurück. Bei einem kleinen Teil der beobachteten Tiere wurden die ursprünglichen Werte erst nach 62 bis 150 Tagen post applicationem erreicht. Bei der Applikation von Dexamethason sinkt die OC-Konzentration innerhalb von 12 Stunden ab und

kehrt nach drei Tagen wieder auf ursprüngliche Werte zurück. Beide Ergebnisse spiegeln eine Reduktion des Knochenaufbaus wieder (Grafenau, Carstanjen et al. 2000).

Auch eine Vollnarkose ist assoziiert mit hormonalen und stoffwechselphysiologischen Veränderungen beim Pferd. Die Plasma-OC-Konzentration ist innerhalb von 24 Stunden reduziert, mit oder ohne chirurgischen Eingriff. Dabei hat die Dauer der Narkose maßgeblichen Einfluss auf den Grad des Abfalls der OC-Konzentration. Nach vier Tagen ist wieder mit normalen Werten zu rechnen (Grafenau, Eicher et al. 1999).

Bei der Variation der Mineralstoffzufuhr bei Jährlingen zeigen Ergebnisse der Studie, dass der Umsatz der Knochenauf- und Knochenabbaumarker erhöht werden kann, bei gleichbleibender Knochenmasse (Nielsen, Cate et al. 2010).

Beim Pferd ist richtiges Training das Fundament, einen belastungsstabilen Knochen zu erhalten. Die Adaptation des Knochens an Belastungen wird durch Modeling und Remodeling ausgeführt. Anhand von biochemischen Knochenmarkern wurde dieser Ansatz untersucht. Nach einem standardisierten Trainingsprogramm trainierte Zweijährige zeigten nach 14 Wochen niedrigere OC-Konzentrationen als nicht belastete Pferde: Anschließend ließen sich erhöhte Werte messen (Jackson, Goodship et al. 2003). Trainierte Traber zeigten nach 24 bzw. 48 Wochen Renntraining erhöhte OC-Werte (Caron, Peters et al. 2002). Diese unterschiedlichen Ergebnisse scheinen Folge unterschiedlicher Studienbedingungen und -populationen zu sein (Carstanjen 2006).

Der Einfluss der Fütterung auf die OC-Konzentration ist schwierig zu bewerten, da unterschiedliche Angaben vorliegen. Die Gruppe um de Behr formuliert deshalb sehr vorsichtig, dass die Korrektur einer unausgewogenen Kalzium-Phosphat-Ration keine eindeutigen Veränderungen der Plasmakonzentrationen bei verschiedenen Markern ergibt. Die Interpretation der verschiedenen Knochenmarker (inklusive OC) erscheint schwierig, wenn nicht andere Parameter, wie eine komplette Anamnese, eine klinische Untersuchung sowie eine Auswertung der Ration hinzugezogen werden können (de Behr, Daron et al. 2003).

Bei heranwachsenden Hengsten konnte ein Zusammenhang zwischen unkonjugierten E und OC dargestellt werden (Lemazurier, Toquet et al. 2002).

3.2.1.2 Alkalische Phosphatase des Knochens

Die AP ist ein universelles Enzym, das in Tetrameren vorliegt. Es wird durch Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Bindungen an der Oberfläche von Zellmembranen fixiert (Stinson und Hamilton 1994). Der gesamte Serumpool der AP besteht aus verschiedenen Dimeren, die aus unterschiedlichen Geweben stammen: Leber, Knochen, Intestinum, Milz, Niere und Plazenta. Hinzu kommt, dass diverse Tumoren makromolekulare Formen einer AP bilden (Seibel 2005).

Die physiologischen Isoformen der AP werden über vier Genloci kodiert, einschließlich dreier gewebespezifischer Gene und einem gewebeunspezifischen Gen auf dem Chromosom 1. Die am häufigsten vorkommenden Isoformen sind Leber-, Knochen- und Nieren-AP. Der Unterschied zwischen den einzelnen, nicht-spezifisch decodierten Isoenzymen liegt in der posttranslationalen Modifikation der Kohlenwasserstoffketten der Dimere. Der Nachweis erfolgt über Colorometrie.

Bei einem adulten Lebewesen mit normaler Leberfunktion entspringen nahezu 50% der Enzymaktivität aus der Leber und die anderen 50% vom Knochengewebe (Green, Anstiss et al. 1971). Bei Kindern und Heranwachsenden und auch bei Pferden dominiert das knochenspezifische Isoenzym aufgrund des skelettalen Wachstums (Lepage, Marcoux et al. 1990; Van Hoof, Hoylaerts et al. 1990).

Es hat sich herausgestellt, dass die AP, insbesondere bei jungen Pferden ab 20 Monaten, mit der Alkalische Phosphatase des Knochens (BALP) nicht mehr signifikant korreliert (Price, Jackson et al. 1995a). Die Aktivität des Enzyms geht beim älter werdenden Pferd in unterschiedlichem Maße zurück (de Behr, Daron et al. 2003), so dass eine alleinige Messung der AP als verlässlichen Knochenmarker abgelehnt werden muss.

Die höchsten Konzentrationen des Enzyms beim Pferd finden sich in den Matrixvesikeln, insbesondere in den Wachstumszonen, in den Bereichen der Mineralisation (Henson, Davies et al. 1995).

Eine Elimination des Enzyms erfolgt über eine Bindung des glykolysierten Proteins an den Galactose-Rezeptor an den Leberzellen, so dass es zu rezeptorvermittelten Endozytose und intrazellulären Verdauung des Proteins kommt (Blom, Ali et al. 1998).

Es wurden seither viele Techniken entwickelt, um die Hauptisoformen der AP zu differenzieren: Hitzedenaturierung, Elektrophorese, Präzipitation, selektive Inhibition und Immunoassays.

Neuere Immunoassays erlauben eine einfache und schnelle Quantifizierung der Enzyme. Wie auch bei allen anderen Techniken tritt bei den Immunoassays eine gewisse Kreuzreaktivität zwischen Leber- und BALP auf (15 bis 20%). Bei menschlichen Probanden mit erhöhter Leber-AP können die Ergebnisse der BALP-Messung zu einem artifiziell erhöhten Ergebnis führen (Seibel 2005).

Obwohl Kollagen I das Hauptprodukt der Osteoblasten darstellt, produzieren und sezernieren diese noch eine Vielzahl von nicht-Kollagen-Proteinen, wovon das am meisten untersuchte die BALP ist. Bei Pferden wurde bei Chondrozyten eine konzentrierte Aktivität an den Matrixvesikeln im Bereich der Wachstumszone, also der Bereich der Mineralisation, lokalisiert, was den Marker als einen spezifischen Marker des Knochenaufbaus bestätigt (Henson, Davies et al. 1995).

Die Serum-BALP kann bei Pferden durch Elektrophorese, nicht-isotopische Immunoassays, RIA, ELISA, Hitze-Inaktivierung und durch Weizenkeim-Lektin-Präzipitationsassays (WGL) bestimmt werden.

Dabei stellt die WGL-Methode zum Nachweis der BALP das sensitivste Verfahren dar, wird aber derzeit nur als „in-house“-Assay angeboten und ist somit nicht kommerziell verfügbar (Jackson, Eastell et al. 1996).

Es gibt eine inverse Korrelation zwischen dem Alter und der Serum-BALP mit einem deutlichen Abfall innerhalb der ersten drei Lebenswochen (Hank, Hoffmann et al. 1993; Price, Jackson et al. 1995a). Nach einem Jahr ist die Serum-BALP nur noch schwer mit Hilfe der Elektrophoresetechnik zu messen (Thoren-Tolling 1988). Price fand heraus, dass bei neugeborenen Fohlen der Anteil der BALP an der gesamten Serum-AP bis zu 92% ausmacht, verglichen mit nahezu 20% bei ausgewachsenen Pferden im Alter von mehr als fünf Jahren. Bei trainierten Pferden zeigt sich eine vorübergehende Korrelation mit dem PICP, was einen Anstieg des Knochenstoffwechsels widerspiegelt (Price, Jackson et al. 1995b).

Für den heranwachsenden Hengst wurde publiziert, dass E_2 einen entscheidenden Einfluss auf den Knochenstoffwechsel ausüben, was mit einer Aktivitätserhöhung der Alkalischen Phosphatase bei ansteigenden E_2 einhergeht (Lemazurier, Toquet et al. 2002).

Wie die meisten Knochenmarker sollten die Blutproben für eine Bestimmung der BALP aus dem Serum auch beim Pferd in den Morgenstunden genommen werden, weil es zu tageszeitlichen Schwankungen kommt. Um eine Biodegradation zu vermeiden, sollte die Proben unmittelbar nach der Zentrifugation bei minus 20°C eingefroren werden; dann gilt die Probe als stabil (Jackson, Eastell et al. 1996). Nach mehreren Tau- und Gefrierzyklen war bei menschlichem BALP kein Effekt auf die Messbarkeit feststellbar (Seibel 2005).

Das Typ-I-Prokollagen Carboxy-Propeptid enthält eine carboxy-terminale, trimetrische Erweiterungsdomäne. Diese Struktur wird während der Typ-I-Kollagensynthese ebenfalls enzymatisch abgespalten und in die Blutbahn entlassen. PICP hat Seitenketten-Disulfid-Bindungen und wird durch Endothelzellen der Leber abgebaut. Ein sensibles Nachweisverfahren wurde für das Pferd beschrieben (Price, Jackson et al. 1995b). Eine Interferenz mit anderen kollagenen Geweben ist dabei jedoch möglich. Eine zirkadiane Schwankung im Tagesverlauf konnte in der Studie von Price bei wachsenden Pferden nicht beobachtet werden (Jackson, Lonnell et al. 2003).

Für das Pferd steht derzeit ein validierter kompetitiver RIA für PICP zur Verfügung (Price, Jackson et al. 1995a).

Das Typ-I-Prokollagen Amino Propeptid (PINP) enthält eine Amino-terminale, trimetrische Erweiterungsdomäne. Dieses Propeptid wird ebenfalls bei der Kollagensynthese im extrazellulären Raum enzymatisch abgespalten und in die Blutbahn abgegeben. Dieses Propeptid enthält eine kurze, kollagen-ähnliche Aminosäuresequenz mit multiplen Prolin- und Hydroxyprolin-Anteilen. Mittlerweile gibt es auch für das Pferd ein validiertes Nachweisverfahren, das bisher in einer Studie erwähnt wird (Han, Copeland et al. 2007).

Weil Typ-I-Kollagen etwa 90 % des Protein-Anteils der Knochenmatrix ausmacht, reflektieren zirkulierende Spiegel des PINP und PICP als direkte Indikatoren der Knochenformation den Knochenaufbau. Trotz des gemeinsamen Ursprungs scheint PINP in der Humanmedizin der bessere Indikator der Knochenaufbau-Aktivität zu sein (Dominguez Cabrera, Sosa Henriquez et al. 1998), insbesondere für die Wirkung von PTH (Chen, Satterwhite et al. 2005).

3.2.3 Nichtkollagene Abbaumarker: Tartrat-resistente saure Phosphatase-5b

Während der Knochenresorption setzen Osteoklasten im Bereich des Bürstensaums lysosomale Enzyme und Säuren frei; so auch die für die Osteoklasten spezifische TRAP5b (Fujikawa, Shingu et al. 1996). Dieses Enzym gehört in die Familie der ubiquitären sauren Phosphatasen, die alle durch L(+)-Tartrat gehemmt werden, außer dem Isotyp 5. Dieser Isotyp existiert in zwei Subtypen, von denen die TRAP5b für Osteoklasten spezifisch ist (Seibel 2005). Mittels Immunoassay kann dieses Enzym im Serum beim Menschen quantifiziert werden und weist somit die direkte Aktivität von Osteoklasten nach (Halleen, Hentunen et al. 1996; Halleen, Alatalo et al. 2000). Experimentell wurde es am Pferdeosteoklasten direkt in vitro nachgewiesen (Gray, Davies et al. 1998). In einer Feldstudie wurde es aus subchondralem Knochen bei Fohlen quantifiziert und der Knochenstoffwechsel beleuchtet (van de Lest, Brama et al. 2003).

Für humanmedizinische TRAP5b-Assays sollten die Serumproben direkt nach der venösen Blutentnahme stabilisiert werden, weil sie innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur mehr als 20% ihrer Aktivität einbüßen. Der Zusatz von Stabilisatoren, wie Citratpuffer, in der Serumprobe verhindert den Aktivitätsverlust (Bais und Edwards 1976). Derzeit gelten sie als sehr sensibler, spezifischer und vielversprechender Marker in der Humanmedizin für das Monitoring einer Alendronattherapie (Nenonen, Cheng et al. 2005). Sie sind wertvolle und sensible Marker für Knochenmetastasen bei Tumorpatienten (Salminen, Ala-Houhala et al. 2005; Korpela, Tiitinen et al. 2006).

3.2.4 Nichtkollagene Abbaumarker: Bone Sialoprotein, Kathepsin K

Bone Sialoprotein ist ein phosphoryliertes Glycoprotein mit einem mittleren Gewicht von 57,3 kDa und macht etwa 5-10% der nicht kollagenen Matrix des Knochengewebes aus (Fisher, Whitson et al. 1983). Es ist ein Produkt der aktiven Osteoblasten und Odontoblasten, wird aber auch in Osteoblasten-ähnlichen Zellen und malignen Tumorzelllinien gefunden. Seine Messenger-RNA oder BSP wird hauptsächlich in mineralisiertem Gewebe wie Knochen, Dentin oder an der Oberfläche kalzifizierender Knorpel gefunden (Bianco, Fisher et al. 1991; Chen, Zhang et al. 1991). Beim Menschen reflektiert es den frühen Mineralisationsprozess des Knochens. Daneben verstärkt es aber auch die Osteoklasten-vermittelte Knochenresorption, da es ein Bindeglied im Zell-Matrix-Adhäsionsprozess ist (Ross, Chappel et al. 1993; Hunter, Kyle et al. 1994). Es wurden einige polyklonale Antisera entwickelt, die zwar das Glykoprotein spezifisch binden (Saxne, Zunino et al. 1995), aber wenig Aussage über das spezifische Epitop erlauben (Karmatschek, Maier et al. 1997), denn BSP wird im Serum hauptsächlich an den Faktor H gebunden. Eine Serumanalyse ermittelt nur den ungebundenen Anteil, also eine Fraktion des bioverfügbaren BSPs (Fedarko, Fohr et al. 2000). Basierend auf klinischen Daten und dem schnellen Absinken des Spiegels nach der Gabe von Bisphosphonaten beim Menschen scheint der Serumspiegel beim Menschen eher einen Prozess der Resorption anzuzeigen (Seibel, Woitge et al. 1996). Beim Pferd wurde der Marker direkt als „Abbaumarker“ bei der Osteoarthritis im immunhistochemischen Nachweis genutzt (Ekman, Skioldebrand et al.

2005), ebenso wurde BSP beim Pferd bei degenerativen Endometriumerkrankungen der Stute nachgewiesen (Walter, Helmreich et al. 2003).

Cathepsin K ist ein Mitglied der Cystein-Proteasen-Familie, das die Möglichkeit besitzt helikale- und Telozeptid-Regionen des Typ I Kollagens zu lösen (Kafienah, Bromme et al. 1998; Li, Yasuda et al. 2004). Immunhistochemisch ist das Enzym intrazellulär in den Osteoklasten in Vesikeln, Granula und Vakuolen gespeichert und wird bei der Matrixdegradation in die Resorptionslakune freigegeben (Goto, Yamaza et al. 2003). Es existieren humanmedizinische ELISA für die Messung des Enzyms, das den Umsatz des tatsächlichen Knochenabbaus widerspiegeln soll, insbesondere im Serum. Dies lässt den Marker als wertvoll für die Diagnostik von Knochenerkrankungen erscheinen (Seibel 2005). Auch beim Pferd ist das Enzym in exakt dieser Lokalisation nachgewiesen (Gray, Davies et al. 2002). Eine derzeitig veröffentlichte Studie beschreibt eine direkte Hemmung dieses Enzyms und seiner Funktion an der reduzierten CTX-I Ausscheidung beim Pferd (Hussein, Ishihara et al. 2014). Es gibt derzeit auch für das Pferd entsprechende polyklonale Antikörper vom Kaninchen für den Nachweis des Enzyms mittels ELISA.

3.2.5 Kollagenabbauprodukte: Pyridinolin, Deoxypyridinolin, Hydroxyprolin, Carboxy-terminales Telozeptid des Typ-I-Kollagens, Carboxy-terminales Telozeptid-Fragment des Typ-I-Kollagens (durch Matrix-Metalloproteinase getrennt)

Die nützlichsten Knochenabbaumarker sind Typ-I-Kollagen-Abbauprodukte, da Typ-I-Kollagen über 90% der organischen Matrix des Knochens ausmacht. Ein Typ-I-Kollagen-Molekül setzt sich aus drei linksgängigen α -Ketten zusammen, die sich zu einer rechtsgängigen Tripelhelix umeinander winden. Der Durchmesser beträgt etwa 1,5 nm. Die Primärstruktur setzt sich aus der repetitiven Anordnung der drei Aminosäuren Glycin-Prolin-4-Hydroxyprolin zusammen, die die engen Windungen der Tripelhelix charakterisieren. Dabei werden die drei Ketten zunächst über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (Voet, Voet et al. 2002).

Diese Polypeptidketten werden bei der zellulären Translation im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, zum Golgi-Apparat transportiert und mit sekretorischen Vesikeln sezerniert. Hier finden eine teilweise Hydroxylierung und die Ausbildung von Disulfidbrücken an den C-terminalen Enden statt, so dass sich eine stabile Tripelhelix formt (Prokollagen). Nach der Exozytose findet die enzymatische Weiterverarbeitung zum Tropokollagen im extrazellulären Raum statt, so dass im Anschluss Fibrillen zusammengesetzt werden, die eine kovalente Quervernetzung erhalten, welche über die Hydroxy-Lysinreste erfolgen (Voet, Voet et al. 2002). Typ-I-Kollagen-Moleküle werden durch kovalent gebundene Aminosäuren, meistens aus der Familie der Pyridine, wie PYD oder DPD, verknüpft, um stabile Fibrillen zu formen (Seibel 2006).

Pyridinoline sind intramolekulare, nicht reduzierbare, reife, quervernetzte Aminosäuren, die das Kollagen stabilisieren. Sie werden hauptsächlich von der kollagenösen Knochenmatrix während des Abbaus in das Blutplasma abgegeben und unverändert mit dem Urin ausgeschieden. Beim Pferd kann die Substanz im Blutserum und im Urin nachgewiesen werden (Black, Duncan et al. 1988; Black, Schoknecht et al. 1999; Caron, Peters et al. 2002; Delguste, Amory et al. 2008).

Beim Abbau der Knochenmatrix werden auch die Fragmente des Typ-I-Kollagens in den Blutkreislauf eingebracht und durch Leber und Niere eliminiert. Für das Pferd stehen folgende Marker durch eine Messung über den Urin zur Verfügung: Hydroxyprolin (HYP), PYD und DPD. Beide letztgenannten Metabolite können über das Serum ebenfalls quantifiziert werden (Carstanjen 2006).

Hydroxyprolin wird posttranslational intrazellulär durch die Hydroxylierung des Prolins gebildet und stellt einen 12 - 14%igen Anteil der Aminosäuren in reifem Kollagen. Beim Pferd ist die Substanz bereits 1975 nachgewiesen worden (Jaeschke 1975). Etwa 90% des HYP wird durch die Degradation des Knochengewebes freigesetzt und hauptsächlich in der Leber metabolisiert und renal eliminiert (Lowry, Hall et al. 1985). Die Menge an HYP im Urin spiegelt allerdings nicht nur den Anteil der Knochenresorption im Körper wieder. Große

Mengen werden auch bei der Degradation neu gebildeten Kollagens frei, weshalb es als sensibler Abbaumarker nicht geeignet erscheint.

Pyridinolin wurde beim Knochenstoffwechsel der laktierenden Stute als Resorptionsmarker benutzt mit Ergebnissen, die nicht so deutlich ausfielen, wie bei anderen Haussäugetieren, weshalb der Marker ohne Kontrolle als eingeschränkt geeignet erscheint (Filipovic, Stojevic et al. 2010).

Auch weil es in anderen Geweben des Organismus, wie der Haut, in großen Mengen vorkommt, wird es als unspezifischer Index des Kollagen-Stoffwechsels angesehen und für den Nachweis durch wesentlich spezifischere Produkte ersetzt (Seibel 2005; Carstanjen 2006).

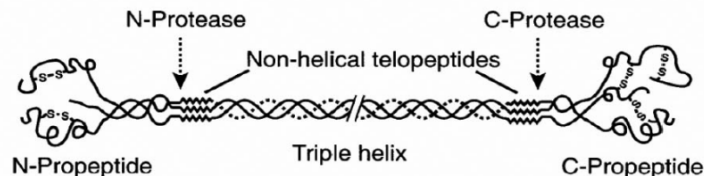


Abbildung 5: Kollagenmolekül mit Angriffsstellen der Propeptidasen

Die Messung des C-terminalen quervernetzten Telopeptids des Typ-I-Kollagens, welches durch Matrix-Metalloproteinasen gebildet wird (CTX-MMP), und des CTX-I erfolgt beim Pferd über das Blutserum (Lepage, Carstanjen et al. 2001). Eine Quantifizierung des Amino-terminalen Telopeptids des Typ-I-Kollagens (NTX) wurde bisher beim Menschen durch die Gewinnung aus dem Urin beschrieben (Rosen, Dresner-Pollak et al. 1994). Eine Kreuzreaktivität der entsprechenden Antikörper zwischen NTX bei Mensch und Pferd verläuft nicht zufriedenstellend (Lepage, Carstanjen et al. 2001). Abbildung 5 zeigt die Angriffsstellen der Proteasen am Kollagenmolekül [nach Seibel (2005), Seite 104, modifiziert].

Das CTX-MMP wird beim Abbau des Typ-I-Kollagens aus der Haut und dem Knochen in den Blutkreislauf freigesetzt und renal ausgeschieden. Die Quantifizierung aus dem Serum erfolgt durch RIA (Risteli, Elomaa et al. 1993), der für das Pferd validiert worden ist (Price, Jackson et al. 1995a). Das CTX-MMP enthält eine Pyridinolin-Quervernetzung zweier α 1-Ketten der C-terminalen Telopeptide, die zwischen der Tripelhelix und der Lysin-basierten trivalenten Quervernetzung angeordnet sind (Seibel 2005; Carstanjen 2006). Der Test zeichnet sich durch eine große Spezifität für den Abbau des Knochengewebes aus, ist jedoch beim Menschen störanfällig, da Kreuzreaktionen der Antikörper mit anderen Substraten wie DPD oder Pyrrol-Verbindungen eingegangen werden (Seibel 2005).

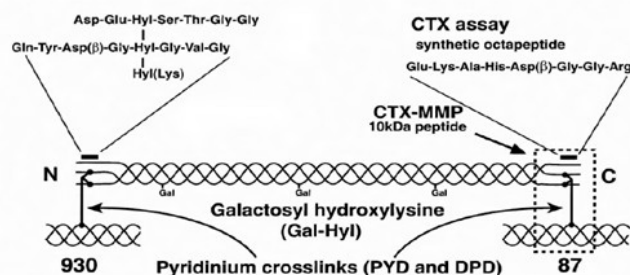


Abbildung 6: Schematische Darstellung der derzeit verwendeten Knochenmarker aus der Kollagen-Degradation

Die Abbildung zeigt diejenigen Aminosäureketten, welche in den jeweiligen Assays zum Nachweis der Abbauprodukte des Kollagens für dieses spezifisch sind (CTX: C-terminales Telopeptid). Galaktosyliertes Hydroxylsine (Gal-Hyl) ist ein weiteres Kollagenabbauprodukt. Außerdem ist schematisch die Lokalisation und die Funktion der Kollagen-Crosslinks Pyridinolin (PYD) und Deoxypyridinolin (DPD) skizziert.

Das CTX-I kann im Serum oder Plasma durch Immunoassays durch die Nutzung von Antikörpern gegen das Oktapeptid EKAH β DGG, welches eine β -L-isomerisierte Asparaginsäure am Carboxylrest enthält, quantifiziert werden (Garnero, Borel et al. 2001). In Abbildung 6 werden die Quervernetzungen und die Angriffsstellen der Enzyme gezeigt (modifiziert nach Seibel, 2005, Seite 104). Es ist spezifisch für die Typ-I Kollagen Freisetzung aus der Haut oder dem Knochengewebe. Beim Pferd kann es durch humane Immunoassays quantifiziert werden (Kellerhouse, Brown et al. 2000) und spezieller durch einen Immunoassay, der eine trivalente Verbindung als Antigenseite trägt (Carstanjen, Hoyle et al. 2004). Damit scheint CTX-I spezifischer als der Marker CTX-MMP zu sein. Das CTX-I wird als Knochenabbaumarker mit einem kommerziell erhältlichen Immunoassay gemessen, der für Pferde validiert worden ist (Carstanjen, Hoyle et al. 2004).

Eine zirkadiane Schwankung im Bereich der Abbaumarker konnte für CTX-I nicht dargestellt werden (Jackson, Lonnell et al. 2003). Die Beeinflussung der CTX-I-Konzentration über die Mineralstoffzufuhr bei Jährlingen konnte nachgewiesen werden (Nielsen, Cate et al. 2010). Alter und CTX-I Konzentration sind invers korreliert (Carstanjen, Hoyle et al. 2004). Im Stall gehaltene Pferde zeigten eine höhere CTX-I Konzentration als Pferde, die 5 Tage pro Woche für 15 min longiert wurden (Kellerhouse, Brown et al. 2000).

Auch wenn die Abbaumarker (wie PYD) aus dem Urin über eine Chromatographie einen humanmedizinischen „Gold-Standard“ für den Nachweis darstellen, ist es beim Pferd praktisch schlecht umsetzbar, die Knochenmarker über Urinproben zu quantifizieren, da es selten gelingt, Urinproben vollständig über 24 Stunden aufzufangen ohne das Harnabsatzverhalten dabei zu beeinflussen und damit das Probenvolumen zu verändern. Deshalb eignen sich beim Pferd insbesondere Serummarker zur Untersuchung des Knochenstoffwechsels (Lepage, Hartmann et al. 1998).

3.3 Geschlechtshormone beim Hengst und deren Regulation

Im nachfolgenden Abschnitt wird die Wirkungsweise im Bereich des Knochengewebes derjenigen Geschlechtshormone erläutert, die für die Aufrechterhaltung der Reproduktionsleistung zuständig sind.

3.3.1 Geschlechtshormone

Die Geschlechtshormone lassen sich als Steroidhormone und Proteohormone in zwei Gruppen unterteilen.

3.3.1.1 Steroidhormone

Zu den Steroidhormonen gehören die Gruppe der Androgene, die Gruppe der E und die Gruppe der Gestagene. Das zu der Gruppe der Gestagene gehörende Progesteron scheint grundsätzlich eine schützende Wirkung auf die Knochenmasse durch seine Blockierung des Glukokortikoid-Rezeptors (Bar-Shavit, Kahn et al. 1984) und die Wirkung auf Progesteron-Rezeptoren auf den Osteoblasten (Wei, Leach et al. 1993) beim Menschen auszuüben. Eine systemische Wirkung ist aber beim Hengst derzeit wenig erforscht und bleibt deshalb zunächst unberücksichtigt. Bei einer Studie mit Stuten konnte der Einfluss der Hormone auf den Knochenstoffwechsel belegt werden (Jackson, Dyson et al. 2006).

3.3.1.1.1 Androgene

Als Androgene bezeichnet man die männlichen Keimdrüsenhormone, deren Hauptvertreter Testosteron (T) ist und die in den Leydigzellen (Zwischenzellen) des Hodens produziert werden.

Androgene werden außerdem in der Zona reticularis der Nebennierenrinde produziert. Die Biosynthese geht aus einem zentralen Molekül, dem Cholesterol, mit 19 C-Atomen hervor. Der Abbau der Androgene vollzieht sich in der Leber. Es entsteht Androsteron, welches als Konjugat mit Schwefelsäure oder Glukuronsäure über den Harn ausgeschieden wird (Döcke 1994).

Beim Hengst wird mehr als 95% des T von den Gonaden produziert (Bedrak und Samuels 1969). In vielen Zielgeweben wird 5α -Dihydrotestosteron (DHT) durch die 5α -Reduktase aus T überführt und bildet die Hauptquelle der Androgenaktivität. Die 5α -Reduktase existiert in zwei Isoformen (5α -Reduktase 1 und 5α -Reduktase 2). Fast das gesamte, im Körper zirkulierende DHT entspringt der Rediffusion ins Blut nach der Konversion durch die Reduktasen außerhalb der Gonaden (Vanderschueren, Vandenput et al. 2004).

Des Weiteren produzieren die Gonaden, ebenso wie die Nebennierenrinde (NNR), große Mengen von C19-Androgenen: Dihydroepiandrostenon (DHEA), DHEA-Sulfat, Delta-4-androstendion (Riggs, Khosla et al. 2002). Obwohl diese Moleküle selbst nur schwach androgen wirksam sind, sind sie eine Substratquelle für die extragonadale Produktion potenter Sexualsteroiden.

Der Hauptweg für die Eliminierung von T ist die Oxidation zu 17β -Ketosteroiden (Eyre, Bland et al. 1998).

Testosteron liegt im Plasma in freier und in gebundener Form an das Steroidhormon-binding-Globulin (SHBG) und an Albumin vor. Im Erfolgsorgan wird T zu 5α -DHT reduziert: ein sehr wirkungsvoller Metabolit. Dieses Hormon vermittelt seine Wirkung am Knochengewebe hauptsächlich über den intrazellulären Steroidrezeptor.

3.3.1.1.2 Östrogene

Neben dem Vorkommen der Androgene konnte bewiesen werden, dass auch E beim fertilen Hengst für die Gonadenfunktion eine wichtige Rolle spielen (Ganjam und Kenney 1975; Abney 1999; O'Donnell, Robertson et al. 2001). Die Gruppe der E umfasst die drei natürlichen Metabolite Östron (E_1), 17β -Östradiol (E_2) und Östriol (E_3), die alle sehr potent sind. Ihre Produktion wird durch den Aromatase-Komplex katalysiert, so dass es zur irreversiblen Konversion der Androgene zu Östrogenen kommt.

Dieses Enzym wurde in den Leydigzellen des Pferdehodens immunhistochemisch nachgewiesen (Almadhidi, Seralini et al. 1995). E_1 und E_2 konnten im Seminalplasma nachgewiesen werden (Lemazurier, Moslemi et al. 2002). Ebenso konnten große Mengen E aus dem Blutplasma beim Hengst isoliert werden (Claus, Dimmick et al. 1992).

Obwohl auch andere Reaktionswege für die Eliminierung existieren, sind die 2-Hydroxylation und die 16-Hydroxylation die Hauptwege für die Elimination der E. Während die 2-OH-Östrogene inaktiv sind oder als Antagonisten funktionieren, behalten die 16-OH-Östrogene noch eine Restaktivität (Labrie, Luu-The et al. 2000).

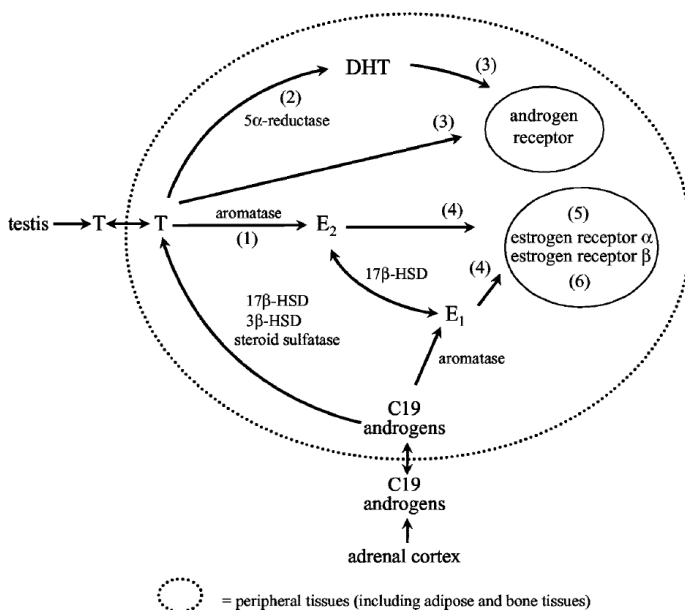


Abbildung 7: Überblick Stoffwechsel und Wirkung der Sexualsteroiden beim Mann

Die Zahlen in Klammern stehen für einzelne Inhibitoren, bestimmte Wirkungen zu blockieren:

1) Aromatase-Inhibitor, 2) 5α -Reduktase-Inhibitor, 3) Androgen-Rezeptor-Antagonist, 4) Östrogen-Rezeptor-Antagonist, 5) α ERKO-Maus und 6) β ERKO-Maus

3.3.1.2 Proteohormone

Im Säugetiergehirn wird ein spezifisches Neurohormon produziert, das auf die Adenohypophyse einwirkt und deren gonadotrope Hormonsekretion reguliert. Dieses Hormon wird als Gonadoliberin (GnRH) bezeichnet, da es vor allem die Luteinisierendes Hormon (LH)-Sekretion, aber auch in geringem Maße die Follikelstimulierendes Hormon (FSH)-Sekretion der Hypophyse stimuliert (Döcke 1994).

Unterschiede in der Freisetzung der Hormone FSH und LH gehen offensichtlich auf die Einwirkung der Gonadenhormone auf die Hypophyse zurück und sind bedingt durch die variierenden Frequenzen der GnRH-Pulse (Amann 1993).

3.3.1.2.1 Gonadoliberin

Das GnRH wird im Hypothalamus produziert und wirkt auf die Adenohypophyse sowie auf deren, die Keimdrüsen kontrollierenden Hormone ein. Es ist ein Dekapeptid mit kurzer Wirkdauer und einer Halbwertszeit von wenigen Minuten. Im Blut vorkommende Moleküle werden durch ubiquitär vorkommende Proteasen rasch inaktiviert.

Das GnRH bewirkt die Synthese und Freisetzung von LH und FSH. Nach der Kastration findet eine Steigerung der Freisetzung der Hormone von FSH und LH statt (Collingsworth, Fuller et al. 2001).

Ein geringer Anstieg der GnRH-Konzentrationen im Plasma der hypophysären Portalvenen erhöht die Anzahl der GnRH-Rezeptoren auf den gonadotropen Zellen, intensiviert die nach der Rezeptorbindung ablaufenden Prozesse und bewirkt eine randliche Anreicherung der Sekretgranula in der Zellperipherie der Hypophyse. Dies bewirkt einen verstärkten LH-Peak bei erneuter GnRH-Ausschüttung. Dieser Prozess erfordert aber die gleichzeitige Anwesenheit von E (Amann 1993). Eine Studie von Muyan et al. konnte zeigen, dass E₂ und nicht A die LH-Ausschüttung aus der Hypophyse des Hengstes bewirken. E₂ verstärkt signifikant den GnRH-induzierten-LH-Release bei Hypophysenzellen in Zellkulturen, wohingegen T und DHT keinen Effekt bewirken (Muyan, Roser et al. 1993).

3.3.1.2.2 Follikelstimulierendes Hormon

Das FSH wird in der Hypophyse gebildet, gespeichert und auf bestimmte Signale hin (GnRH, E₂) in das Blutsystem entlassen. Die Moleküle setzen sich aus zwei Untereinheiten, α -Untereinheit (α -FSH) mit 92 Aminosäuren und β -Untereinheit (β -FSH) mit 111 Aminosäuren, zusammen und haben ein Molekulargewicht von 28 kDa. Nur die β -Untereinheit ist dabei spezifisch für das FSH. Die Untereinheiten sind nicht kovalent miteinander verbunden.

Die wichtigsten Funktionen des FSHs beim Hengst sind seine Wirkungen auf die Sertolizellen. Das FSH trägt maßgeblich zur Entwicklung und Aufrechterhaltung der morphologischen Struktur des Keimdrüsenepithels bei. Es unterstützt die Sertolizellen in ihrer germinativen Funktion (Bildung und Reifung der Spermien) und induziert eine inkretorische Aktivität. Es fördert die Ausbildung des Androgen-bindenden Proteins (ABP) und des Inhibins (INH) in den Sertolizellen (Amann 1993).

Es charakterisiert sich durch seine geringe Episodik und seine, im Vergleich zu LH, längere Halbwertszeit.

Die FSH-Pulsfrequenz variiert signifikant im Verlauf einer Zuchtsaison mit einem Maximum im August und einem Minimum im Mai (Hoffman, Adams et al. 1987).

3.3.1.2.3 Luteinisierendes Hormon

Das LH besteht ebenfalls aus zwei Untereinheiten, der α -Untereinheit (α -LH) mit 92 Aminosäuren und der β -Untereinheit (β -LH) mit 121 Aminosäuren. Die β -Untereinheit ist spezifisch für das LH, während die α -Untereinheit auch in weiteren Hormonen vorkommt.

Das LH hat stimulierende Wirkung auf die Leydigischen Zwischenzellen. Es fördert die Proliferation und Differenzierung der Zellen sowie deren Produktion und Sekretion von A und E. Nach einer Kastration erhöht sich der Anteil der LH-synthetisierenden Zellen in der Hypophyse deutlich. Bei der Untersuchung von Irvine stellte sich heraus, dass die LH-Konzentration nicht durch das Alter der Hengste beeinflusst wird: Nach einem schnellen, fünf bis 14fachen Anstieg der LH-Konzentration nach der Kastration fallen die Werte nach einem

Jahr wieder ab. Sie stabilisieren sich in dem Bereich, wie er auch vor der Kastration gemessen werden konnte. Es ist sicher, dass die A über die Hypothalamus-Hypophysenachse einen negativen Feedback-Mechanismus auf die LH-Sekretion ausüben (Irvine und Alexander 1982).

Die mittlere LH-Konzentration variiert signifikant im Verlauf eines Jahres, mit einem Höhepunkt im späten April und einem niedrigen Wert im November (Hoffman, Adams et al. 1987).

3.3.1.2.4 Prolaktin

Prolaktin ist ein Proteohormon mit 199 Aminosäuren, das drei Disulfidbrücken enthält. Die Abspaltung aus einem großen Precursormolekül findet in den laktotropen Zellen der Pars distalis der Hypophyse statt. Im Blut sind die Konzentrationen beim männlichen Tier geringer als beim weiblichen. Eine Elimination erfolgt über die Nieren (Amann 1993).

Prolaktin regt die Androgensynthese im Hoden männlicher Tiere über Prolaktinrezeptoren der Leydigzellen an. Die Ausbildung dieser Rezeptoren wird durch T und DHT gefördert. Der Hypothalamus scheint einen hemmenden Einfluss auf die Prolaktinfreisetzung zu haben (Roser 2008).

Eine Korrelation zwischen Tageslänge und der Plasma-Prolaktin-Konzentration besteht, wird aber durch eine Kastration nicht beeinflusst (Collingsworth, Fuller et al. 2001).

Die Photoperiode beeinflusst die Prolaktinsekretion durch die Beeinflussung der Sekretion des Melatonins. Vorläufige Ergebnisse lassen vermuten, dass die Effekte von Melatonin auf die Prolaktin- und die Gonadotropinsekretion über eine gemeinsame Zielregion vermittelt werden und dass Unterschiede in der Antwort auf die Photoperiode sich aus Unterschieden in der Prozessierung des Melatoninsignals ergeben (Curlewis 1992).

3.3.1.2.5 Inhibin

Das glykosylierte Proteohormon Inhibin (INH) besitzt eine Masse von 58 kDa und ist aus mehreren Untereinheiten (α - und β -Untereinheit) als Dimer zusammengesetzt. Jedem Dimer wird eine eigene, spezielle Wirkung zugeschrieben (Döcke 1994).

Der Hoden des Hengstes produziert große Mengen bioaktiven INHs und setzt sie pulsatil frei. Die α - und β -Untereinheiten konnten in den Leydigzellen nachgewiesen werden (Nagata, Miyake et al. 1998).

Die Hauptwirkungen des INHs bestehen in der Hemmung der Gonadotropine auf der Ebene der Hypophyse und der Steigerung der T-Sekretion. Dabei werden insbesondere die Biosynthese und damit auch die Freisetzung von FSH in der Hypophyse gehemmt.

Es besteht ein Synergismus mit der Freisetzung der E, denn der saisonabhängige Wechsel des zirkulierenden Inhibins zeigt eine deutliche Korrelation zum E_2 .

Zudem gibt es einen saisonalen Zyklus der peripheren INH-Konzentration im Serum (Nagata, Miyake et al. 1998). Diese Werte zirkulierenden INHs reflektieren die Testikelfunktion (Roser, McCue et al. 1994).

3.3.2 Hormonale Steuerung der Gonadenfunktion beim fertilen Hengst

Beim Hengst ist die normale testikuläre Funktion von einer funktionierenden Zirbeldrüse und einer funktionierenden Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse abhängig (Roser 2008).

Die testikuläre Funktion ist dabei einer Saisonalität unterworfen. Durch die Zirbeldrüse wird durch Photoinduktion Melatonin ausgeschüttet, welches die GnRH-Produktion hemmt (Malpaux, Migaud et al. 2001). Während der Zuchtsaison ist die Melatoninproduktion niedrig und somit die GnRH-Freisetzung zur Förderung der optimalen Testikelfunktion und der Spermienausschüttung am größten.

Das GnRH stimuliert in der Adenohypophyse die Sekretion des LHs und FSHs, die nach ihrem Transport durch das Blut auf die Gonaden wirken. Das LH stimuliert die T-Ausschüttung aus den Leydigzellen im Hoden. FSH induziert die Bildung von ABP in den Sertolizellen der Tubuli seminiferi contorti und nimmt maßgeblichen Einfluss auf die Spermatogenese. Dabei wird es von T unterstützt.

Die testikulären Hormone E und T werden neben parakriner und autokriner Sekretion auch in den Blutkreislauf abgegeben und wirken über einen negativen Feedback-Mechanismus auf den Hypothalamus und die Hirnanhangsdrüse.

Testosteron verhindert die GnRH-Sekretion, hat aber keine Wirkung auf die LH-Abgabe auf der Ebene der Hypophyse. Seine Rolle bei der Regulation des FSHs auf der Ebene der Hypophyse ist unklar.

Des Weiteren produzieren die Sertolizellen INH, welches eine weitere FSH-Sekretion hemmt (Carroll, Kowash et al. 1991).

Aktivin (ACT) moduliert positiv die Freisetzung des FSHs auf der Ebene der Hypophyse bei anderen Spezies, seine Wirkung beim Hengst ist nicht nachgewiesen (Roser 2008).

Prolaktin (Zachmann 1992; Frasor und Gibori 2003), Schilddrüsenhormone (Cooke, Holsberger et al. 2004) und Wachstumshormone (Zachmann 1992) beeinflussen bei anderen Tierarten maßgeblich die Testikelfunktion.

Endogene Opiode regulieren ebenfalls die GnRH-Sekretion. Beim Pferd werden saisonale Veränderungen der GnRH- und LH-Freisetzung teilweise durch Opiode reguliert (Gerlach und Aurich 2000). Die Opiode funktionieren als Neurotransmitter und unterdrücken das GnRH-Release während der Wintermonate. In den Wintermonaten kann dieser Mechanismus beim Hengst mit Naloxon beeinflusst werden, so dass ein LH-Anstieg im Serum zu verfolgen ist. Beim Wallach ist keine medikamentöse Beeinflussung möglich (Aurich, Sieme et al. 1994).

3.3.3 Hormonelle Konsequenzen nach der Kastration

Die Kastration eines erwachsenen männlichen Säugetiers ist grundsätzlich mit dem deutlichen Anstieg der Gonadotropine im Blutplasma charakterisiert. Dieser Anstieg der Sekretionsleistung der Hypophyse ist verbunden mit dem ausbleibenden negativen Feedback, der durch T und zu gewissen Anteilen von E vermittelt wird (Thompson, Pickett et al. 1979).

Testosteron wird schnell aus der peripheren Zirkulation bei kastrierten Hengsten eliminiert. Die T-Werte sinken innerhalb von 3 bis 6 Stunden auf 25% des Ausgangswertes und sind nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar (Cox, Williams et al. 1973).

Die Plasmakonzentrationen von LH und von FSH steigen nach der Kastration deutlich über die Werte der fertilen Hengste während der Zuchtsaison an. Offensichtlich führen der fehlende, negative Feedback-Mechanismus zu einer maximalen GnRH-Ausschüttung und dies zu einer Entspeicherung des maximal gespeicherten LHs mit einem transienten Peak am dritten Tag. Eine GnRH-Hypersekretion bleibt nach der Kastration lebenslang bestehen und kann nur durch die Applikation von Sexualsteroiden beeinflusst werden (Thompson, Pickett et al. 1979; Tilbrook, de Kretser et al. 1991).

Das FSH wird offensichtlich nicht in der Hypophyse gespeichert; deshalb kommt es zu einem ähnlich ansteigenden Kurvenverlauf mit einem Peak nach wenigen Tagen, der aber bald schon wieder normale Werte erreicht. Die Plasma-Prolaktin-Konzentrationen ändern sich mit der Zeit, aber es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollhengsten und den Kastraten gezeigt werden (Collingsworth, Fuller et al. 2001).

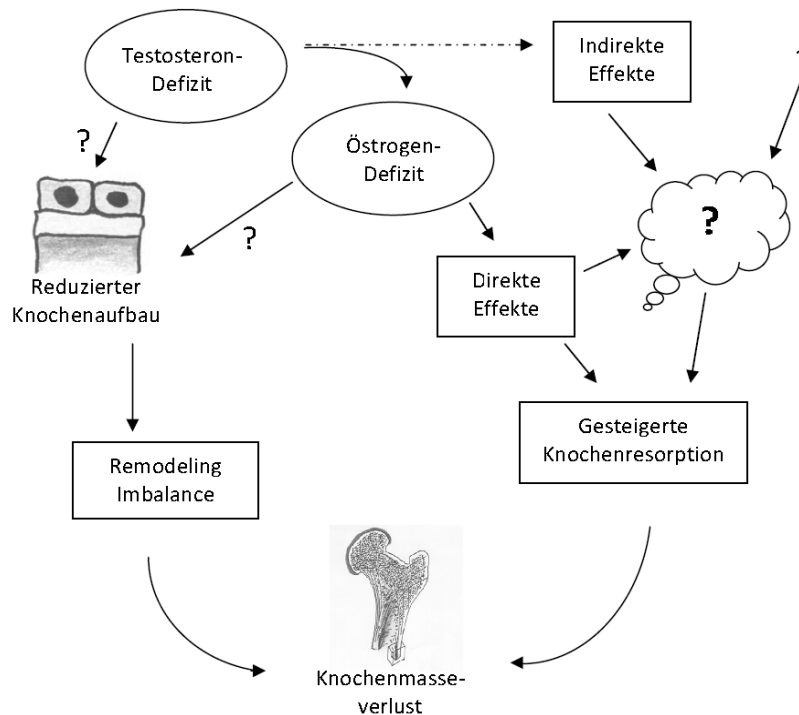


Abbildung 8: Darstellung des universellen Modells für Knochenschwund beim Mann. Durch direkte und indirekte Effekte wird die Knochenresorption gesteigert und der Knochenaufbau reduziert. Die Fragezeichen stehen für unbekannte Wege zum Effektor und zeigen bisher nicht berücksichtigte Größen (Modifiziert nach Riggs, Khosla et al. 1998, Abbildung 4, Seite 769).

3.4 Einfluss der Steroidhormone auf den Knochenstoffwechsel

Innerhalb der letzten 30 Jahre konnten im Rahmen der Osteoporoseforschung beim Menschen weite Erkenntnisse darüber erlangt werden, inwieweit die Sexualsteroiden maßgeblichen Einfluss auf die Funktion der knochenstoffwechselassoziierten Zellen und auf extraskelettale Faktoren haben. Im Jahr 1998 wurde ein einheitliches Modell zum Verständnis der Osteoporose beim Mann und der Frau publiziert (Riggs, Khosla et al. 1998). Die schematische Abbildung 8 fasst die nachfolgend aufgeführte Problematik der wegfallenden Steroidhormone zusammen.

3.4.1 Physiologische Effekte der Östrogene

Östrogene üben am Skelett spezifische Funktionen auf Organ-, Gewebe- und Zellebene aus: Auf der Organebene bedingen sie als Hauptfaktoren neben dem Einwirken biomechanischer Kräfte die Erhaltung der Knochenmasse. Abgesehen von beispielsweise Kortikosteroidüberschuss erfährt der Knochen keinen Abbau, solange keine der genannten Homöostasen verschoben wird.

Auf der Gewebeebene unterdrücken E tonisch den Knochenstoffwechsel. Balancierte Raten des Knochenaufbaus und des Knochenabbaus werden erhalten.

Auf zellulärer Ebene beeinflussen sie die Generation, Lebensspanne und funktionale Aktivität sowohl von Osteoblasten als auch von Osteoklasten. Sie reduzieren zudem die Osteoklastenneubildungsrate und deren Aktivität (Manolagas 2000). Durch gesteigerte Apoptose wird die Lebensspanne der Osteoklasten verkürzt (Hughes, Dai et al. 1996).

Bei der Wirkung der E auf Osteoblasten gibt es jedoch eine Kontroverse. Obwohl die Resultate bei verschiedenen Modellen variieren, lassen einige Untersuchungsergebnisse vermuten, dass durch E die Osteoblastenbildung ansteigt sowie die Differenzierung, Proliferation und Funktion der Zellen aktiviert werden. Es konnte gezeigt werden, dass E die

durch Glukokortikoide induzierte Apoptose der Osteoblasten antagonisieren und ihre Lebensspanne verlängern konnte (Gu, Hentunen et al. 2005).

Ein E-Defizit beeinträchtigt das Remodeling auf verschiedene Arten: Zunächst wird die Rate der Aktivierungsfrequenz der BMUs gesteigert, was zu einem vermehrten Knochenstoffwechsel führt. Durch eine Verlängerung der Resorptionsphase und eine verkürzte Aufbauphase wird eine Imbalance des Knochenremodelings geschaffen: Durch den E-Wegfall wird bei den Osteoklasten die Resorption gesteigert, weil die Apoptose verzögert wird. Im Gegensatz dazu wird die Osteoblasten-Apoptose früh eingeleitet, da E hier eine konservierende Wirkung haben. Durch eine gesteigerte Osteoklasten-Rekrutierung vergrößert sich die Progression der BMUs, wodurch wiederum eine vergrößerte Resorptionslücke entsteht, die die Osteoblasten durch ihre reduzierte Kapazität nicht mehr aufzufüllen vermögen (Eriksen, Langdahl et al. 1999).

Im Schaftknochen bewirkt eine verlängerte Lebensspanne der Osteoklasten eine größere Resorptionstiefe, was zu Trabekelplattenperforationen und zu einer Reduktion der Trabekelvernetzung führt. Im Schaftknochen ist die schnellere Phase des Knochenverlustes mit subendokortikalen Aushöhlungen assoziiert und in einigen Fällen gleicht sich das innere Drittel der Cortex der Bälkchenstruktur an. Die Konsequenz aus dieser perforativen Resorption des Schaftknochens zeigt sich in einer Ausdünnung der Trabekel.

Bei der Osteoporose wird im Gegensatz zur Osteoklasten-vermittelten, schnellen Abbauphase der Spongiosa die nachfolgende langsame Phase durch Ausdünnung der Trabekel gekennzeichnet, für die eine beeinträchtigte Osteoblastenfunktion als Hauptgrund anzuführen ist.

Bei der Stute wurden Untersuchungen durchgeführt, die den Zyklus in Verbindung zum Knochenstoffwechsel untersucht haben. Durch Progesteronmessung wurde der Zyklusstand bestimmt und in Verbindung mit den Knochenaufbaumarkern OC und PICP und den Abbaumarker CTX-MMP beleuchtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass Stuten zum Zeitpunkt der Lutealphase eine signifikant erhöhte Konzentration an OC und CTX-MMP aufwiesen. Somit übt der Interöstrus beim Pferd auch Einfluss auf den Knochenstoffwechsel aus (Jackson, Dyson et al. 2006).

3.4.2 Physiologische Effekte der Androgene

Genau wie bei den E bestehen auf der Gewebeebene die Hauptwirkungen des Ts und seiner Metabolite darin, die Knochenresorption zu reduzieren (Bellido, Jilka et al. 1995). Ein Großteil dieser Wirkung wird dabei durch Aromatisierung von T zu E_2 und von Androstendion zu E_1 vermittelt (Falahati-Nini, Riggs et al. 2000).

Genau wie E_1 und seine Metabolite verändert T die Lebensspanne der Osteoklasten und Osteoblasten durch Beeinflussung der Apoptose. Zudem hat T einen milden, steigernden Effekt auf die Osteoblastenproliferation. Beide Effekte (Stimulation der Proliferation und Verhinderung der Apoptose) tragen dazu bei, den Knochenaufbau zu verstärken. Im Gegensatz zu E kommt eine unterschiedliche Wirkung aber deshalb zu Stande, weil T an einer anderen Stufe der Osteoblastendifferenzierung angreift. Die E und T beeinflussen die Osteoblasten an verschiedenen Lokalisationen des Skeletts. Während T das appositionelle, periostale Wachstum beschleunigt (Wakley, Schutte et al. 1991), wirkt beispielsweise E_1 diesem entgegen (Turner, Colvard et al. 1990). Diese unterschiedlichen Effekte bedingen das größere Skelett, das von männlichen Individuen während der Pubertät ausgeprägt wird.

3.4.3 Transduktion durch Sexualsteroid-Rezeptoren

Bis zum Jahr 1988 ging man davon aus, dass Sexualsteroidoide das Skelett nur indirekt durch eine Regulierung der Sekretion systemischer kalziotropher Hormone beeinflussen.

Seitdem ist sicher bestätigt, dass Osteoblasten (Eriksen, Colvard et al. 1988; Komm, Terpening et al. 1988), Osteoklasten (Oursler, Osdoby et al. 1991; Oursler, Pederson et al. 1994) und Osteozyten (Oursler, Osdoby et al. 1991; Oursler, Pederson et al. 1994; Tomkinson, Gevers et al. 1998; Braidman, Baris et al. 2000) funktionelle Östrogenrezeptoren (ER) enthalten, obgleich ihre Konzentration geringer ist als im Reproduktionsgewebe.

In Ergänzung zum klassischen ER- α , wurde ein genetisch unterschiedlicher, zweiter ER- β entdeckt, der eine weitgehende Homologie mit dem Liganden und der DNA-bindenden Domäne des ER- α aufweist (Kuiper, Enmark et al. 1996).

ER- α und ER- β -Heterodimere werden ebenfalls beschrieben (Barkhem, Carlsson et al. 1998; Hall und McDonnell 1999).

Der ER- α vermittelt die Hauptwirkung des E₁ auf die Knochenzellen, wohingegen ER- β in einigen Umständen als ein dominant negativer Antagonist von ER- α wirken kann (Bord, Horner et al. 2001). Knochenzellen enthalten beide Rezeptoren, wobei ihre Verteilung innerhalb des Knochens differiert. Anhand immunhistologischer Studien über sich entwickelnde, humane Knochenzellen konnte gezeigt werden, dass der ER- α vorwiegend in kortikalen Zellen vorkommt, wohingegen in spongiösem Knochen überwiegend ER- β zu finden ist.

Die Variation in der Sequenz der Expression von ER- α und ER- β während der Osteoblastendifferenzierung kann auf Entwicklungsunterschiede in der Expression der ER-abhängigen Gene zurückgeführt werden. In fetalen menschlichen Osteoblasten ist ER- α -mRNA nur dreifach erhöht, während ER- β -mRNA um das 20fache erhöht ist und exponentiell bei der Osteoblastendifferenzierung steigt (Arts, Kuiper et al. 1997).

Chondrozyten in der Wachstumsfuge enthalten ebenfalls beide Rezeptortypen (Nilsson, Boman et al. 1999; Weise, De-Levi et al. 2001).

Osteoklasten (Pederson, Kremer et al. 1999) und Osteoblasten (Colvard, Eriksen et al. 1989) enthalten zudem hoch-affine Androgenrezeptoren (AR).

Die Knochenzellen des Pferdes sind diesbezüglich bisher nicht untersucht und bisher als Modell nicht berücksichtigt worden. Aus dem Phänotyp der Skelette der ER- α -knockout-Maus (α ERKO) (Couse und Korach 1999), ER- β -knockout-Maus (β ERKO) (Vidal, Lindberg et al. 2000) und double-knockout-Maus (DERKO) (Vidal, Lindberg et al. 2000) lässt sich aber viel über die einzelnen Wirkungen ableiten. Die Ergebnisse konnten jedoch nicht komplett auf den Menschen übertragen werden: α ERKO- und DERKO-Mäuse weisen verkürzte Femur-Längen auf (Vidal, Kindblom et al. 1999), wohingegen Mädchen mit E-Defizit (und ein Fall bei einem Mann mit homozygoter Null-Mutation für das ER- α Gen) durch einen verzögerten Schluss der Epiphysenfugen verlängerte Gliedmaßenknochen erlangen (Couse und Korach 1999). α ERKO- und DERKO-Mäuse zeigen ein reduziertes, appendikuläres Knochenwachstum, das mit einem niedrigen Insulin Growth Factor I (IGF-I)-Level assoziiert ist und möglicherweise genau dadurch verursacht wird und bei Männern deutlicher ausfällt, als bei Frauen (Vidal, Lindberg et al. 1999). Die α ERKO-Mäuse weisen kortikale Osteopenie und beschleunigten Knochenstoffwechsel auf, der beim männlichen Tier größer ist als beim weiblichen Tier. Im Gegensatz dazu haben β ERKO-Mäuse einen mit männlichen Wildtyp-Mäusen vergleichbaren skelettalen Phänotyp. Die β ERKO-Weibchen haben einen verstärkten kortikalen Knochen, assoziiert mit gesteigertem, periostalem Wachstum, das sich während des Längenwachstums einstellt und beim Adulten erhalten wird (Windahl, Hollberg et al. 2001).

Die erwachsenen β ERKO-Weibchen sind gegen altersbedingten Knochenschwund der Spongiosa geschützt, der hingegen bei Wildtyp-Mäusen bereits nach der Kastration auftritt. Obwohl die Weite der Wachstumsfuge unbeeinträchtigt ist, gibt es histologische Hinweise auf einen reduzierten Knochenaufbau und -abbau (Sims, Dupont et al. 2002). Die DERKO-Weibchen unterlaufen nach der Kastration dem gleichen Grad des Bälkchen-Knochenschwundes, wie weibliche Wildtypmäuse nach Ovariectomie. Dieser Knochenschwund kann durch E-Therapie aufgehalten werden, jedoch im Vergleich zum Wildtyp mit einer fünffach höheren Dosis (Sims, Dupont et al. 2002). Dieser Umstand kann durch eine persistente Spleißvariante des ER α bei der DERKO-Maus oder durch einen geschlechtsunspezifischen, nicht-genomischen Mechanismus mit Bezug zum AR erklärbar sein (Kousteni, Bellido et al. 2001).

Obwohl bei diesen Beobachtungen der exakte Mechanismus nicht geklärt wird, können doch sichere Aussagen getroffen werden:

Das E-abhängige Knochenwachstum wird größtenteils durch den ER- α vermittelt, da das Wachstum bei α ERKO-Mäusen und DERKO-Mäusen, aber nicht bei β ERKO-Mäusen

beeinträchtigt ist. Der ER- β spielt zumindest beim sexuellen Dimorphismus eine Rolle, da β ERKO-Weibchen, im Gegensatz zu β ERKO-Männchen, längere kortikale Knochen als die Wildtyp-Weibchen haben. Hinzu kommt, dass ein Jahr alte β ERKO-Weibchen mehr Kanälchenknochen ausgebildet haben als die Wildtyp-Weibchen. Der ER- β könnte, möglicherweise durch Stimulation der Knochenresorption im Bereich der Kanälchen und des Endostiums oder durch Hemmung eines stimulierenden Effekts von ER- α auf die Knochenbildung, den altersbedingten Knochenschwund bei Frauen zulassen. Alternativ kann die Deletion von ER- β zu einer erhöhten Sensitivität des Knochens für ER- α oder zu einer verstärkten Wirkung von E führen, trotz altersbedingtem Abfall des Serum-E-Levels.

Die testikulär-feminisierte Ratte (TFR) hat eine spontane homozygote Nullmutation des AR-Gens, woraus eine Androgenresistenz folgt (Vanderschueren, Van Herck et al. 1993). Diese Tiere zeigen einen weiblichen Phänotyp des Skeletts, sind aber nicht osteoporotisch.

Die Aromatase-knockout-Maus (ArKO) zeigt auf Grund der angepeilten Deletion des CYP19-Aromatasegens ein E-Defizit. Beide ArKO-Geschlechter werden osteoporotisch. Sowohl durch Histomorphometrie, als auch durch Messung der OC-Werte im Serum stellte sich heraus, dass die Weibchen einen hohen Knochenstoffwechselumsatz haben, während die Männchen nur einen niedrigen Stoffwechselumsatz ausprägen (Oz, Zerwekh et al. 2000). Die Erklärung dafür ist derzeit nicht klar. In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die Wirkungen der einzelnen Rezeptoren für eine bessere Übersichtlichkeit herausgearbeitet.

Tabelle 1: Übersicht zu Vorkommen, Wirkung und Phänotyp bei Deletion der Rezeptortypen ER- α : Östrogenrezeptor α , ER- β : Östrogenrezeptor β , AR: Androgenrezeptor, E: Östrogen, IGF: Insulin Growth Factor, ArKO: Aromatase knockout Maus, ♀: weibliche Individuen, ♂: männliche Individuen

Rezeptor:	Vorkommen:	Wirkung:	Phänotyp bei Deletion:
ER- α	hauptsächlich auf kortikalen Zellen des Knochens	<ul style="list-style-type: none"> • Hauptwirkung des E-abhängigen Knochenwachstums • Reduziertes. appendikuläres Wachstum (niedriger IGF-Level, bei ♂ > ♀) • beschleunigter Knochenstoffwechsel(♂ > ♀) 	<ul style="list-style-type: none"> • Verkürzte Femurlängen (Maus) vs. verzögerter Epiphysenfugenschluss (Mensch) • kortikale Osteopenie
ER- β	hauptsächlich auf spongiösen Zellen des Knochens	<ul style="list-style-type: none"> • Dominant rezessiver Antagonist von ER-α • Hemmung eines stimulatorischen Effekts von ER-α auf die Knochenbildung • reduzierter Knochenauf und -abbau • verringerte Sensitivität des Knochens für ER-α • führen zu einer verringerten Wirkung von E 	<ul style="list-style-type: none"> • skelettaler Phänotyp wie ♂ • ♀ verstärkter kortikaler Knochen mit gesteigertem, periostalem Wachstum • ♀ geschützt gegen altersbedingten Knochenschwund der Spongiosa • ♀ mehr Kanälchenknochen
keine ER	siehe oben	<ul style="list-style-type: none"> • E-Therapie kann in fünffach erhöhter Dosis vor Knochenschwund schützen 	<ul style="list-style-type: none"> • Verkürzte Femurlängen • Reduziertes appendikuläres Wachstum (niedriger IGF-Level bei ♂ > ♀) • Grad des Bälkchen-Knochenschwundes, wie bei kastrierten, weiblichen Wildtypmäusen
AR	Rezeptoren auf Osteoblasten und Osteoklasten	<ul style="list-style-type: none"> • Beide ArKO-Geschlechter werden osteoporotisch 	<ul style="list-style-type: none"> • Bei ♀ höherer Knochengrundumsatz als bei ♂
kein AR	siehe oben	<ul style="list-style-type: none"> • nicht osteoporotisch 	<ul style="list-style-type: none"> • ♀-Phänotyp der ♂

3.4.4 Molekulare Mediatoren der Sexualsteroidwirkung bei Knochenzellen

Innerhalb der letzten Jahre konnten Einblicke in die molekularen Mechanismen der E-Wirkung auf Knochenzellen erlangt werden. Viele Studien fokussierten sich auf die Rolle des E-Defizits, welches einen Anstieg der Produktion der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 1 (IL-1), IL-6, Transforming Growth Factor α (TNF α), Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor (GM-CSF-Faktor), M-CSF und PGE₂ verursacht.

Diese Zytokine beschleunigen die Knochenresorption durch eine Vergrößerung des Pools der Präosteoklasten im Knochenmark (Pacifci 1996; Manolagas 2000; Riggs 2000). Ein durch Ovariectomie bedingter Anstieg der Osteoklastogeneserate wurde abgeschwächt oder aufgehoben durch Manipulationen, die die Synthese von IL-1, IL-6, TNF α und PGE₂ beeinflussten (Kawaguchi, Pilbeam et al. 1995). E steigert die Expression von TNF- β , einem Inhibitor der Knochenresorption, der direkt an den Osteoklasten wirkt (Oursler, Cortese et al. 1991), deren Aktivität vermindert (Hughes, Dai et al. 1996) und die Rate der Apoptose der Osteoblasten senkt (Manolagas 2000).

Die E-regulierte Knochenresorption musste jedoch nach der Entdeckung dreier neuer Mitglieder der TNF-Liganden und der Rezeptor-Signal-Familie, welche die endgültigen Effektoren der Osteoklastenfunktion und deren Differenzierung sind, erneut untersucht und die seinerzeitig gültigen Kaskaden müssen diesbezüglich aktualisiert und überprüft werden (Suda, Takahashi et al. 1999; Hofbauer, Khosla et al. 2000). Wie bei den Osteoblasten schon erwähnt, wurde der Faktor, der von den Osteoblasten ausgeht und parakrin direkt auf die Osteoklastendifferenzierung wirkt, als RANKL identifiziert, welcher von Osteoblasten-Zelllinien exprimiert wird. Zell-Zell-Kontakte zwischen den Osteoblasten und der Osteoklasten-Zelllinie erlauben RANKL, an den Membranrezeptor RANK zu binden, der sehr potent alle Aspekte der Osteoklastenfunktion stimuliert. In Folge dessen wird die Osteoklastendifferenzierung und Aktivität gesteigert und die Apoptose der Zellen vermindert. RANKL ist ausreichend und vor allem notwendig für die Formierung der Osteoklasten, vorausgesetzt, dass gewisse Konzentrationen von M-CSF vorhanden sind.

Die stromale Osteoblasten-Zelllinie sezerniert ebenfalls OPG, einen löslichen Köder-Rezeptor, der RANKL neutralisiert. Die E steigern die Rate von OPG (Hofbauer, Khosla et al. 1999) und senkt die Rate von M-CSF (Kimple, Srivastava et al. 1996) und RANK (Shevde, Bendixen et al. 2000). Teile dieses Effekts werden indirekt durch E-stimulierte Intermediate auf das Signalsystem übertragen. Interleukin 1 und TNF- α steigern RANKL, OPG und M-CSF, wohingegen PGE₂ nur RANKL steigert, dafür aber OPG absenkt.

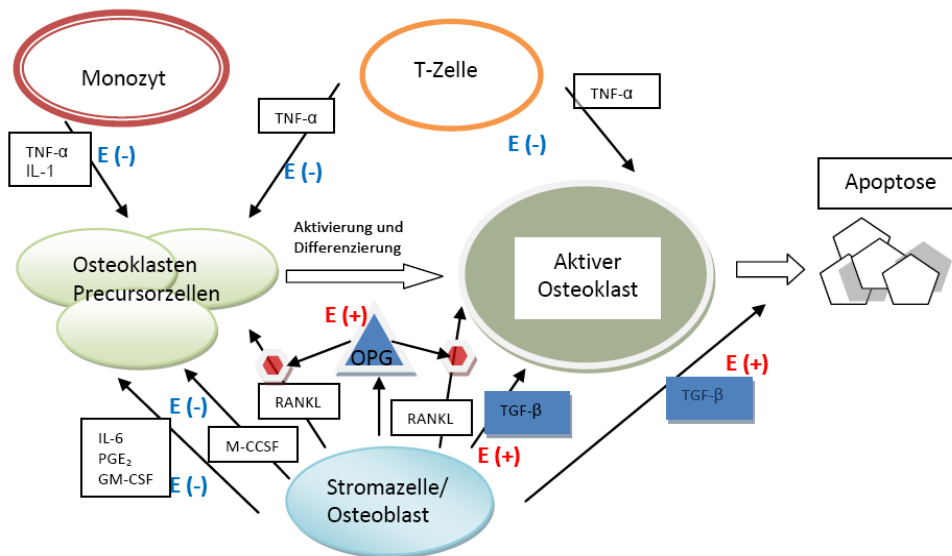
Bisher konnte nicht gezeigt werden, dass E direkt auf RANK oder RANKL wirken. Die E blockieren die Aktivität der Jun-NH₂-terminalen Kinase und die daraus resultierende Produktion von c-Jun und JunD in den Osteoklasten-Zelllinien (Srivastava, Weitzmann et al. 1999; Shevde, Bendixen et al. 2000). Zudem senken E durch die Beeinflussung kleiner, aber kumulativer Änderungen von vielen E-abhängigen und regulierenden Faktoren die Knochenresorption.

Über die molekularen Mechanismen der Androgenwirkung auf Knochenzellen ist weniger bekannt. Es stimuliert die Osteoblastenproliferation (Kasperk, Wergedal et al. 1989) und die Osteoblastendifferenzierung (Kasperk, Fitzsimmons et al. 1990; Benz, Haussler et al. 1991) in primären und transformierten Osteoblasten-Zelllinien.

Letztendlich ist IGF-I einer der parakrinen Mediatoren dieser anabolen Effekte. 5 α -DHT lässt die IGF-I-mRNA bei osteoblastischen Zellen um das Sechsfache ansteigen. Die Induktion der Osteoblastenproliferation durch 5 α -DHT kann durch einen neutralisierenden Antikörper zu IGF-I blockiert werden (Gori, Hofbauer et al. 1999). Das 5 α -DHT lässt ebenfalls die Anzahl von IGF-II-Rezeptoren ansteigen, wodurch die mitogenen Effekte der Osteoblasten von IGF-II potenziert werden (Kasperk, Fitzsimmons et al. 1990).

Androgen steigert sowohl die TNF- β -Produktion als auch die Aktivität der Osteoblasten. Eine Kastration bedingt einen Abfall aller drei β -Isoformen um 80% (Kasperk, Fitzsimmons et al. 1990; Gill, Turner et al. 1998).

Abbildung 9: Modell für die Vermittlung der Effekte der Östrogene und Testosteron
 Stimulierende Faktoren werden durch die weißen Felder und inhibierende Faktoren durch die blauen Felder angezeigt. Positive oder negative Wirkung wird durch (+) oder (-) und dem entsprechenden Buchstaben für Testosteron (T) und Östrogen (E) angegeben.



Die A-Effekte zur Verhinderung der Knochenresorption werden zumindest zum Teil durch eine herabgesetzte IL-6-Produktion vermittelt, denn 5 α -DHT unterdrückt die konstitutive und Zytokin-stimulierte IL-6-Produktion bei Maus-Stammzellen des Knochenmarks (Falahati-Nini, Riggs et al. 2000) und in menschlichen Osteoblastenzellen (Yallampalli, Osuamkpe et al. 1993). Diese Hemmung ist quantitativ sehr ähnlich mit der durch E erreichten Hemmung.

Androgen senkt bei menschlichen Osteoblastenzellen in vitro und beim Mann in vivo die OPG-Produktion (Khosla, Atkinson et al. 2002), während sie durch E gesteigert wird (Khosla, Atkinson et al. 2002). Diese Tatsache erklärt zumindest teilweise, warum die anti-resorptive Wirkung von T schwächer ist als die von E.

Kousteni berichtet, dass die anti-apoptotischen Effekte von E und T auf Osteoblasten und Osteozyten durch einen nicht-genomischen, schnellen und geschlechtsunspezifischen Mechanismus durch die Ligandenbindungsdomäne von ER- α , ER- β und AR vermittelt werden (Kousteni, Bellido et al. 2001). Diese Wirkung unterscheidet sich zu den klassischen Wirkungsweisen der Rezeptoren, welche geschlechtsspezifisch, genomisch und transkriptional arbeiten. Abbildung 9 illustriert in einer Übersicht die vielfältigen Wechselwirkungen der Mediatoren zueinander (nach Riggs (2000), Figur 1, Seite 1201, modifiziert). Derzeit ist sowohl die autokrine als auch die parakrine Basis der Wirkungsweise der Geschlechtshormone auf die Knochenzellen mehr in den Fokus der Betrachtung gerückt.

3.4.5 Einfluss des Östrogendefizits auf die Adaptationsfähigkeit des Knochengewebes

Die Spannungen und Kräfte, die auf das Knochengewebe wirken, führen normalerweise zu einer Reizantwort der Knochenzellen und einer Neuausrichtung der Knochen-Mikroarchitektur und einer Massenzunahme entsprechend der Belastungen (Mechano-Stat-System). Dies führt wiederum zu einer Adaptation, so dass der Knochen den angreifenden Kräften gut widerstehen kann. Dieser Effekt verschwindet nach der Menopause.

In einer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass der adaptive Effekt, der aus einer Kräfteinwirkung auf das Knochengewebe erfolgt, bei der Abwesenheit der ER- α in vivo und in vitro weniger effektiv ist als bei Anwesenheit des ER- α , und dass Osteoblasten-Precursorzellen den ER- α benötigen, um nach Kräfteinwirkung zu proliferieren. Östrogene sind somit ein bedeutendes Stellglied bei der Beeinflussung der Aktivität der Knochenzellen (Lee, Jessop et al. 2003).

Unter dem Einfluss von E bildet sich bei gleichmäßiger mechanischer Belastung ein Steady State des Knochenumsatzes aus. Der Einfluss Es fällt in der Menopause weg, so dass das Belastungssignal nur noch schwach auf den Knochen und sein Mechano-Stat-System wirken kann. Es wird Knochenabbau gefördert. Nach der Reduktion der Knochenmasse wird ein neues Gleichgewicht eingestellt, das durch die mechanischen Belastungen annähernd stabil gehalten wird.

4 Eigene Untersuchungen

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Versuchsziel

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss der Kastration auf den Knochenstoffwechsel bei zwei- und dreijährigen Hengsten und bei Hengsten, die älter als 6 Jahre waren, zu untersuchen. Dabei sollte sowohl eine Gegenüberstellung gleichaltriger Hengste und Kastraten erfolgen. Außerdem sollte eine Altersabhängigkeit der verwendeten Untersuchungsparameter mit betrachtet werden. Um den Einfluss der Kastration hinreichend darzustellen, wurden über einen Zeitraum von 9¹/₂ Monaten die einzelnen Konzentrationen der Knochenstoffwechselmarker BALP, OC und CTX-I sowie der Steroidhormone E₂ als Vertreter der E und T als Vertreter der Androgene im Blut untersucht.

Dafür wurde die Studie gemäß §10 des TierSchG der Regierung von Oberbayern und dem Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt angezeigt und für Bayern unter dem Geschäftszeichen 55.2-1-54-2531.3-43-08 und für Sachsen-Anhalt unter dem Aktenzeichen 203.h-42502-3-550 FUB zur Kenntnis genommen.

4.1.2 Gruppeneinteilung Hengste

Insgesamt wurden vier Populationen aus dem Landgestüt Sachsen-Anhalt (Prussendorf, Zörbig) und dem Landgestüt Bayern (Schwaiganger, Ohlstadt) in die Untersuchung mit einbezogen.

4.1.2.1 Kastratengruppen

Im Anschluss an den 70-Tage-Test wurden in Prussendorf neun dreijährige Hengste kastriert, die als Probanden in die Studie mit einbezogen wurden.

In Schwaiganger wurde eine Gruppe mit neun zweijährigen Hengsten kastriert. Die Tiere wurden gemäß ihrer späteren Verwendung und dem Alter in nachfolgend aufgeführten Gruppen eingeteilt.

Tabelle 2: Nummer und Geburtsmonat der Probanden aus Feld A
Zweijährige Hengste aus Schwaiganger (n=9).

Probanden- nummer	Geburtsmonat
12	Mai 2006
18	Mai 2006
23	April 2006
24	April 2006
26	April 2006
27	Juni 2006
29	Mai 2006
30	März 2006
31	Mai 2006

Tabelle 3: Nummer und Geburtsmonat der Probanden aus Feld B
Dreijährige Hengste aus Prussendorf (n=9).

Probanden- nummer	Geburtsmonat
32	Februar 2005
33	Januar 2005
34	April 2005
35	Mai 2005
36	März 2005
37	März 2005
38	Juni 2005
39	Februar 2005
40	März 2005

4.1.2.2 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe wurden 11 weitere Hengste aus Schwaiganger in die folgende Gruppe eingeteilt:

Tabelle 4: Nummer und Geburtsmonat der Probanden aus Feld C
Zweijährige Hengste aus Schwaiganger (n=11).

Probanden- nummer	Geburtsmonat
13	Mai 2006
14	Februar 2006
15	März 2006
16	April 2006
17	Mai 2006
19	April 2006
20	März 2006
21	März 2006
22	Februar 2006
25	März 2006
28	Mai 2006

Die Gruppe in Feld C wurde als Kontrollgruppe zu Feld A beprobt, da sie den gleichen Umwelteinflüssen unterlag und somit direkt mit ihr verglichen werden konnte.

4.1.2.3 Althengste

Zusätzlich wurden 10 weitere Hengste aus Schwaiganger, die älter als 6 Jahre waren, in eine weitere Gruppe eingeteilt. Diese Gruppe sollte als Kontrollgruppe für kastrierte und ausgewachsene Althengste dienen und als allgemeine Übersicht im Vergleich zu Feld A und B. Die Hengste wurden im gleichen Rhythmus wie Feld A beprobt. Probandennummer 7 wurde nicht vergeben. Zu diesen Probanden konnte keine repräsentative Kontrollgruppe gefunden werden, die kastriert wurde.

Tabelle 5: Nummer und Geburtsmonat der Probanden aus Feld D
 Alter: > 6 Jahre, Probanden = 10.

Probanden- nummer	Geburtsmonat
1	Mai 1993
2	März 1989
3	Januar 2002
4	Mai 1999
5	Juni 1992
6	April 1993
8	Februar 2000
9	April 2000
10	März 2001
11	Februar 1994

4.1.3 Versuchskonzept

Zu den Zeitpunkten T_{-4D} [vier Tage für Feld A, C und D und elf Tage für Feld B vor der Kastration], T_{0D} (am Tag der Kastration), T_{+4W} bis T_{+20W} (fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus) und T_{+36W} nach 36 Wochen (für Feld A, C und D) beziehungsweise 42 Wochen (für Feld B) wurden morgens zwischen 7.30 und 10.30 Uhr allen Probanden Blutproben entnommen.

In Prussendorf wurde die Population aus Feld B, nach Abschluss des 70-Tage-Tests kastriert. Die Pferde wurden nach der Kastration für acht Wochen auf einer Weide gehalten. Anschließend gingen diese direkt in Boxenhaltung über und wurden regelmäßig täglich trainiert.

Die Populationen aus den Feldern A und C wurden gruppenweise im Laufstall und ab Ende März 2009 in einer Herde auf der Wiese gehalten.

Das Feld D beinhaltet die Deckhengste, die sich zu den Zeitpunkten der Probenentnahme am Landgestüt befanden und dort in den täglichen Beritt einbezogen wurden.

Die Fütterung aller Tiere beschränkte sich auf Heu ad libitum, Hafer sowie Mineralfutterpellets (Substitution, um das Calcium-Phosphat-Verhältnis der Gesamtration auf 2:1 zu korrigieren). Die Probanden der Gruppen A und B erhielten dabei Equimin[®] der Firma basu-kraft[®]. Die Probanden der Gruppen C und D erhielten Mineralpellets Schwaiganger P, die inhaltlich den Derby[®] Mineral Pellets entsprechen. Die Probanden wurden mindestens zweimal im Jahr mit den Wirkstoffen Pyrantel und Ivermectin entwurmt und gegen Influenza und Herpes halbjährlich sowie gegen Tetanus jährlich geimpft.

Die Probanden aus den Feldern A und C befanden sich in einer freilaufenden Herde. Die Hengste aus Feld D waren während der Zuchtsaison auf verschiedenen Besamungsstationen und standen somit nicht immer für eine Blutprobenentnahme zur Verfügung. Einige Probanden mit unvollständigem Proben-Entnahmeprofil wurden von der Bestimmung der Aktivität bzw. Konzentration sowohl der BALP als auch für T und E₂ ausgeschlossen.

Der Proband 16 wurde am 26.03.2009 kastriert. Die Probanden 15 und 19 wurden am 15.05.2009 kastriert.

Es konnten insgesamt 263 Proben gewonnen werden, die auf ihren Gehalt an OC, BALP, CTX-I, E₂ und T untersucht worden sind.

4.1.4 Versuchsdurchführung

4.1.4.1 Allgemeine Untersuchung

Vor jeder Blutentnahme wurde der Proband einer klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen. Dabei wurden die Körpertemperatur und der Allgemeinzustand des Pferdes beurteilt. Abweichungen vom Normalzustand wurden dokumentiert.

4.1.4.2 Durchführung Blutentnahme

Die Blutproben wurden mittels Punktion der Vena jugularis externa sinistra respektive dextra über eine Kanüle mit 1,2 mm Durchmesser (Sterican® 18G, Ø 1,20 x 50 mm, Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gewonnen. Dabei wurden nach antiseptischer Vorbereitung (Hospisept®, Fa. Lysoform Dr. Hans Rosemann GmbH, Berlin, Deutschland) des punktierten Hautareals zwei 20 ml Spritzen (Braun Injekt® 20 ml, Fa. Braun) durch direktes, langsames Ansaugen unter beibehaltener Stauung der Vene mit etwa 30 ml Blut gefüllt.

4.1.4.3 Aufbereitung Blutproben

Direkt im Anschluss an die Blutentnahme wurden zwei Serumröhrchen mit Eindrückstopfen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit jeweils 10 ml Blut und ein EDTA-Blutröhrchen (Sarstedt) mit Sicherheitsübergreifstopfen mit 3,4 ml Blut gefüllt.

Zum Zeitpunkt T_{4D} wurde bei der Blutentnahme zusätzlich ein Natriumcitrat-Röhrchen (S-Monovette®, 5 ml, Sarstedt) für eine Fibrinogen-Messung mit Blut gefüllt.

Für eine optimale Mischung mit dem Antikoagulans wurden diese Röhrchen entsprechend vier- bis fünfmal geschwenkt.

Unmittelbar nach der Abfüllung wurden die Röhrchen bei etwa 4 bis 8°C in einer Kühlbox gelagert, die mit Kühlakkus gekühlt wurde. Nach Abschluss der Blutprobenentnahme und nach erfolgter Koagulation des Blutes (im Röhrchen) wurden die Serumröhrchen in einer Tischzentrifuge (Rotina® 380, Fa. Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) direkt zentrifugiert (4000 U/ min für 10 Minuten), um die festen von den flüssigen Bestandteilen des Blutes zu trennen und gleichzeitig die Serumbestandteile zu schonen.

Das Blutserum wurde in drei Eppendorf-Reaktionsgefäße® mit 1,5 ml Volumen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und zwei Kryo-Röhrchen® mit 2 ml Volumen (ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland) zu gleichen Teilen von 1,3 ml bzw. 1,8 ml mittels Pipettierung aufgeteilt und unmittelbar im Anschluss zur Konservierung bei minus 20°C eingefroren. Nach dem Transport an die FU Berlin folgte für die spätere Analyse die dauerhafte Lagerung bei minus 20°C.

4.1.4.4 Kastration und Kastrationstechnik

Die Kastration erfolgte am Tag der Probennahme T_{0D} zwischen 9:00 und 16:00 Uhr. Jeder Hengst wurde mit Xylazin® 2% (Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) mit einer Dosierung von 0,2 mg/kg i.v., Ursotamin® 10% (Serumwerk Bernburg AG) mit einer Dosierung von 2,2 mg/kg i.v. und Diazepam® 10 mg/ 2 ml (Diazepam, Rotexmedica GmbH, Trittau, Deutschland) mit einer Dosierung von 0,1 mg/kg i.v. für etwa 20 bis 30 Minuten anästhesiert und dabei bedeckt und offen kastriert, das heißt, die Tunica vaginalis wurde nicht eröffnet und die OP Wunde wurde offen gelassen zur Drainage des Wundesekretes.

Zur Infektionsprophylaxe erhielten alle Probanden 25ml Veracin® compositum (Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) mit folgender Dosierung (1ml enthält: 80.000 I.E. (76,19 mg) Benzathin-Benzylpenicillin, 120.000 I.E. (120 mg) Benzylpenicillin-Procaïn, 200.000 I.E. (258 mg) Dihydrostreptomycinsulfat, 20 mg Procainhydrochlorid) direkt nach der Kastration und am zweiten Tag nach der Kastration. Das entspricht einer Dosierung von 20.000 IE/kg Penicillin und 20.000 IE/kg Streptomycin.

4.1.5 Laboruntersuchungen

4.1.5.1 Messung Osteokalzin-Konzentration

Für die OC-Werte wurden die Serumproben mit einem Pferde-spezifischen „in-house“-RIA untersucht (Carstanjen, Sulon et al. 2003). Alle Messungen wurden im Doppelansatz und unter gleichen äußeren Bedingungen durchgeführt.

Dabei wurden auf ein Antiserum mit bekanntem Titer für equines OC zurückgegriffen, das aus Kaninchen gewonnen wurde, welche mit equinem, hochgereinigtem OC vacciniert worden waren. Standards wurden aus homogenisiertem und gereinigtem, equinen OC hergestellt.

Die Leer-Messungen wurden mit 0,3 ml TRIS-Puffer, 0,1 ml serumfreier, equiner OC-Lösung (1:10 verdünnt) und 0,1 ml Tracer durchgeführt. Die Gesamtzahl-Messungen wurden mit 0,1 ml Tracer durchgeführt, der etwa 25.000 cpm des ^{125}I -OC enthielt.

Die Standardlösungen (0 bis 50 ng/ml) enthielten 0,1 ml TRIS-Puffer, 0,1 ml serumfreie, equine OC-Lösung (Verdünnung 1:10), 0,1 ml Standard OC (Verdünnung 1:10), 0,1 ml Antiserum und 0,1 ml Tracer.

Die Messungen der unbekanntenen Proben wurden mit 0,2 ml TRIS-Puffer, 0,1 ml der unbekanntenen Probe, 0,1 ml des Antiserums und 0,1 ml Tracer durchgeführt. Alle Proben wurden anschließend über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Freies und Antikörper-gebundenes ^{125}I -OC wurde am folgenden Tag durch die Zugabe von 0,1 ml Präzipitationspuffer separiert [TRIS-HCl 0,025 M, pH 7,5, 1% Schaf-Antiserum zum Kaninchen-IgG (CER, Marloie, Belgien), Cellulose 0,05% (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Polyethylenglycol 6000 4% (PEG, Vel, Leuven, Belgien) und 0,4% BSA-Lösung]. Nach der Inkubation bei Raumtemperatur für eine weitere Stunde wurden 2 ml TRIS-BSA zu jedem Röhrchen dazu gegeben. Alle Röhrchen wurden bei 2890 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Gesamtmenge und die antikörpergebundene ^{125}I -OC-Menge wurden mit einem γ -Zähler bestimmt, bei einer Zähleffizienz von 75% (LKB Wallac 1261 Multigamma automatic counter, Breda, Niederlande).

Eine Validierung des Tests für das Pferd lag bereits durch die Studie von Carstanjen vor (Carstanjen, Sulon et al. 2003).

Die Sensitivität betrug 0,2 ng/ml. Der inter- und intratestspezifische Variationskoeffizient lag bei 6,2 und 8,2%. Die Konzentration für OC wurde in ng/ml angegeben.

4.1.5.2 Messung Bone Alkaline Phosphatase-Aktivität

Zur Ermittlung der BALP wurden die Proben mit dem kommerziell erhältlichen ELISA-Kit (BAP EIA Kit[®], Quidel Corporation, San Diego, USA) analysiert.

Dieser Immunoassay verwendet gereinigte, monoklonale Antikörper der Maus gegen BALP, die in einer Mikrotiterplatte gebunden sind.

Bei der Durchführung wurden jeweils 125 μl Testpufferlösung (gepufferte Lösung mit Magnesiumchlorid, Zinksulfat, Tensid und Natriumazid (0,05 %) als Konservierungsmittel) mit je 20 μl der Standardlösungen (von Osteosarkomzellen hergestelltes BALP, Linie SAOS-2, A = 0, B = 2, C = 20, D = 50, E = 80, F = 140 E/l BALP in Pufferlösung mit Magnesiumchlorid, Zinksulfat, Tensid, Trägerprotein, blauem Farbstoff und Natriumazid (0,05 %) als Konservierungsmittel), Kontrollen (siehe A und F) und unverdünnten Proben bei 22°C Raumtemperatur als Doppelprobe, für drei Stunden in den mit den Antikörpern beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert. Im Anschluss wurde jede Vertiefung mindestens viermal mit mindestens 250 μl Waschlösung (nicht-ionisches Detergens in Pufferlösung mit Natriumazid (0,05 %) als Konservierungsmittel) gespült und anschließend durch Ausschlagen getrocknet. Danach wurden 150 μl der Substratlösung (2-Amino-2-methyl-1-propanol-Lösung mit HEDTA, Magnesiumchlorid, Zinksulfat und Natriumazid (0,05 %) als Konservierungsmittel) in jede Vertiefung gegeben und bei 22°C Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Hiernach wurden in gleicher Verfahrensweise, wie die Zugabe der Substratlösung erfolgt war, 100 μl der Stopplösung (0,5 molare NaOH-Lösung) in jede Vertiefung gegeben. Direkt im Anschluss wurde die Absorbanz bei 405 nm im Microplate Manager (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gemessen. Mit dem aufpipettierten Standard wurde eine quadratische Standardkurve ($y = A + Bx + Cx^2$) erstellt. Aus den ermittelten Doppelwerten wurde der Mittelwert berechnet und schließlich die Enzymaktivität in U/l ausgegeben.

Eine Validierung des Tests für das Pferd lag bereits durch die Studie von Trumble vor (Trumble, Brown et al. 2008). Hier wurde der BALP-Metra-Kit[®] (Quidel Corporation, San Diego, USA) verwendet, der aber nach Herstellerangaben baugleich zum BAP-EIA-Kit ist und die gleichen monoklonalen Antikörper verwendet.

Die Sensitivität für den Test betrug 0,7 U/l. Der inter- und intra-testspezifischen Variationskoeffizient lag bei 3,3 und 7,1%.

4.1.5.3 Messung der Konzentration des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I-Kollagens

Die CTX-I Bestimmung erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen Elecsys β -CrossLaps/ Serum Assay (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland), einem automatisierten Elektrochemiluminiszenz Sandwich Antibody Assay (ECLIA), im Elecsys 2010 Analyser (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland).

Der Elecsys β -CrossLaps/ Serum Assay ist ein Sandwich-Immunoassay mit zwei monoklonalen Antikörpern für die spezifische Region des β -isomerisierten Oktapeptids mit der Sequenz EKAHD- β -GGR des c-terminalen Telopeptids des Typ I Kollagens.

Je 50 μ l Probe, Kontrollprobe und Kalibratorflüssigkeit im Doppelansatz wurden mit dem biotinylierten Antikörper für neun Minuten inkubiert. Nach Hinzufügen des mit Ruthenium markierten zweiten Antikörpers und der mit Streptavidin überzogenen, paramagnetischen Mikropartikel formte sich ein Sandwich-Komplex. Dieser hatte sich mit dem Mikropartikel durch eine Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung an der Festphase verbunden. Nach einer weiteren Inkubation für neun Minuten wurde das Reagenz in die Zählkammer gesaugt, wo das Elektrochemiluminiszenzsignal durch den Ruthenium-markierten-Sandwich-Komplex durch das Anlegen einer Spannung generiert wurde. Das freiwerdende Lichtsignal wurde mit einem Photomultiplier gemessen und die Signalintensität in Relative Light Units (RLU) ausgegeben. Anschließend wird der Wert mit der Kalibrationskurve verglichen wird, welche instrumentenspezifisch ist und mit einer zwei-Punkt-Kalibration und einer Master-Kurve, via Bar-Code auf den Reagenzien, erstellt wird. Anschließend wird ein Messwert in ng/ml für CTX-I im Serum ausgegeben.

Diese Schritte wurden automatisch durch den Elecsys 2010 Analyser innerhalb von 19 min durchgeführt. Eine Validierung dieses Tests erfolgte durch die Gruppen um Carstanjen (Carstanjen, Hoyle et al. 2004). Die Sensitivität für den Test betrug 0,1 ng/ml. Der inter- und intratestspezifische Variationskoeffizient lag bei 5 und 5,2%.

4.1.5.4 Messung Östradiol-Konzentration

Die Bestimmung der E_2 -Werte wurde im Labor Biocontrol (Biocontrol, Ingelheim am Rhein, Deutschland) vorgenommen. Grundlage des Tests war eine Weiterentwicklung (Hoppen und Niederstucke 2008) des Ultra-Sensitive-Estradiol RIA-Kit von Diagnostic Systems Laboratories (DSL-4800 Ultra-Sensitive E_2 RIA[®], Sinsheim, Deutschland).

Es erfolgte eine Modifikation für die Plasmaprobe wie von Gastal beschrieben (Gastal, Gastal et al. 1999): Dafür wurden 0,2 ml Plasmaproben für 30 min mit 3 ml Ethylacetat extrahiert, anschließend der wässrige Überstand bei -200°C gefroren. Das Lösungsmittel wurde dekantiert und im Vakuumkonzentrator (Hetovac VR1, Heto Lab Equipment, Birkerød, Dänemark) verdampft. Die getrockneten Extrakte wurden mit 0,2 ml Pufferlösung resuspendiert. Alle Reagenzien wurden vor der Verwendung auf Raumtemperatur (25°C) gebracht. Die flüssigen Reagenzien wurden durch vorsichtiges Umschwenken gründlich gemischt. Standards, Kontrollen und Proben-Resuspensate wurden als Doppelbestimmung analysiert: Es wurden jeweils 200 μ l Standard, Kontrolle bzw. Probe in die entsprechenden Röhrchen und jeweils 300 μ l E_2 -Nullstandard in die Standard-Röhrchen gegeben. In alle Röhrchen, mit Ausnahme der Standard-Röhrchen und der Röhrchen zur Bestimmung der Totalaktivität, wurden jeweils 50 μ l E_2 -Antisera gegeben. Anschließend wurden alle Röhrchen gevortext, abgedeckt und eine Stunde bei 25°C inkubiert. Danach wurde allen Röhrchen jeweils 50 μ l ^{125}I - E_2 -Reagenz hinzugefügt. Sie wurden gevortext und wieder für zwei Stunden bei 25°C inkubiert. Im Anschluss an diesen Schritt wurde 1 ml Präzipitationsreagenz in alle Röhrchen gegeben, mit Ausnahme der Röhrchen zur Bestimmung der Totalaktivität. Die Röhrchen wurden wieder gemischt, 20 min inkubiert und anschließend, (ohne die Röhrchen zur Bestimmung der Totalaktivität), 20 min bei 4000 x g und 40°C zentrifugiert.

Danach wurden die Röhrchen, in einen Behälter für radioaktiven Abfall dekantiert und ausgeklopft. Die Messung aller Röhrchen im Gammazähler (Clinigamma, Wallac-Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland) dauerte 60 sek. Die Ergebnisse wurden mittels halb-

logarithmischer Kurvenanpassung bestimmt. Eine Standardkurve wurde mit der 0,9 bis 60 pg/2ml Pufferlösung angefertigt.

Dem Verfahren liegt das Grundprinzip eines RIAs zugrunde, wobei radioaktive und nicht-radioaktive Antigene um eine konstante Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen konkurrieren. Die an den Antikörper gebundene Menge des ^{125}I -markierten E_2s ist umgekehrt proportional zu der Konzentration des vorhandenen E_2s . Eine rasche Trennung des freien und gebundenen Antigens erfolgt mittels eines Doppel-Antikörper-Systems.

Die untere Bestimmungsgrenze des Testsystems liegt bei unter 1 pg/ml. Der intra-assay-Variationskoeffizient betrug bei einem E_2 -Wert von 23 pg/ml 11,5%, bei 110 pg/ml 6,2%. Der inter-assay-Variationskoeffizient betrug bei einem E_2 -Wert von 23 pg/ml 12,9%. Die Wiederfindung nach Aufstockung lag bei 101,5%.

4.1.5.5 Messung Testosteron-Konzentration

Die T-Konzentrationen wurden mit dem kommerziell erhältlichen Elecsys-Testosteron Immunoassay (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland), ebenfalls einem automatisierten ECLIA, im Elecsys 2010 Analyser (Roche Diagnostics GmbH Penzberg, Deutschland) gemessen.

Während der ersten Stufe der Inkubation wurden 50 μl Serumprobe, Kalibratorflüssigkeit und Kontrollprobe im Doppelansatz mit dem T-spezifischen biotinylierten, monoklonalen Antikörper und einem T-Derivat als Hapten für neun Minuten inkubiert, wobei das Hapten bereits zuvor mit einem Ruthenium-Komplex markiert wurde. Die Bindungsseiten des markierten Antikörpers haben sich anschließend in Teilen mit dem markierten Hapten und in Teilen mit dem Testosteron aus der Probe verbunden.

Im zweiten Inkubationsschritt wurden Streptavidin-überzogene Mikropartikel hinzugefügt, so dass sich durch die Streptavidin-Wechselwirkung ein Sandwich-Komplex formt. Nach einer weiteren Inkubation für neun Minuten wurde das Reagenz in die Zählkammer gesaugt, wo ein Elektrochemiluminiszenzsignal durch den Ruthenium-markierten-Sandwich-Komplex generiert wurde. Ein Photomultiplier maß die Signalintensität in RLU. Die Ergebnisse für die T-Konzentration in der Probe wurden mit Hilfe einer Kalibrationskurve ermittelt.

Diese Schritte wurden automatisch durch den Elecsys[®] 2010 Analyser durchgeführt. Dieser RIA wurde bei 37°C mit vorgewärmten Reagenzien durchgeführt und dauerte pro Probe 18 min.

Bei diesem Verfahren lag die Nachweisgrenze für T bei 0,02 ng/ml. Die Kreuzreaktivität mit E und Progesteron lag bei <0,01%, mit Androstendion bei 0,91% und mit 5- α -Dihydrotestosteron bei 1,89%.

Eine Validierung des Tests für das Pferd erfolgte durch die Studie von Janett (Janett, Stump et al. 2009). Der inter- und intratestspezifische Variationskoeffizient lag bei 2,2 und 1,4%.

4.1.5.6 Blutuntersuchung

Die EDTA-Röhrchen wurden unmittelbar nach der Entnahme mit einem Kühlakku (ohne direkten Kontakt) in einer Styroporbox versandt und mit einem scil[®] Vet abc-Coulter Counter (scil animal care company GmbH, Viernheim, Deutschland) analysiert. Das Ergebnis wurde in folgenden Parametern ausgegeben: Erythrozytenzahl, Thrombozytenzahl, Gesamtzahl der weißen Blutzellen, Hämoglobin und Erythrozytenindizes. Die weißen Blutzellen wurden dabei in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten differenziert. Abweichungen von den Referenzwerten wurden dokumentiert.

4.1.5.7 Fibrinogenbestimmung

Die quantitative Fibrinogenbestimmung der Blutproben erfolgte nach Clauss (Clauss 1957) am Coagulometer nach Schnitger und Gross (Amelung, Lemgo, Deutschland) mit dem Fibrinogen-Reagenz Kit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland) im Doppelansatz.

Bei einer Konzentration >900 mg/dl Fibrinogen beim Pferd und Fohlen kann eine Osteomyelitis, Epiphysitis oder Erkrankung vorliegen, die mit einer erhöhten Freisetzung der Knochenmarker einhergeht (van Wuijckhuise-Sjouke 1984; Newquist und Baxter 2009).

Die Bestimmung der Fibrinogenkonzentration beruht auf der Messung der modifizierten Thrombinzeit, da die Gerinnungszeit nach Zusatz von Thrombin in einem bestimmten Bereich der Fibrinogenkonzentration proportional ist.

In dem zum Zeitpunkt T_{4D} mit Blut gefüllten Citratröhrchen (S-Monovette[®]) lag ein Mischungsverhältnis 1:9 von Citrat zu Blut vor. Das Plasma wurde innerhalb von zwei Stunden nach der Blutgewinnung bei $2000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und im Verhältnis 1:9 in eine Pufferlösung (pH 7,35) überführt. Für den Probenansatz wurden 0,2 ml Probenverdünnung für eine Minute bei $37^{\circ}C$ inkubiert und anschließend mit 0,2 ml Fibrinogen-Reagenz (Raumtemperatur) versetzt. Zeitgleich wurde eine Stoppuhr ausgelöst. Diese Stoppuhr lief bis zum Eintritt der Koagulation.

Der Eintritt der Koagulation wurde nach der Hähchen-Methode bestimmt. Dabei wurde in regelmäßigen, kurzen Zeitabständen ein Hähchen durch den Probenansatz gezogen.

Im Augenblick der Gerinnung wird bei dieser Methode ein Fibrinfädchen aus der Flüssigkeit gezogen. Dieses Fibrinfädchen bildet eine elektrisch leitende Verbindung zwischen der im Gerinnungsansatz stehenden Stabelektrode und der herausgehobenen Hakenelektrode. Die nachgeschaltete Elektronik registriert die leitende Verbindung und stoppt den Zeitzähler und den Häkelantrieb.

Anhand der Zeitspanne bis zur Gerinnung konnte die Menge des Fibrinogens in mg/dl aus einer mitgelieferten Tabelle ermittelt werden. Normalwerte beim Pferd liegen in einem Bereich bis 400 mg/dl. Abweichungen von den Normwerten wurden dokumentiert.

4.1.5.8 Creatinin- und gamma-Glutamyltransferase-Konzentration

Die Bestimmung der Creatininwerte der Probanden zu Beginn der Messreihe (Zeitpunkt T_{4D}) wurde mit den Blutproben am Cobas Mira plus[®] von Roche mit dem LT-CR 0251-Kit (Labor und Technik, LT-CR 0251-Kit, Eberhart Lehmann, Berlin, Deutschland) durchgeführt.

Der Test basiert auf der Jaffé-Reaktion ohne Enteiweißung, bei der alkalische Pikratlösung mit Creatinin eine Lösung gelb färbt. Da eine gelbe Färbung entsteht, lässt sich die Menge des Farbstoffes photometrisch bestimmen.

Die Creatininkonzentration im Serum wird in $\mu\text{mol/l}$ ausgegeben. Die Nachweisgrenze lag bei $8,8 \mu\text{mol/l}$. Abweichungen von den Referenzwerten wurden vermerkt.

Die Bestimmung von γ -GT-Aktivität wurde ebenfalls am Cobas Mira plus[®] (Roche) und dem LT-GT 0123-Kit (Labor und Technik, Eberhart Lehmann) durchgeführt.

Dieser Test basiert auf der Grundlage, dass die γ -GT den γ -Glutamyl-Rest von L- γ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid auf Glycylglycerin überträgt. Das entstehende 5-Amino-2-nitrobenzoat entsteht proportional zur Aktivität der γ -GT. Da es eine gelbe Farbe hat, lässt sich die Menge des Farbstoffes photometrisch bestimmen.

Die Konzentration der γ -GT aus dem Serum wird in U/l ausgegeben. Die Nachweisgrenze lag bei 3 U/l. Abweichungen von den Referenzwerten wurden dokumentiert.

4.1.6 Statistische Methoden

Zunächst werden die Einzeldaten der Probanden nach Gruppe und Zeitpunkt pro untersuchten Parameter grafisch in einem Punktediagramm dargestellt und der jeweilige Kurvenverlauf besprochen. Da die Daten in der Einzelbetrachtung zunächst wenig aufschlussreich sind, wird mit Hilfe der Varianzanalyse ein statistisches Verfahren angewandt, bei dem die Unterschiede der Mittelwerte der Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt herausgearbeitet werden können. Da es sich um unabhängige Stichproben mit einer

abhängigen Variablen und mehrstufigen Faktoren handelt, kommt die einfaktorielle Varianzanalyse zum Einsatz. Damit lässt sich überprüfen, ob ein bestehender Unterschied zwischen zwei Faktorstufen auch als statistisch signifikant zu bewerten ist. Voraussetzung für die Varianzanalyse ist eine Normalverteilung der Messwerte und Homogenität der Varianzen innerhalb der Gruppen.

Zunächst wird jede Gruppe zum jeweiligen Zeitpunkt deskriptiv erfasst. Im Anschluss wird die Homogenität der Varianzen mit der Levené-Statistik getestet. Varianzhomogenität liegt nicht vor, wenn die Hypothese, dass die Varianzen homogen sind, zum Niveau $\alpha = 0.05$ abgelehnt wird. Das heißt, wenn der Levené-Test statistisch signifikant ist, sollte die Hypothese homogener Varianzen abgelehnt werden.

Mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse wird geprüft, ob bestehende Unterschiede der Mittelwerte signifikant oder rein zufällig sind. Liegt die Signifikanz unterhalb des Signifikanzniveaus von $p > 0.05$; so kann davon ausgegangen werden, dass mindestens einer der Mittelwerte signifikant von dem anderen abweicht.

Ein Post-Hoc Test kann anschließend zur Überprüfung eingesetzt werden, welche der Gruppen (Faktoren) sich mit ihren Mittelwerten signifikant von einander unterscheiden. Zum Ausschluss einer Inflation des Fehlers erster Art (α -Fehler) wird die Korrektur nach Bonferroni genutzt.

Liegt keine Varianzhomogenität vor, weil der Levené-Test signifikant ist, werden der F-Welch- und Brown-Forsythe-Test genutzt, die wesentlich robuster sind und auch bei inhomogenen Varianzen den Unterschied der Mittelwerte bewerten. Sind die Tests auf dem Niveau $\alpha > 0.05$ signifikant, wird die Nullhypothese angenommen. Welche Faktorstufen sich unterscheiden kann im Post-Hoc-Test nach Games-Howell ermittelt werden.

Zur Veranschaulichung der Daten werden die Gruppen in Boxplots dargestellt. Die Faktorstufe ist dabei die jeweilige Gruppe. Wird bei diesem Test ein p-Wert kleiner als das Signifikanzniveau ($p > 0,05$) ausgegeben, so liegen signifikante Unterschiede zwischen den Medianen vor. Die statistische Auswertung wird mit dem Computerprogramm IBM® SPSS® Statistics 20.0 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen) und in Zusammenarbeit mit der Veterinärbiometrie der FU Berlin durchgeführt.

4.2 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die fünf Messwerte (BALP, OC, CTX-I, T und E_2) der insgesamt 39 Probanden über die Zeitpunkte 1 bis 8 dargestellt und miteinander verglichen. Dabei werden die Probanden in ihren vier Gruppen (Feld A bis D) vorgestellt. Zusätzlich werden die Knochenstoffwechsellmarker im Verhältnis zu Testosteron und Östradiol bei Feld C als „Stellvertreter“ für den normalen Knochenstoffwechsel gezeigt. Schließlich wird die Korrelation zwischen T und E_2 , OC und CTX-I näher beschrieben, der Quotient von Knochenauf- zu Knochenabbau ($OC/CTX-I \cdot 1000$) gebildet und das jeweilige Ergebnis präsentiert. Im Anschluss werden die Ergebnisse der übrigen Laboruntersuchungen dargestellt und ausgewertet.

Die Konzentrationen resp. die Aktivität der Knochenstoffwechsellmarker und der Steroidhormone für die nachträglich Kastrierten (Proband 15, 16 und 19) in Feld C wurden ebenfalls bestimmt. Eine Betrachtung der Messwerte erfolgt gesondert.

4.2.1 Bone Alkaline Phosphatase

4.2.1.1 Einzelwerte Bone Alkaline Phosphatase-Aktivität

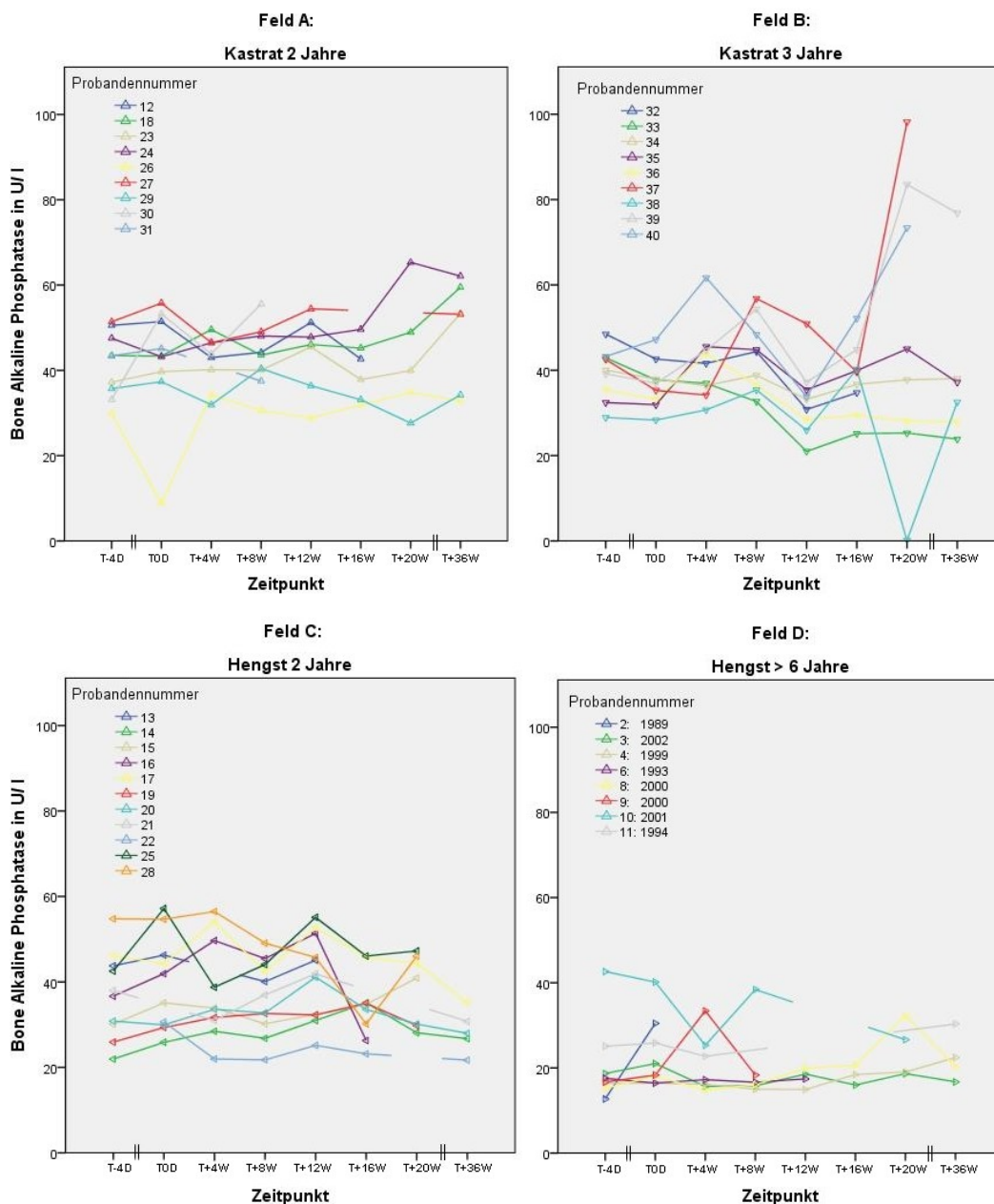


Abbildung 10: Liniendiagramm der Bone Alkaline Phosphatase-Aktivität zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probandengruppen (Feld A bis D)

Fehlende Werte sind nicht eingezeichnet. Im Feld D sind zusätzlich die Geburtsjahrgänge eingetragen. T_{-4D} (vier Tage für Feld A, C und D und elf Tage für Feld B vor der Kastration), T_{0D} (am Tag der Kastration), T_{+4W} bis T_{+20W} (fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus) und T_{+36W} nach 36 Wochen (für Feld A, C und D) beziehungsweise 42 Wochen (für Feld B).

In Feld A ist die Gruppe der zweijährigen Kastraten dargestellt. Zum Zeitpunkt T_{-4D} verteilen sich die neun gemessenen Werte in einer Spanne von 30 und 51 U/l. Bis auf einige Ausreißerwerte blieben die Werte der Probanden in diesem Spektrum bis zum Zeitpunkt T_{+8W}. Anschließend wird die Wertebereich etwas breiter. Bei T_{+36W} liegt der Wertebereich zwischen 33 und 62 U/l. Die Kurvenverläufe sind recht individuell und werden zunächst einzeln beschrieben:

Bei Proband 12 ließ sich zum Zeitpunkt T_{-4D} eine Aktivität von etwa 50 U/l messen, die bei T_{0D} leicht ansteigt, nach der Kastration abfällt, dann aber bei T_{+12W} sigmoid auf das Niveau der Ausgangswerte ansteigt. Bei T_{+16W} fällt der Wert auf etwa 43 U/l ab.

Bei Proband 18 zeigt sich bei T_{-4D} und T_{0D} eine Aktivität von etwa 43 U/l, die im Verlauf bei Messung T_{+4W} leicht ansteigt, bei T_{+8W} wieder knapp unter die Ausgangswerte zurückkehrt, dann aber kontinuierlich in einer leicht ansteigenden Kurve bei einer Aktivität von knapp 60 U/l zum Zeitpunkt T_{+36W} endet.

Proband 23 startet mit einer Aktivität unter 40 U/l, nähert sich diesem Wert bis Messung T_{+8W} an, steigt bei T_{+12W} auf eine Aktivität von ca. 45 U/l an, fällt nachfolgend ab auf das Niveau der Ausgangswerte, um anschließend in einer seichten Kurve sein Maximum bei T_{+36W} von etwa 53 U/l zu erreichen.

Proband 24 startet bei T_{-4D} mit einem Wert von 47 U/l, fällt jedoch bei T_{0D} auf einen Wert von etwa 43 U/l ab. Er erreicht einen Maximalwert von 65 U/l bei T_{+20W} und fällt nachfolgend auf einen Wert von 63 U/l ab, bleibt aber insgesamt über dem Ausgangsniveau.

Proband 26 zeigt die geringste Grundaktivität von knapp 30 U/l. Sein Graph fällt auf einen Wert von 9 U/l ab und erreicht bei T_{+4W} einen Wert knapp oberhalb des Startwertes. Der weitere Verlauf gestaltet sich wellenförmig im Bereich um 32 U/l und endet bei T_{+36W} mit dem schwächsten Ergebnis der Gruppe bei knapp 33 U/l.

Proband 27 zeigt den höchsten Ausgangswert von etwa 51 U/l, steigt bei T_{0D} um weitere 5 U/l an, fällt dann aber auf einen Wert von 46 U/l ab. Anschließend steigt die Kurve leicht an, fast bis auf das Niveau von T_{0D} . Der Wert bei T_{+36W} liegt bei 53 U/l.

Proband 29 startet mit Werten unterhalb von 40 U/l mit steigender Tendenz und fällt bei Messung T_{+4W} unter das Startniveau. Er erreicht bei T_{+8W} sein Maximum von 40 U/l. Der Graph fällt kontinuierlich auf einen Wert von knapp 28 U/l bei T_{+20W} ab. Die Aktivität der BALP steigt bei T_{+36W} fast wieder auf die Ausgangswerte.

Proband 30 zeigt eine Grundaktivität bei den ersten beiden Messungen von 33 auf 53 U/l steigend. Der Graph fällt nach der Kastration auf einen Wert von 44 U/l und steigt anschließend auf 56 U/l.

Proband 31 zeigt Ausgangswerte bei den ersten beiden Messungen mit schwacher Aufwärtstendenz um 44 U/l. Eine weitere Probe zum Messzeitpunkt T_{+8W} liegt mit 37 U/l unterhalb des Ausgangsniveaus.

Für T_{+4W} steht die Probe des Probanden 31 für eine Analyse nicht zur Verfügung; ebenso stehen für T_{+12W} die Proben der Probanden 30 und 31, für T_{+16W} die Proben der Probanden 27, 30, 31, für T_{+20W} die Proben der Probanden 12, 27, 30, 31 und für T_{+36W} die Proben der Probanden 12, 30 und 31 nicht zur Verfügung.

Zusammengefasst zeigt sich bei Messung T_{-4D} und T_{0D} bei acht von neun Probanden ein gleichbleibender bzw. schwach-positiver Werteverlauf als Basiswert. Bei der ersten Messung nach der Kastration (T_{+4W}) zeigt sich bei fünf von neun Probanden eine negative und bei drei Probanden eine gleichbleibende Steigung des Kurvenverlaufs. Der Trend der Werte nimmt schwach zu und wird zum Zeitpunkt T_{+36W} breiter.

In Feld B ist die Gruppe der dreijährigen Kastraten aufgeführt. Der Wertebereich zu Beginn der Messung liegt zwischen 29 und 48 U/l. Die Kurvenverläufe sind sehr individuell, deshalb werden sie nachfolgend einzeln besprochen:

Proband 32 hat zu T_{-4D} einen Ausgangswert von 48 U/l, der bis T_{+4W} kontinuierlich abnimmt. Zum folgenden Zeitpunkt wird ein relatives Maximum bei 44 U/l erreicht. Bei T_{+12W} wird dann ein relatives Minimum erreicht, mit einer Aktivität von 31 U/l, bei steigender Tendenz zum Zeitpunkt T_{+16W} .

Proband 33 hat einen Ausgangswert von 43 U/l mit abnehmender Tendenz sowie einem Minimum bei T_{+12W} bei 20 U/l. Danach steigt die Kurve an und zeigt einen fast linearen Verlauf mit einem Endwert von 24 U/l.

Proband 34 startet mit einem Ausgangswert von 40 U/l, der schwach wellenförmig mit sinkendem Trend endet mit einer Aktivität von 38 U/l.

Proband 35 startet mit einem Ausgangswert bei 32 U/l und steigt nach T_{0D} auf ein relatives Maximum von 45 U/l, fällt dann zunächst schwach, dann etwas stärker auf ein relatives

Minimum mit 35 U/I zum Zeitpunkt T_{+12W} . Anschließend steigt der Graph wieder auf einen Wert von 44 U/I bei T_{+20W} an und endet anschließend mit einer Aktivität von 37 U/I.

Proband 36 startet mit 35 U/I bei T_{-4D} mit abnehmender Tendenz, steigt dann nach T_{0D} deutlich auf ein Maximum bei 46 U/I, fällt dann aber kontinuierlich ab bis zu einem Wert von 37 U/I bei T_{+36W} .

Proband 37 hat einen Ausgangswert bei T_{-4D} von knapp 43 U/I. Der Wert fällt leicht bis zum Messpunkt T_{+4W} auf einen Wert von 34 U/I ab, gefolgt von einer Zickzackkurve mit einem Maximum bei T_{+20W} bei 98 U/I.

Proband 38 zeigt von T_{-4D} bis T_{+4W} die niedrigste Aktivität des Feldes B mit unter 29 U/I mit einer Steigerung auf 35 U/I zum Messpunkt T_{+8W} . Es folgt eine heftige Zickzackbewegung der Kurve, mit einem relativen Maximum bei T_{+16W} mit 40 U/I und einem nachfolgenden Minimum mit 0,12 U/I, die bei T_{+36W} bei einer Aktivität von 32 U/I endet.

Der Graph des Probanden 39 startet mit einer Grundaktivität von 39 U/I bei leichtem Abwärtstrend, erreicht ab T_{+4W} eine positive Steigung mit relativem Maximum bei T_{+8W} und absolutem Maximum bei T_{+20W} mit 54 U/I und sich anschließender leichter Abwärtstendenz.

Proband 40 beginnt bei einem Wert von 43 U/I bei T_{-4D} mit stetig steigender Tendenz bis zu einem Maximum bei T_{+4W} mit 62 U/I. Dann fällt der Graph auf ein Minimum bei T_{+12W} unter das Ausgangsniveau. Anschließend steigt er linear auf einen Wert von 73 U/I bei T_{+20W} .

Zu T_{+20W} sind die Probanden 32, zu T_{+36W} die Probanden 37 und 40 aus dem Bestand verkauft und stehen für eine Probennahme nicht mehr zur Verfügung.

Es läßt sich zusammenfassen, dass alle Probanden im Bereich von 30 bis 50 U/I während den ersten beiden Messungen liegen und acht von neun Graphen nach der Kastration ansteigen. Spätestens zum Zeitpunkt T_{+16W} haben sie ein relatives Minimum durchschritten und steigen erneut an oder stagnieren im Verlauf. Zu T_{+20W} und T_{+36W} liegen die Wertebereiche in den Grenzen zwischen 25 und 98 U/I maximal auseinander.

Im Feld C ist die Gruppe der zweijährigen Hengste dargestellt. Diese Gruppe dient als Kontrollgruppe für die zweijährigen Kastrierten in Feld A. Die Zeitpunkte der Probennahme stimmen mit den Zeitpunkten aus Feld A überein. Die Aktivitäten der BALP verlaufen über die gesamte Messdauer in einem Bereich zwischen 20 und 57 U/I.

Der Graph des Probanden 13 zeigt einen wellenförmigen Verlauf im Wertebereich von 40 bis 45 U/I.

Proband 14 findet seinen Startwert im unteren Bereich des Feldes bei 22 U/I. Dann steigt die Aktivität bis T_{+4W} an, fällt anschließend bei T_{+8W} ab, um dann bei T_{+16W} kontinuierlich auf sein relatives Maximum bei 35 U/I anzusteigen. Anschließend erreicht der Kurvenverlauf eine negative Steigung mit einem Endwert von 26 U/I, der aber noch über seinem Minimum bei T_{+8W} liegt.

Proband 15 hat einen Startwert bei 30 U/I, erreicht bei T_{0D} ein Maximum von etwa 35 U/I, fällt anschließend auf ein relatives Minimum knapp über dem Startwert.

Proband 16 hat einen Startwert von 37 U/I. Der Graph steigt bis T_{+4W} auf einen Wert von knapp 50 U/I. Anschließend ist ein zickzackförmiger Kurvenverlauf mit Abwärtstendenz mit einem Maximum über 51 U/I und einem Endwert bei T_{+16W} von 26,3 U/I zu verzeichnen.

Proband 17 startet mit einem Ausgangswert von etwa 46 U/I mit fallender Tendenz, erreicht ein relatives Maximum bei T_{+4W} mit 54 U/I, zeigt dann ebenfalls einen zickzackförmigen Kurvenverlauf und erreicht bei T_{+36W} bei 35 U/I ein relatives Minimum.

Proband 19 zeigt bei T_{-4D} eine Grundaktivität von 26 U/I, die mit leicht ansteigendem Kurvenverlauf bis T_{+16W} 35 U/I und dann zum Zeitpunkt T_{+20W} ein relatives Minimum mit knapp 30 U/I erreicht.

Proband 20 hat bei T_{-4D} und T_{0D} eine Aktivität von etwa 30 U/I, steigt dann zu einem relativen Maximum bei T_{+12W} mit 41 U/I an. Anschließend fällt der Graph auf einen Wert von 28 U/I bei T_{+36W} ab.

Proband 21 startet mit einem Ausgangswert von 38 U/I, der bei T_{+4W} ein relatives Minimum mit 31 U/I erreicht, anschließend aber bis 42 U/I bei T_{+12W} ansteigt. Der Messwert zum Zeitpunkt T_{+36W} erreicht den niedrigsten Wert des Probanden.

Der Graph des Probanden 22 startet bei T_{0D} bei knapp 31 U/l, fällt anschließend auf eine Aktivität von 22 U/l, erreicht bei T_{+12W} sein relatives Maximum mit 25 U/l und fällt dann auf knapp 22 U/l.

Bei Proband 25 ist eine positive Steigung bis zum Wert 57 U/l zu T_{0D} zu erkennen. Im Anschluss zeigt die Kurve einen zickzackförmigen Verlauf mit relativem Minimum bei 39 U/l bei T_{+4W} und endet mit 47 U/l bei Messpunkt T_{+20W} .

Bei Proband 28 lässt sich der höchste Startwert mit 53 U/l im Feld C verzeichnen und mit leichtem Anstieg zum Zeitpunkt T_{+4W} auf 56 U/l. Es folgt eine kontinuierliche Abnahme der Werte bis auf 30 U/l. Bei T_{+20W} kommt es zu einem Anstieg der Aktivität auf 46 U/l.

Für T_{-4D} konnte von Proband 22 keine Probe analysiert werden, ebenso für T_{0D} von Proband 21, für T_{+16W} von den Probanden 13 und 21, für T_{+20W} von den Probanden 13, 16, 21 und 22 und für T_{+36W} von den Probanden 13, 15, 16, 19, 25 und 28.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Probanden in Feld C über den gesamten Beobachtungszeitraum sehr breit verteilte Werte haben. Zu den Zeitpunkten T_{+20W} und T_{+36W} wird ansatzweise ein Rückgang der Aktivität im Verhältnis zu den vorherigen Messungen deutlich. Dabei enden sechs von acht Kurven mit einer negativen Steigung im Bereich oder unterhalb ihres relativen Minimums der Kurve. Ein deutlicher Abwärtstrend wie in Feld A nach T_{0D} lässt sich nicht feststellen.

In Feld D ist die Gruppe der Hengste, die älter als sechs Jahre sind, dargestellt. Der Wertebereich der Gruppe liegt zu Beginn der Messungen zwischen 12,7 und 42,6 U/l.

Proband 2 zeigt zu T_{-4D} und T_{0D} die Werte 13 und 30 U/l.

Proband 3 startet mit einer Aktivität von knapp 19 U/l zu T_{-4D} und erreicht ein relatives Maximum bei T_{0D} mit 21 U/l. Die Kurve verläuft in seichten Wellen in einem Bereich zwischen 15 und 19 U/l.

Proband 4 startet mit einem Wert von 16 U/l. Der Graph verläuft mit minimalem Gefälle zum Zeitpunkt T_{+12W} auf sein Minimum bei knapp 15 U/l und steigt dann auf einen Maximalwert von 22 U/l.

Proband 6 ist mit den ersten 5 Messwerten vertreten und zeigt einen minimal schwankenden Verlauf der Werte um 17 U/l.

Proband 8 erreicht bei T_{-4D} eine Aktivität von 15 U/l. Der Graph steigert sich bis T_{+16W} nur wenig, kommt dann auf ein deutliches, relatives Maximum bei T_{+20W} mit 32 U/l und fällt anschließend wieder auf einen Wert im Bereich von 20 U/l.

Proband 9 startet mit den ersten beiden der vier vorliegenden Messungen in einem Bereich der Aktivität der BALP zwischen 17 und 18 U/l, erreicht bei T_{+4W} ein Maximum mit 33 U/l und fällt anschließend wieder auf einen Wert von 18 U/l ab.

Proband 10 beginnt mit dem Maximumwert des Feldes D bei 42 U/l und fällt bis T_{+4W} steil auf einen Wert von 25 U/l, steigt anschließend aber wieder auf einen Wert um 40 U/l an. Zum Zeitpunkt T_{+36W} befindet sich der Wert bei 27 U/l.

Die Ausgangswerte des Probanden 11 liegen bei 25 U/l und fallen bis T_{+4W} um 3 U/l ab. Der Messwert bei T_{+36W} liegt mit einem Maximum bei 30 U/l.

Folgende Proben wurden nicht analysiert: Bei Proband 1 alle Proben, bei Proband 2 die Proben von T_{+4W} bis T_{+36W} , bei Proband 5 alle Proben, bei Proband 6 die Proben zum Zeitpunkt T_{+20W} und T_{+36W} , bei Proband 9 die Proben von T_{+12W} bis T_{+36W} , bei Proband 10 die Proben von T_{+12W} bis T_{+20W} und bei Proband 11 die Proben von T_{+8W} bis T_{+20W} .

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Probanden in Feld D über den dargestellten Messzeitraum eine deutlich niedrigere Grundaktivität der BALP und einen meist linearen Verlauf zeigen als die Gruppen A bis C. Jüngere Tiere der Gruppe D zeigen dabei etwas höhere Aktivitäten mit sich abhebenden relativen Maxima und Minima.

4.2.1.2 Mittelwerte Bone Alkaline Phosphatase-Aktivität

Bone Alkaline Phosphatase-Aktivität in U/l

Zeitpunkt	Status											
	Feld A: Kastrat 2 Jahre			Feld B: Kastrat 3 Jahre			Feld C: Hengst 2 Jahre			Feld D: Hengst >6 Jahre		
	Mittelwert	Standardabweichung	N	Mittelwert	Standardabweichung	N	Mittelwert	Standardabweichung	N	Mittelwert	Standardabweichung	N
T _{-4D}	41,37	7,73	9	39,23	6,06	9	37,07	10,07	10	20,62	9,58	8
T _{0D}	42,00	13,88	9	36,79	5,64	9	39,52	11,03	10	23,34	8,40	8
T _{+4W}	41,96	6,17	8	41,74	9,06	9	37,95	11,59	10	20,75	6,83	7
T _{+8W}	43,22	7,25	9	43,57	8,47	9	36,57	8,52	11	20,04	9,07	6
T _{+12W}	44,32	8,83	7	32,97	8,40	9	41,25	9,92	11	17,70	2,12	4
T _{+16W}	40,06	7,00	6	38,09	7,98	9	34,44	7,73	9	18,35	2,32	3
T _{+20W}	43,34	14,53	5	48,92	33,24	8	38,59	7,93	8	24,15	6,55	4
T _{+36W}	49,19	12,62	6	39,38	19,13	6	30,87	8,82	8	22,45	5,75	4

Tabelle 6: Übersicht der Mittelwerte und Standardabweichung der Bone Alkaline Phosphatase-Aktivität in den Feldern A bis D

T_{-4D} (vier Tage für Feld A, C und D und elf Tage für Feld B vor der Kastration), T_{0D} (am Tag der Kastration), T_{+4W} bis T_{+20W} (fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus) und T_{+36W} nach 36 Wochen (für Feld A, C und D) beziehungsweise 42 Wochen (für Feld B), N: Probandenzahl.

In Feld A ergeben sich vor der Kastration bei T_{-4D} und T_{0D} Mittelwerte von 41,37 ± 7,73 U/l und 42,00 ± 13,88 U/l mit je neun Probanden. Vier Wochen nach der Kastration ergibt sich ein fast unveränderter Wert. Der Mittelwert steigt bis T_{+12W} bei 44,32 ± 8,83 U/l schwach an, fällt dann um etwa 4 U/l ab und erreicht mit sechs Probanden bei T_{+36W} sein relatives Maximum bei 49,19 ± 12,62 U/l. Damit zeigt sich ein kontinuierlicher Verlauf der Mittelwerte, der schwachen, wellenförmigen Schwankungen unterworfen ist, aber über längere Zeit leicht ansteigt (bei T_{+20W} und T_{+36W}).

In Feld B sind die Mittelwerte der Dreijährigen dargestellt. Die bei T_{-4D} und T_{0D} ermittelten Werte liegen nur wenig niedriger als die der Zweijährigen aus Feld A. Es konnten 39,23 ± 6,06 U/l und 36,79 ± 5,54 U/l mit je neun Probanden errechnet werden. Nach der Kastration steigt der Mittelwert bei T_{+4W} auf einen Mittelwert von 41,74 ± 9,06 U/l an, erreicht bei T_{+8W} ein relatives Maximum mit 43,57 ± 8,47 U/l mit neun Probanden und fällt dann wieder auf 32,97 ± 8,40 U/l bei T_{+12W}. Ein weiteres relatives Maximum wird zum Zeitpunkt T_{+20W} mit 48,92 ± 33,24 U/l mit acht Probanden erreicht, welches zum letzten Zeitpunkt abflacht und einen Endwert von 39,38 ± 19,13 U/l mit nur noch sechs Probanden erreicht. Es kann keine kontinuierliche Steigerung nach der Kastration verzeichnet werden.

Im Feld C sind die Mittelwerte der Zweijährigen als Kontrollgruppe zu Feld A berechnet. Die Ausgangsmittelwerte bei T_{-4D} und T_{0D} liegen mit 37,07 ± 10,07 U/l und 39,52 ± 11,03 U/l etwas niedriger als im Feld A. Der weitere Verlauf der Mittelwerte ist wellenförmig im Bereich zwischen 30,87 ± 8,82 U/l mit acht Probanden zum Zeitpunkt T_{+36W} als relatives Minimum und mit 41,25 ± 9,92 U/l mit 11 Probanden bei T_{+12W} als relatives Maximum. Der Verlauf wird in der Darstellung im Boxplot noch verdeutlicht. Insgesamt ist der Wertebereich im Feld C etwas niedriger als bei den kastrierten Zweijährigen in Feld A.

In Feld D liegen die Mittelwerte der adulten Hengste im Bereich um 20 U/l. Ein relatives Minimum wird bei T_{+12W} mit 17,70 ± 2,12 U/l bei vier Probanden, ein relatives Maximum zum Zeitpunkt T_{+20W} mit einem Mittelwert von 24,15 ± 5,75 U/l erreicht. Der Verlauf ist leicht wellenförmig. Das Basisniveau ist deutlich niedriger angesiedelt als bei den anderen Gruppen.

Die Unterschiede der Mittelwerte sind aus Abbildung 3 abzulesen. Zum Zeitpunkt T_{+36W} sind die Unterschiede der Mittelwerte zwischen Feld A und Feld C signifikant. Weitere signifikante Effekte zwischen Feld A und C zu weiteren Zeitpunkten konnten nicht mit $P \leq 0,05$ abgesichert werden. Bei den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass die Mittelwerte der BALP-Aktivitäten der Hengste aus Feld D sich signifikant mit $P \leq 0,05$ von denen der Mittelwerten der zweijährigen Kastraten aus Feld A unterscheiden.

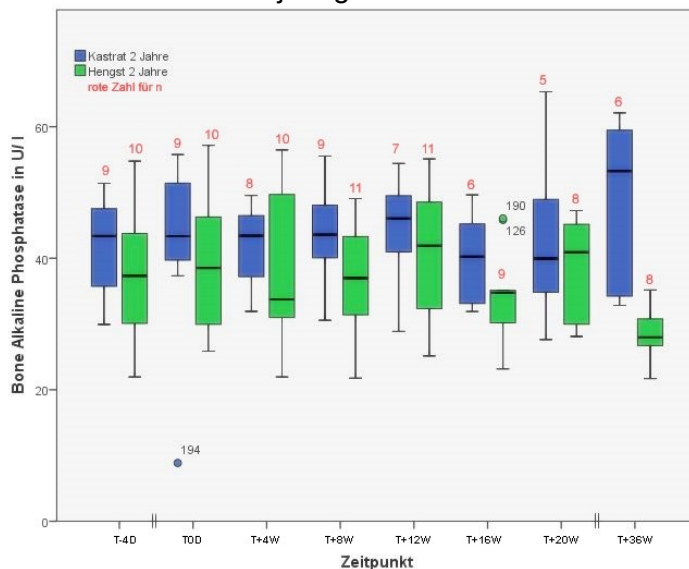


Abbildung 11: Boxplot zur Bone Alkaline Phosphatase-Aktivität der Felder A und C im Vergleich

Vier Tage für Feld A und C (T_{-4D}), am Tag der Kastration (T_{0D}), fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus (T_{+4W} bis T_{+20W}) und T_{+36W} nach 36 Wochen.

4.2.1.3 Einordnung der Bone Alkaline Phosphatase-Aktivität der nachträglich Kastrierten in Feld C

Zeitpunkt -angepasst-	Proband 15	Proband 16	Proband 19	Mw \pm SD von Feld A in U/l	Mw \pm SD von Feld C in U/l	
$T_{corr+4W}$		42,26 U/l		41,96 \pm 6,17	37,95 \pm 11,59	T_{+4W}
$T_{corr+16W}$	46,52 U/l	20,00 U/l	38,10 U/l	40,32 \pm 7,00	34,44 \pm 7,73	T_{+16W}
$T_{corr+20W}$				43,34 \pm 14,53	38,59 \pm 7,93	T_{+20W}

Tabelle 7: Darstellung Bone Alkaline Phosphatase-Einzelaktivitäten der nachträglich Kastrierten aus Feld C zu den Mittelwerten

T_{+4W} : 4 Wochen nach der Kastration, T_{+16W} : 16 Wochen nach der Kastration T_{+20W} : 20 Wochen nach der Kastration. Bei den „angepassten“ Zeitpunkten ($T_{corr+4W}$, $T_{corr+16W}$ und $T_{corr+20W}$) wird der Messwert der zu einem anderen Zeitpunkt als zum Zeitpunkt T_0 kastrierten Tiere im zeitlich gleichen Verhältnis mit den Mittelwerten der vergleichbaren Probanden verglichen. Eine mögliche Saisonalität der Werte kann nicht berücksichtigt werden. Mw: Mittelwert; SD: Standardabweichung; U/l: Units pro liter.

Wie aus der vorliegenden Tabelle ersichtlich, verhält sich die Aktivität der BALP bei den nachträglich kastrierten Probanden aus Feld C ähnlich zu den Werten der Probanden in Feld A: Bis auf den zweiten Wert des Probanden 16 zeigte sich bei allen kastrierten Probanden eine höhere Aktivität der BALP als in der Kontrollgruppe zu einem vergleichbaren, „angepassten“ Zeitpunkt nach der Kastration ($T_{corr+4W}$ bis $T_{corr+20W}$).

Eine Erklärung für diesen Ausreißerwert von 20,00 U/l konnte nicht erbracht werden. Dieser Wert entspricht einer Grundaktivität der BALP für die Probanden in Feld D.

4.2.1.4 Ergebniszusammenfassung für Bone Alkaline Phosphatase

Bei der Betrachtung der BALP dieser Arbeit zeigen sich ab T_{+4W} stets höhere Mittelwerte des Feldes A gegenüber Feld C, die aber erst zum Zeitpunkt T_{+36W} als statistisch signifikant abzusichern sind. Daraus lässt sich entnehmen, dass die Gruppe aus Feld A nach ihrer Kastration eine höhere Enzymaktivität aufweist, was auf einen stärkeren Knochenaufbau als in der Vergleichsgruppe hindeutet. Beide Gruppen unterliegen den gleichen Umweltfaktoren und sind somit direkt vergleichbar. Die Kastraten aus Feld B zeigen einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die Probanden in Feld A. Die letzten Messungen verlaufen höher als die Werte der Hengste aus Feld C.

Bei der Betrachtung der Einzelwerte lässt sich zusammenfassen, dass der gesamte Wertebereich des Feldes D eine im Vergleich geringere Grundaktivität aufweist als die Gruppen von Zwei- und Dreijährigen. Die Werte der dreijährigen sind etwas niedriger angesiedelt, als die der zweijährigen Kastraten aus Feld A. Wie auch bei den anderen Probenergebnissen zeigt sich, dass jüngere Tiere im Feld D höhere Absolutwerte erzielen und ebenfalls höhere Amplitudenausschläge aufweisen als ältere Probanden der Gruppe.

4.2.2 Osteokalzin

4.2.2.1 Einzelwerte Osteokalzin-Konzentration

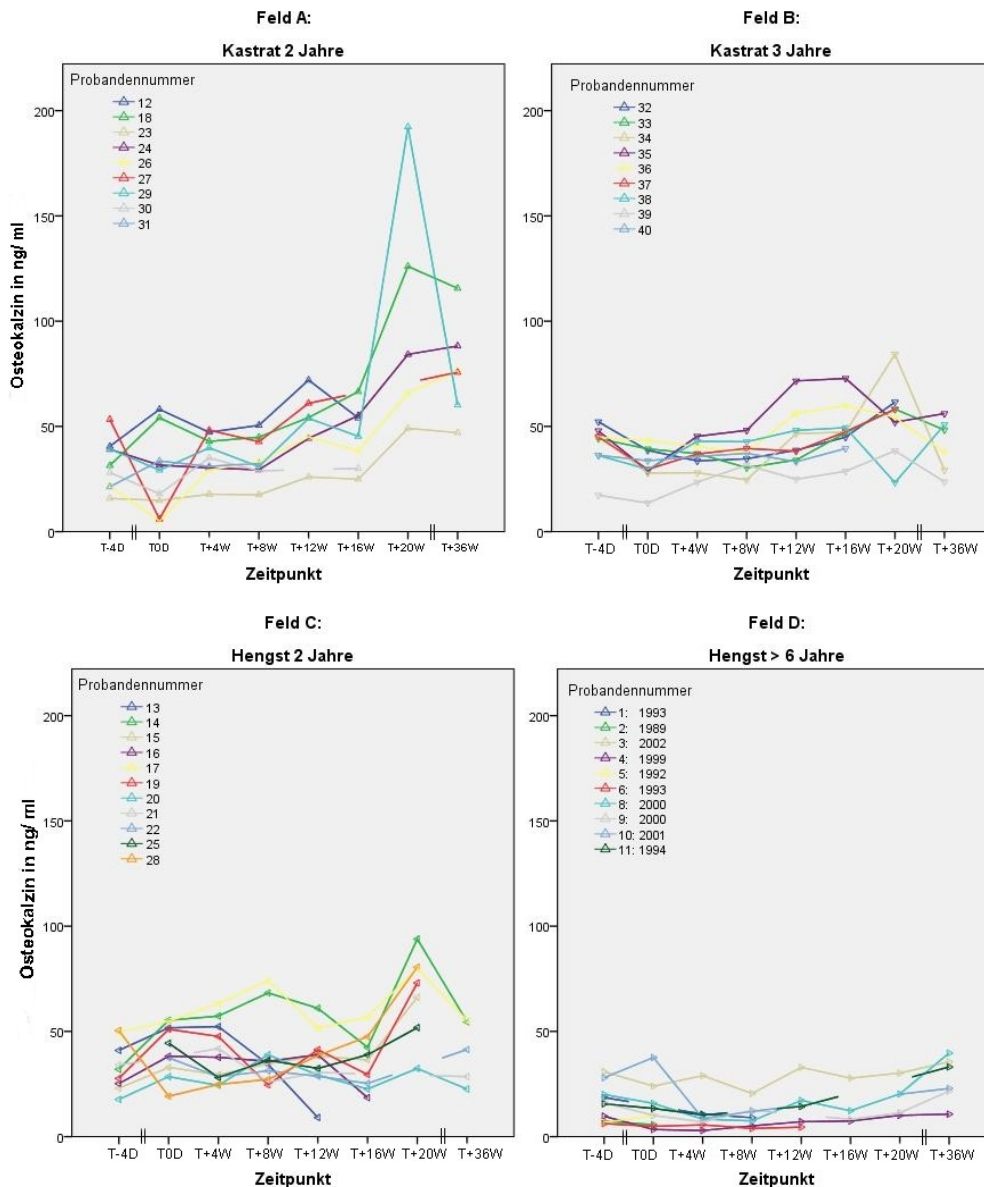


Abbildung 12: Liniendiagramm der Osteokalzin-Konzentration zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probandengruppen (Feld A bis D)

Fehlende Werte sind nicht eingezeichnet. Im Feld D sind zusätzlich die Geburtsjahrgänge eingezeichnet. T_{-4D} (vier Tage für Feld A, C und D und elf Tage für Feld B vor der Kastration), T_{0D} (am Tag der Kastration), T_{+4W} bis T_{+20W} (fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus) und T_{+36W} nach 36 Wochen (für Feld A, C und D) beziehungsweise 42 Wochen (für Feld B).

In Feld A ist die Gruppe der zweijährigen Kastraten dargestellt. Zum Zeitpunkt T_{-4D} liegt die Streuung der Werte bei den neun Probanden im Bereich zwischen 28 und 53 ng/ml. Die Probanden bleiben trotz einiger individueller Schwankungen und einem wellenförmigen Verlauf bis T_{+20W} in dieser Breite verteilt mit positivem Trend. Proband 27 zeigt zum Zeitpunkt T_{0D} sein relatives Minimum mit 6 ng/ml. Bei T_{+20W} erreichen die Probanden 18, 23 und 29 ihre relativen Maxima im Bereich zwischen 49 und 192 ng/ml. Auch wenn der nachfolgende Wert wieder niedriger ausfällt, sind diese Werte trotzdem höher angesiedelt als die Ausgangswerte bei T_{-4D} und T_{0D} vor der Kastration. Der Wertebereich zum Zeitpunkt T_{+36W} liegt zwischen 47 und 115 ng/ml und ist damit doppelt so hoch wie der Basiswert vor der Kastration.

Für Zeitpunkt T_{+12W} stehen die Probanden 30 und 31, bei T_{+16W} die Probanden 27 und 31, bei T_{+20W} die Probanden 12, 27, 30, 31 und bei T_{+36W} die Probanden 12, 30 und 31 für eine Probennahme nicht zur Verfügung.

In Feld B sind die OC-Werte der dreijährigen Kastraten dargestellt. Bei T_{-4D} verteilen sich die Werte in einem Spektrum zwischen 17 und 52 ng/ml. Zum Zeitpunkt T_{0D} zeigen alle neun Probanden einen niedrigeren Wert als ihren Startwert in annähernd gleich breiter Verteilung. Bei T_{+4W} zeigen fünf von neun Probanden einen Anstieg ihrer OC-Werte, bei drei der vier verbleibenden Probanden wird bei leichtem Abwärtstrend das relative Minimum erst zum Zeitpunkt T_{+8W} erreicht. Die fünf anderen Probanden zeigen einen Aufwärtstrend mit leichter Wellenbewegung mit einem relativen Maximum zum Zeitpunkt 6 respektive 7. Proband 38 erreicht zum Zeitpunkt T_{+20W} ein relatives Minimum mit 23 ng/ml und anschließender positiver Ausgleichsbewegung. Bei T_{+36W} zeigen vier von sechs Probanden einen Abwärtstrend nach Erreichen eines relativen Maximums. Die anderen beiden Probanden haben ihr relatives Minimum bereits überschritten und schließen den Untersuchungszeitraum mit positivem Trend ab. Das Spektrum der Endwerte liegt zwischen 24 und 56 ng/ml. Es ist damit unwesentlich höher als das Spektrum der Ausgangswerte. Ein deutlicher Aufwärtstrend ab der Hälfte des Untersuchungszeitraumes ist zu verzeichnen, an den sich jedoch eine negative Ausgleichsbewegung anschließt.

Zum Zeitpunkt T_{+20W} sind die Probanden 32, zum Zeitpunkt T_{+36W} die Probanden 37 und 40 aus dem Bestand verkauft und stehen für eine Probennahme nicht mehr zur Verfügung.

In Feld C sind die Werte für die zweijährigen Hengste gemeinsam dargestellt. Hier sind die Startwerte von neun der elf Probanden bei T_{-4D} über ein Spektrum von 18 bis 50 ng/ml verteilt. Da die Kurvenverläufe recht individuell sind, werden diese auch hier teils einzeln beschrieben. Zum Zeitpunkt T_{0D} zeigt sich bei sieben Probanden ein Kurvenverlauf mit positiver Steigung. Proband 22 und 25 werden hier erstmals beprobt und befinden sich mit den vorhandenen Messungen mittig im Probenfeld.

Proband 28 erreicht sein relatives Minimum mit 19 ng/ml. Seine Werte steigen in der Folge bis zum Zeitpunkt T_{+20W} kontinuierlich auf einen Wert von 81 ng/ml an.

Die Probanden 14 und 17 erreichen bei T_{+8W} und T_{+20W} je ein relatives Maximum mit verdoppelten Basiswerten, zeigen aber auch jeweils eine Ausgleichsbewegung von ähnlich hoher Amplitude und erreichen zum Zeitpunkt T_{+36W} Werte bei 55 ng/ml. Damit sind sie gleich bzw. etwas höher angesiedelt als ihr Ausgangswert.

Proband 13 ist nur mit den ersten fünf Messwerten vertreten. Er erreicht bei T_{+4W} ein relatives Maximum mit 52 ng/ml. Nach einem Kurvenverlauf mit positiver Steigung fallen die Werte auf einen Wert von 9 ng/ml bei T_{+12W} ab.

Das Feld der anderen Probanden zeigt einen wellenförmigen Verlauf mit unterschiedlicher Amplitude und einem seichten relativen Minimum zum Zeitpunkt T_{+16W} , dem ein relatives Maximum folgt. Der Wertebereich der Untersuchungsergebnisse hat im Verlauf der Messungen zugenommen und befindet sich zum Zeitpunkt T_{+36W} im Bereich zwischen 22 und 84 ng/ml.

Die Probanden 21 stehen bei T_{0D} , die Probanden 16, 21 und 22 bei T_{+20W} und die Probanden 15, 16, 19, 21, und 22 zum Zeitpunkt T_{+36W} für eine Probenentnahme nicht zur Verfügung.

In Feld D sind die OC-Werte der Hengste, älter als sechs Jahre, dargestellt. Die Startwerte zum Zeitpunkt T_{-4D} liegen im Bereich zwischen 7 und 31 ng/ml. Bei T_{0D} steigen die Werte nur bei zwei Probanden an: Proband 10 erreicht sein relatives Maximum mit 38 ng/ml. Bei sieben Probanden fallen die Werte zunächst. Nachfolgend zeigen die Kurven aller Probanden einen wellenförmigen Verlauf mit unterschiedlicher Amplitude bei positivem Trend, so dass das Minimum zum Zeitpunkt T_{0D} zumindest ausgeglichen oder wie bei Proband 3, 8, 9 und 10 überschritten wird. Der Wertebereich bei T_{+36W} liegt zwischen 11 und 40 ng/ml bei sechs untersuchten Probanden. In Relation zu den vorangegangenen Gruppen liegen die Werte der Probanden aus Feld D sehr eng zusammen.

Folgende Proben wurden nicht analysiert: Bei Proband 1 die Proben zu den Zeitpunkten T_{0D} , T_{+12W} bis T_{+36W} , bei Proband 2 die Proben zu den Zeitpunkten T_{+4W} bis T_{+36W} , bei Proband 5 die Proben zu den Zeitpunkten T_{+4W} bis T_{+36W} , bei Proband 6 die Proben zu den Zeitpunkten T_{+20W} und T_{+36W} , bei Proband 9 die Probe zum Zeitpunkt T_{+12W} , bei Proband 10 die Proben zu

den Zeitpunkten T_{+12W} bis T_{+20W} und bei Proband 11 die Proben zu den Zeitpunkten T_{+8W} , T_{+16W} und T_{+20W} .

4.2.2.2 Mittelwerte Osteokalzin-Konzentration

Osteokalzin-Konzentration in ng/ml

Zeitpunkt	Status											
	Feld A: Kastrat 2 Jahre			Feld B: Kastrat 3 Jahre			Feld C: Hengst 2 Jahre			Feld D: Hengst >6 Jahre		
	Mittelwert	Standardabweichung	N	Mittelwert	Standardabweichung	N	Mittelwert	Standardabweichung	N	Mittelwert	Standardabweichung	N
T_{-4D}	32,29	11,86	9	41,06	10,26	9	33,39	11,53	9	15,91	8,70	10
T_{0D}	27,83	19,09	9	31,59	8,67	9	41,35	12,19	10	13,87	10,93	9
T_{+4W}	35,72	9,81	9	35,94	6,91	9	39,54	13,82	11	10,30	7,97	8
T_{+8W}	34,50	9,98	9	36,24	6,98	9	39,21	16,51	11	10,09	5,62	7
T_{+12W}	50,89	14,53	7	43,50	14,04	9	36,34	13,34	11	15,20	11,16	5
T_{+16W}	44,89	14,82	7	48,54	12,30	9	35,31	12,49	9	13,93	9,50	4
T_{+20W}	103,48	57,33	5	53,76	17,72	8	68,26	20,53	7	17,98	9,34	4
T_{+36W}	77,18	23,66	6	40,97	12,86	6	40,46	14,83	5	27,27	10,80	6

Tabelle 8: Übersicht der Mittelwerte und Standardabweichung der Osteokalzin-Konzentration in den Feldern A bis D

T_{-4D} (vier Tage für Feld A, C und D und elf Tage für Feld B vor der Kastration), T_{0D} (am Tag der Kastration), T_{+4W} bis T_{+20W} (fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus) und T_{+36W} nach 36 Wochen (für Feld A, C und D) beziehungsweise 42 Wochen (für Feld B), N: Probandenzahl.

Bei der Betrachtung der Mittelwerte kann aus der Tabelle Folgendes abgelesen werden: In Feld A liegt der Mittelwert bei den Zweijährigen vor der Kastration bei $32,29 \pm 11,86$ ng/ml zum Zeitpunkt T_{-4D} mit einer Probandenanzahl von $n = 9$. Der Mittelwert bei T_{0D} , der direkt vor der Kastration bestimmt wurde, ist etwas niedriger. Zudem weist er eine etwas breitere Streuung auf. Die nachfolgend ermittelten Werte von Zeitpunkt T_{+4W} bis T_{+36W} fallen höher aus als die gemessenen Startwerte. Zunächst steigt der Mittelwert vier Wochen nach der Kastration (T_{+4W}) auf $35,72 \pm 9,81$ ng/ml mit $n = 9$ an. Acht Wochen nach der Kastration (T_{+8W}) ist der Wert mit $34,5 \pm 9,98$ ng/ml mit $n = 9$ ähnlich hoch, bei fast identischer Standardabweichung. Bei T_{+12W} kann ein Mittelwert von $50,89 \pm 14,53$ ng/ml mit $n = 7$ gemessen werden, mit größer werdender Standardabweichung und verringerter Probandenzahl. Bei T_{+16W} kann ein Wert von $44,89 \pm 14,82$ ng/ml mit $n = 7$ gemessen werden, der zwar kleiner als der vorangegangene Wert ausfällt, aber noch immer über den Startwerten liegt. Zum Zeitpunkt T_{+20W} reduziert sich die Zahl der ausgewerteten Proben auf fünf, damit nimmt auch die Standardabweichung deutlich zu; der Mittelwert liegt bei $103,48 \pm 57,33$ ng/ml. Bei T_{+36W} kann ein Mittelwert von $77,18 \pm 23,66$ ng/ml gebildet werden. Dieser Wert ist bei der Probandenanzahl von $n = 6$ und der Standardabweichung von 23,66 ng/ml mehr als doppelt so hoch wie bei den ersten beiden Messungen.

Die dreijährigen Hengste in Feld B weisen bei T_{-4D} mit $41,06 \pm 10,26$ ng/ml und $31,59 \pm 8,67$ ng/ml unmittelbar vor der Kastration (T_{0D}) mit je neun Probanden höhere Mittelwerte auf, verglichen mit den Werten in Feld A. Anschließend ist der Verlauf gleichbleibend. Ab Zeitpunkt T_{+12W} bis T_{+20W} kann ein kontinuierlich steigender Mittelwert von $35,94 \pm 6,91$ ng/ml bis zu $53,76 \pm 17,72$ ng/ml errechnet werden. Zum Zeitpunkt T_{+20W} reduziert sich die Probandenzahl auf $n = 8$. Bei T_{+36W} kann ein Wert von $40,97 \pm 12,86$ ng/ml mit insgesamt sechs Probanden ermittelt werden. Der Verlauf der Werte dieser Probanden ist vergleichbar mit dem Werteverlauf der Probanden aus Feld A in abgeschwächter Art. Bei beiden Gruppen

nehmen die OC-Werte nach der Kastration zu und erreichen zum Zeitpunkt T_{+20W} ihren Höhepunkt. Anschließend sinkt der folgende Mittelwert.

Feld C bildet mit den verbleibenden zweijährigen Hengsten die Kontrollgruppe zu Feld A. Die Mittelwerte der ersten beiden Messungen liegen bei $33,39 \pm 11,53$ ng/ml mit $n=9$ bei T_{-4D} und $41,35 \pm 12,19$ ng/ml mit $n=10$ bei T_{0D} . Diese Werte fallen etwas höher aus, als die Mittelwerte in Feld A und zeigen eine kleinere Standardabweichung. Nachfolgend werden die Mittelwerte mit einer Probandenanzahl von $n=11$ kontinuierlich kleiner bis zum Zeitpunkt T_{+16W} . Sie fallen von einem Mittelwert mit $39,54 \pm 54$ ng/ml bei T_{+4W} bis auf einen Mittelwert von $35,31 \pm 12,49$ ng/ml bei T_{+16W} mit $n=9$. Zum Zeitpunkt T_{+20W} wird ein Peak der Gruppe mit $68,26 \pm 20,53$ ng/ml mit nur noch sieben Probanden erreicht. Damit wird auch hier ein relativer Maximalwert erreicht, der aber um 30% kleiner ausfällt als im Feld A. Zum Zeitpunkt T_{+36W} wird ein Mittelwert von $40,46 \pm 14,83$ ng/ml mit nur fünf Probanden erreicht, der im Wertebereich der zweiten Messung liegt, jedoch nicht erhöht ist, wie bei Feld A und Feld B.

Im Feld D wird die Gruppe der adulten Hengste (maximale Probandenzahl 10) dargestellt, deren Mittelwerte im Bereich zwischen $10,30 \pm 7,97$ ng/ml mit $n=7$ und $27,27 \pm 10,80$ ng/ml mit $n=6$ ml leicht schwanken. Ein relatives Maximum wird bei T_{+36W} mit $n=6$ erreicht, ein relatives Minimum bei T_{+4W} mit $n=8$. Die relativen Maxima finden nicht zu den gleichen Zeitpunkten statt wie bei Feld A bis C.

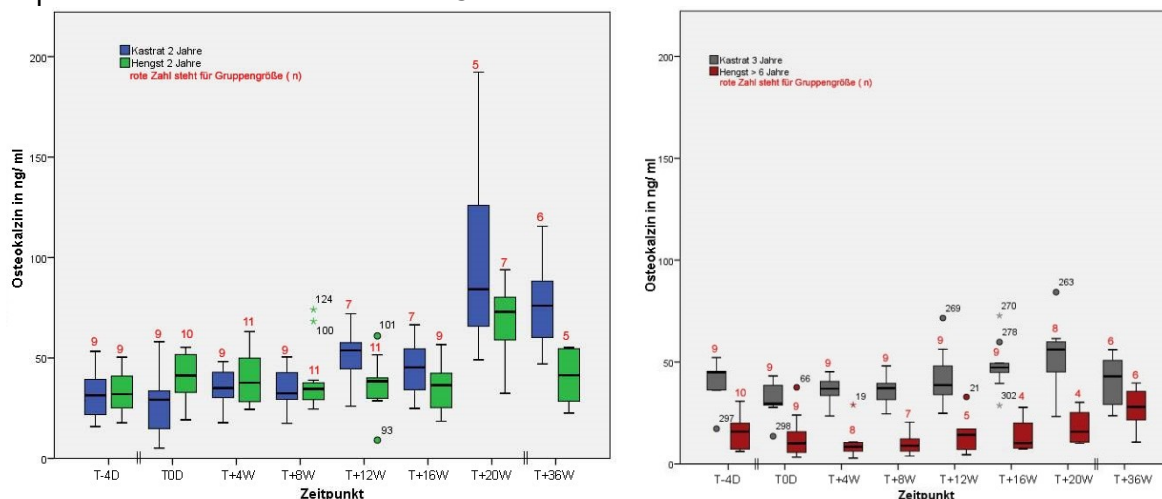


Abbildung 13: Vergleichende Boxplotdarstellung zur Osteokalzin-Konzentrationen der Felder A und C (links) sowie der Felder B und D (rechts) zu den jeweiligen Zeitpunkten T_{-4D} (vier Tage für Feld A, C und D und elf Tage für Feld B vor der Kastration), T_{0D} (am Tag der Kastration), T_{+4W} bis T_{+20W} (fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus) und T_{+36W} nach 36 Wochen (für Feld A, C und D) beziehungsweise 42 Wochen (für Feld B), n : Gruppengröße.

Die Unterschiede der Mittelwerte für OC sind in Abbildung 5 dargestellt. Zum Zeitpunkt T_{+12W} und T_{+36W} sind die Unterschiede zwischen Feld A und Feld C signifikant. Weitere signifikante Effekte zwischen Feld A und C konnten nicht mit $p \leq 0,05$ abgesichert werden. Zwischen Feld D und allen verbleibenden Gruppen bestehen signifikante Unterschiede der mittleren OC-Konzentration zu den Zeitpunkten T_{-4D} , T_{+4W} bis T_{+12W} und T_{+36W} .

4.2.2.3 Einordnung der Osteokalzin-Werte der nachträglich Kastrierten aus Feld C

Zeitpunkt -angepasst-	Proband 15	Proband 16	Proband 19	Mw ± SD von Feld A in ng/ml	Mw ± SD von Feld C in ng/ml	
$T_{\text{corr}+4W}$		69,20		35,72 ± 9,81	39,54 ± 13,82	T_{+4W}
$T_{\text{corr}+16W}$	41,23	74,52	161,42	44,89 ± 14,81	35,31 ± 12,49	T_{+16W}
$T_{\text{corr}+20W}$				103,48 ± 57,33	68,26 ± 20,53	T_{+20W}

Tabelle 9: Darstellung Osteokalzin-Einzelwerte der nachträglich Kastrierten aus Feld C zu den Mittelwerten

T_{+4W} : 4 Wochen nach der Kastration, T_{+16W} : 16 Wochen nach der Kastration T_{+20W} : 20 Wochen nach der Kastration. Bei den „angepassten“ Zeitpunkten ($T_{\text{corr}+4W}$, $T_{\text{corr}+16W}$ und $T_{\text{corr}+20W}$) wird der Messwert der zu einem anderen Zeitpunkt als zum Zeitpunkt T_0 kastrierten Tiere im zeitlich gleichen Verhältnis mit den Mittelwerten der vergleichbaren Probanden verglichen. Eine mögliche Saisonalität der Werte kann nicht berücksichtigt werden. Mw: Mittelwert; SD: Standardabweichung; ng/ml: Nanogramm/ milliliter.

Wie aus der vorliegenden Tabelle 9 abgelesen werden kann, steigt die Konzentration des OCs bei den nachträglich kastrierten Probanden aus Feld C an. Auch gegenüber den Probanden in Feld A sind die Werte der Probanden 16 und 19 höher ausgefallen, so dass von einer stärkeren Aktivität des OCs nach der Kastration, als es für die Probanden in Feld A beispielhaft war, auszugehen ist.

Eine Einschätzung OC-Konzentration hinsichtlich eines saisonalen Knochenaufbaus ist nur begrenzt möglich, wäre aber für die höheren Werte eine potentielle Erklärung. Denn zu den beiden letzten Messpunkten T_{+20W} und T_{+36W} konnte bei allen Zweijährigen eine größere OC-Konzentration gemessen werden als zu den sechs früheren Zeitpunkten.

4.2.2.4 Ergebniszusammenfassung für Osteokalzin

Bei der Bestimmung der OC-Konzentration zeigen sich für Feld C vor T_{+4W} zunächst etwas höhere Mittelwerte als für Feld A, die aber ab T_{+12W} für Feld A um fast ein Drittel höher ausfallen und fortan auch auf einem höheren Niveau verlaufen. Diese Differenz kann zu T_{+36W} als statistisch signifikant mit $p \leq 0.05$ abgesichert werden.

Der Verlauf der Werte für Feld B ist mit dem Werteverlauf der Probanden aus Feld A in abgeschwächter Art vergleichbar.

Bei der Betrachtung der Einzelergebnisse fällt auf, dass die jüngeren Tiere deutlich höhere Grundniveaus und deutlich höhere Amplitudenausschläge zeigen, als dies im Vergleich dazu die Werte der älteren Tiere in Feld D zeigen. In Relation zu den vorangegangenen Gruppen liegen die Werte der Probanden aus Feld D in einem engen Wertebereich.

4.2.3 Carboxy-terminales Telopeptid des Typ-I-Kollagens

4.2.3.1 Einzelwerte für die Konzentration des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I Kollagens

In Feld A werden die Einzelverläufe der zweijährigen Kastraten dargestellt. Zu T_{-4D} liegen alle Werte der Probanden in einem Bereich zwischen 149 und 271 pg/ml. Zum Zeitpunkt T_{0D} fallen alle Werte bis auf den des Probanden 30. Dieser Proband zeigt mit 292 pg/ml hier ein relatives Maximum. Proband 23 limitiert zu diesem Zeitpunkt die untere Grenze des Feldes mit knapp 23 pg/ml. Die Spanne der Werteverteilung ist vergrößert. Bei T_{+4W} zeigt sich bei allen Probanden ein höherer Wert als zum Zeitpunkt T_{0D} . Dabei fällt auf, dass die Spanne der Werteverteilung kleiner wird. Im Gegensatz dazu wird der Wert des Probanden 30 kleiner, liegt aber noch oberhalb seines Ausgangswertes zum Zeitpunkt T_{-4D} . Der Wertebereich des Feldes zum Zeitpunkt T_{+4W} liegt zwischen 156 und 346 pg/ml. Bei T_{+8W} erreichen sieben von neun Probanden ein Maximum. Proband 30 erreicht sein Minimum, das aber noch oberhalb seines Startwertes bei T_{-4D} liegt, mit rückläufiger Tendenz. Die Probanden 12 und 18 zeigen

ein relatives Minimum, steigen aber im Werteverlauf danach wieder an. Der Wertebereich zum Zeitpunkt T_{+8W} liegt zwischen 224 und 400 pg/ml. Zum Zeitpunkt T_{+12W} können noch sieben Proben mit in die Messung einbezogen werden. Dabei zeigen fünf Probanden niedrigere Werte als zum vorherigen Zeitpunkt. Proband 18 erreicht hier sein relatives Maximum. Das Spektrum der Werte liegt im Bereich zwischen 224 und 393 pg/ml. Zum Zeitpunkt T_{+16W} nehmen die Werte von sechs Probanden kontinuierlich weiter ab, Proband 12 erreicht hier ein relatives Maximum mit 449 pg/ml. Bei den Probanden mit Abwärtstrend liegt der Wertebereich zwischen 224 und 345 pg/ml. Zum Zeitpunkt T_{+20W} erreichen zwei von fünf Probanden ein relatives Minimum und zeigen bei T_{+36W} wieder steigende Werte. Die drei verbleibenden Probanden folgen weiter einem Abwärtstrend. Der Wertebereich liegt hier zwischen 178 und 224 pg/ml. Zum Zeitpunkt T_{+36W} zeigt sich bei drei von sechs Probanden im Verhältnis zu ihrem letzten gemessenen Wert ein Aufwärtstrend. Die verbleibenden drei Probanden erreichen ein relatives Minimum. Der Wertebereich zur Messung T_{+36W} liegt zwischen 120 und 313 pg/ml und vergrößert wenig.

Bei T_{+12W} stehen die Probanden 30 und 31, bei T_{+16W} die Probanden 27 und 31, bei T_{+20W} die Probanden 12, 27, 30, 31 und bei T_{+36W} die Probanden 12, 30 und 31 für eine Probennahme nicht zur Verfügung.

In Feld B sind die Werte der dreijährigen Kastraten im Verlauf dargestellt. Der Wert T_{0D} wird als erster Messwert und somit als Startwert ausgegeben. Dabei zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung der Werte in einem Bereich von 70 bis 241 pg/ml. Zum Zeitpunkt T_{+4W} zeigen alle

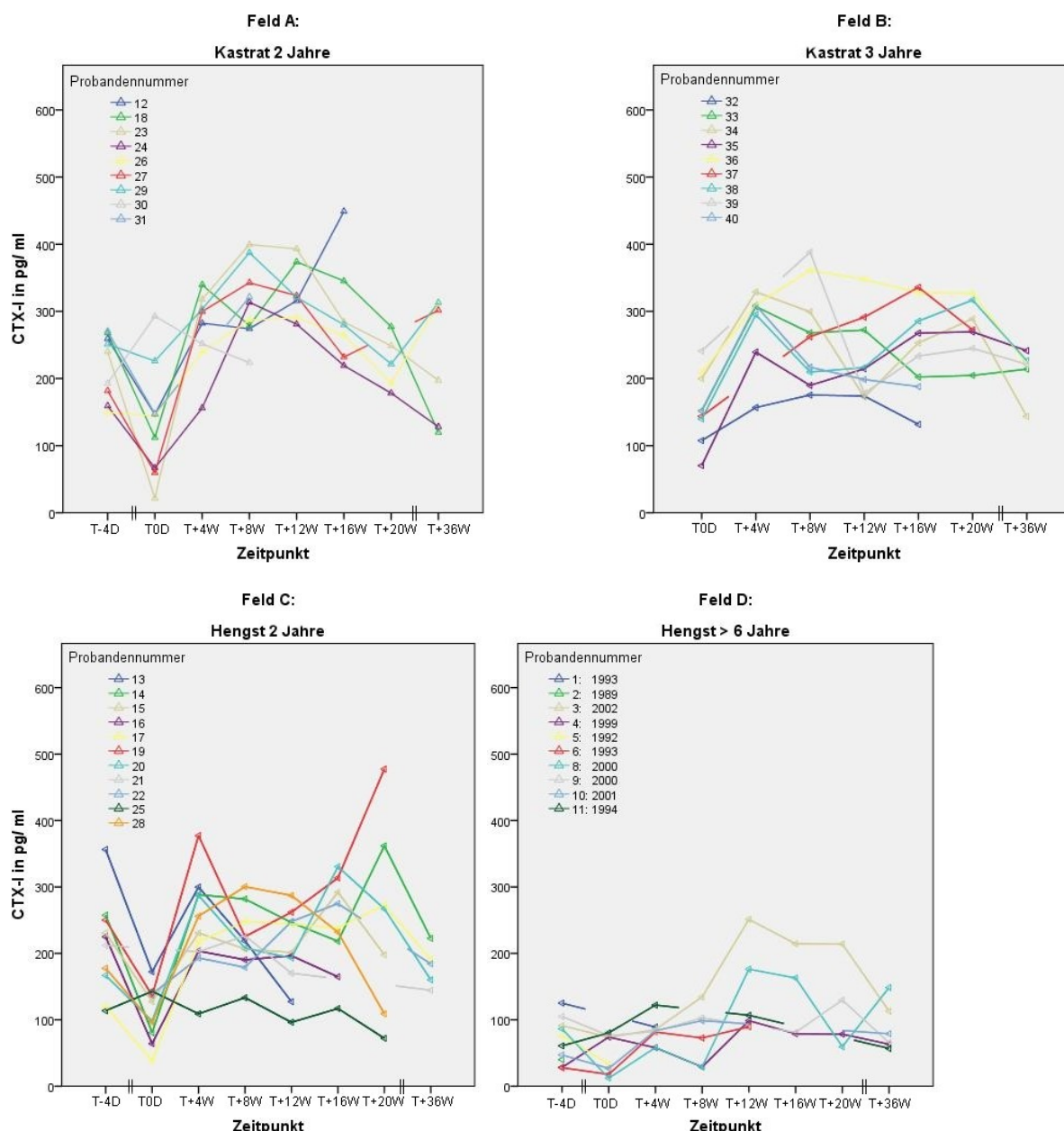


Abbildung 14: Liniendiagramm der Konzentration des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I Kollagens zu den Zeitpunkten der Probandengruppen (Feld A bis D)

Im Feld D sind zusätzlich die Geburtsjahrgänge eingezeichnet. T_{-4D} (vier Tage für Feld A, C und D und elf Tage für Feld B vor der Kastration), T_{0D} (am Tag der Kastration), T_{+4W} bis T_{+20W} (fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus) und T_{+36W} nach 36 Wochen (für Feld A, C und D) beziehungsweise 42 Wochen (für Feld B).

gemessenen Probanden einen Anstieg der Werte in einen Bereich zwischen 157 und 329 pg/ml. Charakteristisch bei der Verteilung der Werte ist, dass sechs von sieben Probanden eine fast identische Steigung im Kurvenverlauf zeigen. Zum Zeitpunkt T_{+8W} zeigt sich bei fünf von neun Probanden eine negative Steigung der Kurve bis auf Werte, die aber noch deutlich oberhalb des Startwertes bei T_{0D} liegen. Die Werte von drei Probanden erreichen erst hier ihr relatives Maximum. Bei Proband 6 zeigt sich ein deutlicher Anstieg im Kurvenverlauf.

Zum Zeitpunkt T_{+12W} ist das Messergebnis für jeden Probanden individuell beschrieben. Die Probanden 31, 36 und 40 zeigen einen sanften Abwärtstrend, die Probanden 34 und 39 einen deutlichen Abwärtstrend auf Werte unterhalb ihres Startniveaus. Die Probanden 35, 37

und 38 zeigen Graphen mit positiver Steigung. Die Streuung der Werte liegt in einem Bereich von 178 und 348 pg/ml und vergrößert sich damit.

Zum Zeitpunkt T_{+16W} zeigen die Werte von fünf der neun Probanden wieder eine positive Steigung im Kurvenverlauf. Proband 37 erreicht ein relatives Maximum, die Probanden 32 und 40 ein relatives Minimum, welches aber noch oberhalb ihres Startwertes liegt. Zum Zeitpunkt T_{+20W} steigen bei fünf von sieben Probanden die Messwerte geringgradig an. Bei Proband 35 und 37 fallen sie ab. Bei T_{+36W} erreichen fünf von sechs verbleibenden Probanden ein relatives Minimum im Bereich zwischen 241 und 221 pg/ml. Die Werte von Proband 33 zeigen im Kurvenverlauf eine positive Steigung.

Für den Zeitpunkt T_{+4W} konnte für den Probanden 37 kein Wert ermittelt werden. Bei T_{+20W} sind die Probanden 32, bei T_{+36W} die Probanden 37 und 40 aus dem Bestand verkauft und stehen für eine Probennahme nicht mehr zur Verfügung.

Bei den Probanden dieses Feldes lässt sich zusammenfassen, dass nach T_{0D} ein Anstieg zu verzeichnen ist, der individuell im weiteren Kurvenverlauf schwankt: Nach einem positivem Peak folgt ein relatives Minimum. Anschließend zeichnet sich ein Aufwärtstrend ab. Die Probanden, außer 34 und 39, erreichen jeweils höhere Endwerte als ihr Ausgangswert zum Zeitpunkt T_{0D} .

In Feld C wird die Gruppe der zweijährigen Kontrollhengste dargestellt. Die zehn Messwerte bei T_{-4D} sind in einem Wertebereich zwischen 114 und 356 pg/ml breit verteilt, mit einer Häufung im Bereich zwischen 167 und 258 pg/ml. Zum Zeitpunkt T_{0D} stellen sich die neun ermittelten Werte teilweise erheblich niedriger dar als der Vorgängerwert. Die nachfolgenden Kurvenverläufe werden einzeln beschrieben:

Nach einem relativen Maximum des Probanden 13 zum Zeitpunkt T_{+4W} mit 300 pg/ml zeigt die Kurve eine kontinuierliche, negative Steigung bis zu einem Wert von 127 pg/ml.

Proband 14 erreicht zum Zeitpunkt T_{+4W} ein relatives Maximum mit allmählich abflachendem Kurvenverlauf, bis ein relatives Maximum bei T_{+16W} mit 218 pg/ml erreicht wird. Anschließend zeigt der Wert des Probanden einen Peak mit 362 pg/ml bei T_{+20W} und eine Ausgleichsbewegung mit negativer Steigung zum Zeitpunkt T_{+36W} .

Proband 15 zeigt einen schwankenden Kurvenverlauf ab Zeitpunkt T_{+4W} . Sein relatives Maximum liegt zum Zeitpunkt T_{+16W} bei 292 pg/ml und sein relatives Minimum zum Zeitpunkt T_{+20W} bei 198 pg/ml. Ein Trend ist diesem pendelnden Kurvenverlauf nicht zu entnehmen.

Proband 16 erreicht zum Zeitpunkt T_{+4W} ein relatives Maximum mit 204 pg/ml. Die zwei nachfolgenden Werte schwanken gering und werden kontinuierlich niedriger, so dass ein relatives Minimum mit 89 pg/ml zum Zeitpunkt T_{+20W} erreicht wird. Der letzte Messwert liegt wieder bei 132 pg/ml.

Der Wert des Probanden 17 steigt zum Zeitpunkt T_{+4W} auf einen Wert von 218 pg/ml. Die Kurve setzt sich mit einer minimalen Zickzackbewegung mit Aufwärtstrend zu ihrem relativen Maximum bei T_{+20W} mit 273 pg/ml und anschließend direkt einem relativem Minimum bei 191 pg/ml fort.

Die Werte des Probanden 19 zeigen eine Zickzackbewegung mit einem deutlichen Maximum zum Zeitpunkt T_{+4W} , fallen dann ab und steigen anschließend ab T_{+12W} wieder kontinuierlich, bis der Höchstwert der Gruppe mit 553 pg/ml bei T_{+36W} erreicht wird.

Proband 20 erreicht zum Zeitpunkt T_{+4W} ein relatives Maximum mit 287 pg/ml und ein relatives Maximum mit 331 pg/ml zum Zeitpunkt T_{+16W} . Anschließend fallen die Werte kontinuierlich auf einen Endwert bei T_{+36W} mit 160 pg/ml. Auch hier zeigt sich eine Pendelbewegung mit großer Amplitude bei zunächst gleichbleibendem Trend.

Proband 21 erreicht mit 227 pg/ml bei T_{+8W} ein relatives Maximum und zeigt einen Kurvenverlauf mit Abwärtstrend und einem relativem Minimum bei 145 pg/ml; damit liegt dieser Wert unterhalb des Startwertes.

Proband 22 zeigt eine leichte Pendelbewegung der Werte mit positivem Trend und einem relativem Maximum zum Zeitpunkt T_{+16W} . Der nachfolgend gemessene Wert bei T_{+36W} liegt mit 184 pg/ml wieder niedriger und markiert ein relatives Minimum. Dieser Wert liegt aber noch oberhalb des Startwertes zum Zeitpunkt T_{0D} .

Proband 25 zeigt zunächst einen leichten Anstieg der Messwerte, der aber zum Zeitpunkt T_{+4W} wieder abfällt und im weiteren Verlauf bis T_{+20W} kontinuierlich mit leichten Zickzackbewegungen abnimmt und ein Niveau unterhalb seines Startwertes erreicht.

Proband 28 zeigt ab dem Zeitpunkt T_{0D} einen parabelförmigen Kurvenverlauf mit einem relativen Maximum mit 300 pg/ml zum Zeitpunkt T_{+8W} , einem zunehmendem Gefälle und einem relativen Minimum zum Zeitpunkt T_{+20W} mit 109 pg/ml.

Die Probanden 21 stehen zum Zeitpunkt T_{0D} , die Probanden 16, 21 und 22 zum Zeitpunkt T_{+20W} und die Probanden 15, 16, 19, 21, und 22 zum Zeitpunkt T_{+36W} zur Blutentnahme nicht zur Verfügung.

Über den gesamten Zeitraum der Probennahmen sind die Werte der zweijährigen Hengste breit gestreut. Nach einem Minimum zu T_{0D} mit rückläufigen Werten kommt es zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten positiven Ausgleichsbewegung, die nachfolgend in einen zickzackförmigen Kurvenverlauf übergeht. Dabei ist bis auf ein Minimum zum Zeitpunkt T_{0D} kein gemeinsamer Trend des Kurvenverlaufs festzulegen.

In Feld D sind die Werte der zehn Hengste dargestellt, die älter als sechs Jahre alt sind. Die Startwerte aller Tiere zum Zeitpunkt T_{-4D} liegen zwischen 28 und 125 pg/ml. Proband 1 ist mit zwei Werten bei T_{-4D} und T_{+4W} vertreten, mit leichter Abwärtstendenz.

Für Proband 2 ist ein Einzelwert zum Zeitpunkt T_{-4D} ermittelt worden.

Bei Proband 3 konnten alle Proben ausgewertet werden mit einem relativen Maximum zum Zeitpunkt T_{0D} mit 74 pg/ml. Anschließend steigt die Kurve bis T_{+12W} auf ein relatives Maximum mit 251 pg/ml, das auch das Maximum dieser Gruppe darstellt. Zu den nachfolgenden Zeitpunkten sinkt die Kurve fast auf das Niveau ihres Ausgangswertes zurück.

Ebenfalls vollständig verzeichnet sind die Werte des Probanden 4. Hier zeigt sich ein zickzackförmiger Kurvenverlauf mit relativen Maxima zu den Zeitpunkten T_{0D} und T_{+12W} , die anschließend fast wieder das Ausgangsniveau erreichen.

Proband 5 ist mit zwei Werten vertreten, die von Zeitpunkt T_{-4D} zu T_{0D} um mehr als die Hälfte abnehmen.

Proband 6 hat zum Zeitpunkt T_{0D} ein relatives Minimum. Es schließt sich eine zickzackförmige Ausgleichsbewegung mit positivem Trend an. Die letzten drei Messwerte wurden nicht bestimmt.

Die Werte von Proband 8 haben ein relatives Minimum bei T_{0D} mit einem Minimumwert der Gruppe von 12 pg/ml. Es folgt eine Zickzackbewegung mit hohem Maximum zum Zeitpunkt T_{+12W} und anschließend steilem Abfall des Graphen. Der Kurvenverlauf ist dem Kurvenverlauf von Proband 3 ähnlich. Zum Zeitpunkt T_{+36W} zeigt sich bei Proband 8 der höchste Wert der Gruppe mit 149 pg/ml mit zunächst positiver Tendenz.

Die Kurve von Proband 9 zeigt zum Zeitpunkt T_{0D} eine geringe Abwärtstendenz, die in einer geringen Zickzackbewegung mit zunehmender Amplitude fortgesetzt wird. Dabei liegt der Endwert unterhalb des Ausgangswertes. Ein relatives Maximum wird zum Zeitpunkt T_{+20W} mit 130 pg/ml erreicht.

Proband 10 erreicht ein relatives Minimum zum Zeitpunkt T_{0D} . Danach steigt die Kurve leicht an auf ein relatives Maximum zum Zeitpunkt T_{+8W} auf 99 pg/ml. Der Endwert zum Zeitpunkt T_{+36W} liegt jedoch knapp darunter. Die Messwerte von T_{+12W} bis T_{+20W} fehlen.

Die Werte des Probanden 11 steigen kontinuierlich vom Ausgangswert auf ein relatives Maximum zum Zeitpunkt T_{+4W} . Die weiteren Messwerte von T_{+12W} und T_{+36W} lassen eine negative Steigung auf ein Niveau unterhalb des Ausgangswertes vermuten.

Folgende Proben wurden nicht analysiert: Bei Proband 1 die Proben zum Zeitpunkt T_{0D} und zum Zeitpunkt T_{+12W} bis T_{+36W} , bei Proband 2 die Proben zum Zeitpunkt T_{+4W} bis T_{+36W} , bei Proband 5 die Proben zum Zeitpunkt T_{+4W} bis T_{+36W} , bei Proband 6 die Proben zum Zeitpunkt T_{+20W} und T_{+36W} , bei Proband 9 die Probe zum Zeitpunkt T_{+12W} , bei Proband 10 die Proben zum Zeitpunkt T_{+12W} bis T_{+20W} und bei Proband 11 die Proben zum Zeitpunkt T_{+8W} , T_{+16W} und T_{+20W} .

4.2.3.2 Mittelwerte der Konzentration des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I-Kollagens

Konzentration des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I Kollagens in pg/ml

Zeitpunkt	Status											
	Feld A: Kastrat 2 Jahre			Feld B: Kastrat 3 Jahre			Feld C: Hengst 2 Jahre			Feld D: Hengst > 6 Jahre		
	Mittelwert	Standardabweichung	N	Mittelwert	Standardabweichung	N	Mittelwert	Standardabweichung	N	Mittelwert	Standardabweichung	N
T _{-4D}	219,06	48,28	9	keine Messung			210,96	71,63	10	68,82	33,40	10
T _{0D}	135,30	84,59	9	157,19	52,49	9	109,53	41,17	10	49,21	29,34	8
T _{+4W}	273,74	57,81	8	278,00	60,41	7	242,33	70,60	11	82,52	20,06	8
T _{+8W}	314,20	56,26	9	263,38	74,69	9	219,76	46,42	11	77,79	42,60	6
T _{+12W}	328,34	41,13	7	229,40	61,24	9	206,54	58,65	11	144,45	68,83	5
T _{+16W}	296,30	78,68	7	247,22	66,47	9	242,31	69,68	9	134,32	66,17	4
T _{+20W}	223,66	40,33	5	274,83	41,86	7	251,20	141,00	7	120,34	69,11	4
T _{+36W}	228,55	91,92	6	211,25	34,44	6	180,12	30,00	5	87,66	35,94	6

Tabelle 10: Übersicht der Mittelwerte und Standardabweichung der Konzentration des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I Kollagens in den Feldern A bis D

T_{-4D} (vier Tage für Feld A, C und D und elf Tage für Feld B vor der Kastration), T_{0D} (am Tag der Kastration), T_{+4W} bis T_{+20W} (fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus) und T_{+36W} nach 36 Wochen (für Feld A, C und D) beziehungsweise 42 Wochen (für Feld B); N: Probandenanzahl.

Bei der Betrachtung der Mittelwerte in Feld A werden Ausgangswerte vor der Kastration bei T_{-4D} und T_{0D} von $219,06 \pm 48,28$ pg/ml und $135,30 \pm 84,59$ pg/ml bei einer Probandenanzahl von $n = 9$ ausgegeben. Vier Wochen nach der Kastration, zum Zeitpunkt T_{+4W}, stellt sich der Mittelwert mit $273,74 \pm 57,81$ pg/ml bei einer Probandenanzahl von $n = 8$ höher dar als zu beiden vorhergehenden Messpunkten. Im weiteren Verlauf steigt der Mittelwert bis zum Zeitpunkt T_{+12W} auf $328,34 \pm 41,13$ pg/ml an. Zum Zeitpunkt T_{+8W} werden neun Probanden berücksichtigt. Anschließend wird der Mittelwert bei T_{+16W} etwas kleiner mit $296,30 \pm 78,68$ pg/ml mit $n = 7$ und erreicht zum Zeitpunkt T_{+20W} mit $223,66 \pm 40,33$ pg/ml ein relatives Minimum. Zum Zeitpunkt T_{+36W} wird ein Mittelwert von $228,55 \pm 91,92$ pg/ml erreicht. Ab T_{+20W} steigt die Anzahl der Probanden von fünf auf sechs bei T_{+36W} bei annähernd gleichbleibender Standardabweichung. Die Mittelwerte sinken ab T_{+4W} nicht mehr auf das Niveau von T_{-4D} oder T_{0D}.

Bei den Probanden in Feld B kann nur zu T_{0D} unmittelbar vor der Kastration ein Mittelwert von $157,19 \pm 52,49$ pg/ml von neun Probanden ermittelt werden. Der anschließend gemessene Wert mit $278,00 \pm 60,41$ pg/ml mit $n = 7$ liegt 56,5% höher als der Startwert. Die beiden nachfolgenden Mittelwerte nehmen kontinuierlich bis Zeitpunkt T_{+12W} ab, mit einem Mittelwert von $229,40 \pm 61,24$ pg/ml mit $n = 9$, steigen anschließend aber wieder an auf ein relatives Maximum zum Zeitpunkt T_{+20W} mit $n = 7$. Bei T_{+36W} wird ein Mittelwert von $211,25 \pm 34,44$ pg/ml bestimmt mit noch sechs Probanden.

In Feld C wird die Kontrollgruppe zu Feld A dargestellt. Die beiden Ausgangs-Mittelwerte zu T_{-4D} und T_{0D} ergeben $210,96 \pm 71,63$ pg/ml und $109,53 \pm 41,17$ pg/ml mit einer Probandenzahl von $n = 10$. Die nachfolgend gemessenen Werte steigen zunächst an. Zum Zeitpunkt T_{+4W} kann ein Mittelwert von $242,33 \pm 70,60$ pg/ml mit elf Probanden bestimmt werden. Anschließend sinkt der Mittelwert bis Zeitpunkt T_{+12W} kontinuierlich auf $206,54 \pm 58,65$ pg/ml. Dann steigt er bei T_{+16W} auf $242,31 \pm 69,68$ pg/ml an bei einer auf neun reduzierten Probandenanzahl. Die nachfolgend gemessenen Mittelwerte liegen bei $251,20 \pm 141,00$ pg/ml und $180,12 \pm 30,00$ pg/ml mit je sieben bzw. fünf Probanden. Dabei fällt eine große Standardabweichung bei T_{+20W} deutlich auf. Die Werte der Kontrollgruppe bewegen sich wellenförmig im Bereich knapp oberhalb der gemessenen Ausgangswerte.

In Feld D wird die verbleibende Gruppe der adulten Hengste betrachtet. Die Mittelwerte liegen in einem Bereich von $49,21 \pm 29,34$ pg/ml mit 8 Probanden und $144,45 \pm 68,83$ pg/ml mit fünf Probanden verteilt. Zum Zeitpunkt T_{+12W} wird ein relatives Maximum erreicht, das allmählich ausläuft und zum Zeitpunkt T_{+36W} einen Wert von $87,66 \pm 35,94$ pg/ml mit $n = 6$ erreicht.

Das Wertenniveau der Althengste ist deutlich niedriger angesiedelt als bei den jüngeren Probanden, was auch in der Boxplotdarstellung (Abbildung 7) deutlich wird. Die Unterschiede der Mittelwerte sind zum Zeitpunkt T_{+8W} und T_{+12W} zwischen Feld A und Feld C signifikant. Weitere signifikante Effekte zwischen Feld A und C zu weiteren Zeitpunkten konnten nicht mit $p \leq 0.05$ abgesichert werden.

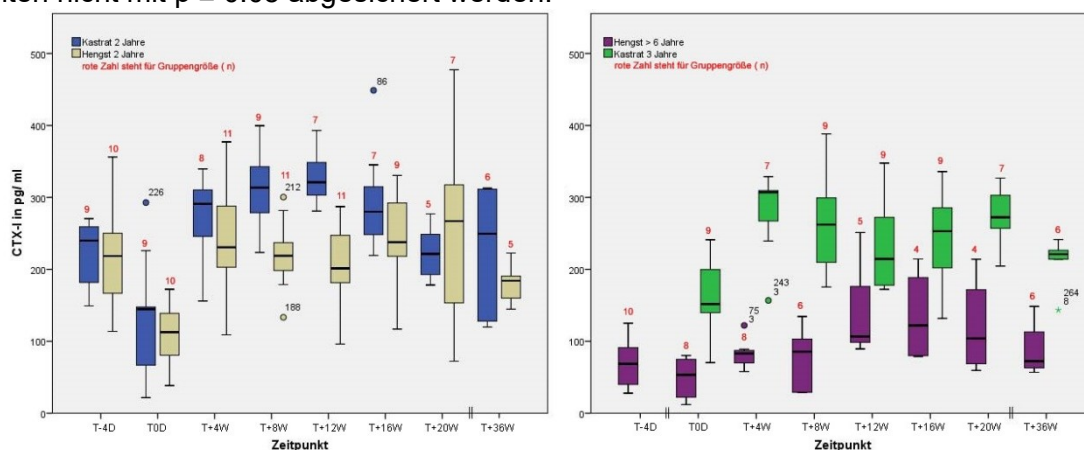


Abbildung 15: Vergleichende Boxplotdarstellung zur Konzentration des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I Kollagens der Felder A und C (links) sowie der Felder B und D (rechts) zu den jeweiligen Zeitpunkten

T_{-4D} (vier Tage für Feld A, C und D und elf Tage für Feld B vor der Kastration), T_{0D} (am Tag der Kastration), T_{+4W} bis T_{+20W} (fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus) und T_{+36W} nach 36 Wochen (für Feld A, C und D) beziehungsweise 42 Wochen (für Feld B); n : Gruppengröße.

4.2.3.3 Einordnung der Werte des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I-Kollagens der nachträglich Kastrierten aus Feld C

Zeitpunkt - angepasst-	Proband 15	Proband 16	Proband 19	Mw \pm SD von Feld A in pg/ml	Mw \pm SD von Feld C in pg/ml	
$T_{corr+4W}$		89,44		$273,74 \pm 57,81$	$242,33 \pm 70,60$	T_{+4W}
$T_{corr+16W}$	278,20	131,50	553,40	$296,30 \pm 78,68$	$242,31 \pm 69,68$	T_{+16W}
$T_{corr+20W}$				$223,66 \pm 40,33$	$251,20 \pm 141,00$	T_{+20W}

Tabelle 11: Darstellung der Konzentration des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I Kollagens der nachträglich Kastrierten aus Feld C zu den Mittelwerten

T_{+4W} : vier Wochen nach der Kastration, T_{+16W} : 16 Wochen nach der Kastration T_{+20W} : 20 Wochen nach der Kastration. Bei den „angepassten“ Zeitpunkten ($T_{corr+4W}$, $T_{corr+16W}$ und $T_{corr+20W}$) wird der Messwert der zu einem anderen Zeitpunkt als zum Zeitpunkt T_0 kastrierten Tiere im zeitlich gleichen Verhältnis mit den Mittelwerten der vergleichbaren Probanden verglichen. Eine mögliche Saisonalität der Werte kann nicht berücksichtigt werden. Mw: Mittelwert; SD: Standardabweichung; ng/ml: nanogramm/ milliliter.

Wie aus der oben dargestellten Tabelle abzulesen ist, fallen die CTX-I Werte für die aus Feld C nachträglich kastrierten Probanden unterschiedlich aus. Bei Proband 15 und 19 zeigten sich erhöhte Konzentrationen von CTX-I gegenüber den Werten der Probanden in Feld C zu den angepassten Zeitpunkten. Bei Proband 16 nimmt die Konzentration des CTX-I zwar zu, erreicht aber dennoch nicht die Wert der Probanden in Feld A. Auffällig war außerdem die gleichzeitig erhöhte Konzentration des OCs in Gruppenvergleich. Eine

Erklärung für diese auffälligen Werte kann nicht erbracht werden. Die klinische Untersuchung zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probennahme war unauffällig.

4.2.3.4 Ergebniszusammenfassung für die Konzentration des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I-Kollagens

Bei der Messung der Werte für CTX-I zeigt sich vor der Kastration für Feld A und C ein ähnlicher Wertebereich. Ab Zeitpunkt T_{+4W} übertrifft Feld A deutlich die Werte von Feld C bis einschließlich T_{+16W} , unterschreitet bei T_{+20W} den Median von Feld C und fällt bei T_{+36W} wieder etwas höher aus. Zu den Zeitpunkten T_{+8W} und T_{+12W} kann der Unterschied zu Feld C als signifikant dargestellt werden. Nach der Kastration steigert sich die CTX-I-Konzentration bei den Probanden in Feld A bis einschließlich zum Zeitpunkt T_{+16W} . Zum Zeitpunkt T_{+36W} zeigt sich ein breiter Streuungsbereich. Die Werte der Kastraten in Feld B zeigen einen ähnlichen Verlauf wie Feld A. Zum Ende des Messzeitraumes zeigen sie noch höhere Werte als die Probanden in Feld C.

Bei der Betrachtung des inhomogenen Alters des Feldes D lässt sich deutlich charakterisieren, dass die jüngeren Probanden die deutlichen Maxima der Gruppe einnehmen, während die älteren Tiere nur eine Zickzackbewegung im Bereich ihres individuellen Ausgangswertes zeigen. Insgesamt fällt bei den Probanden aus Feld D auf, dass der Wertebereich deutlich niedriger liegt als bei den Zwei- und Dreijährigen.

4.2.4 Testosteron

4.2.4.1 Einzelwerte für die Testosteron-Konzentration

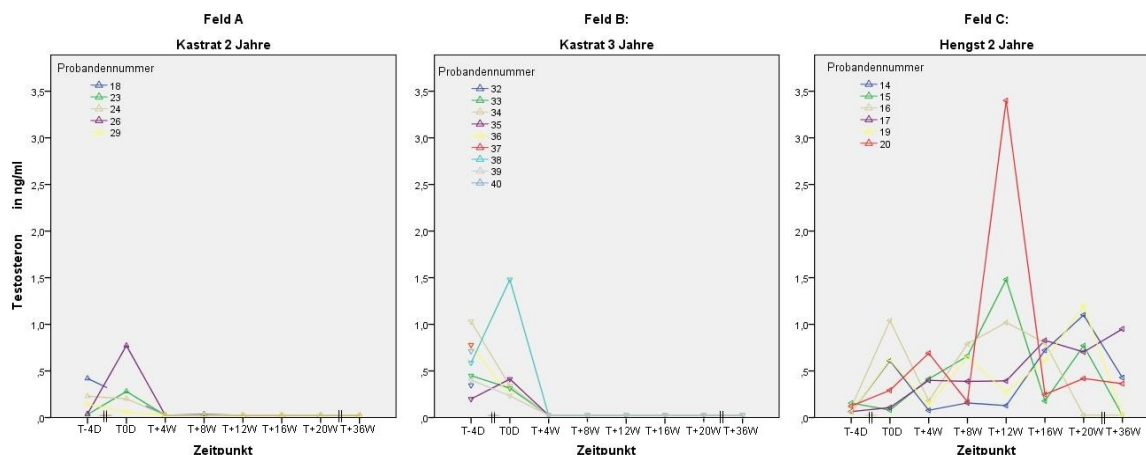


Abbildung 16: Liniendiagramm zur Darstellung der Testosteron-Konzentrationen zu den jeweiligen Zeitpunkten für Feld A bis C

T_{-4D} (vier Tage für Feld A, C und elf Tage für Feld B vor der Kastration), T_{0D} (am Tag der Kastration), T_{+4W} bis T_{+20W} (fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus) und T_{+36W} nach 36 Wochen (für Feld A und C) beziehungsweise 42 Wochen (für Feld B).

In Feld A sind die Werte der zweijährigen Kastraten zusammengefasst. Die Werte der Probanden 18, 23, 24, 26 und 29 liegen in einem engen Bereich zwischen 0,04 und 0,42 ng/ml. Zum Zeitpunkt T_{0D} zeigt Proband 26 mit 0,77 ng/ml die höchste T-Konzentration in Feld A. Zu Zeitpunkt T_{0D} konnte die Probe von Proband 18 aufgrund eines zu geringen Gesamtprobenvolumens nicht berücksichtigt werden. Die verbleibenden Probanden zeigen Werte im Bereich zwischen 0,20 und 0,30 ng/ml. Ab dem Zeitpunkt der Kastration (T_{+4W}) sinken die Werte und bleiben kontinuierlich im Bereich unterhalb der Nachweisgrenze dieses Tests.

In Feld B sind die Werte der dreijährigen Kastraten zusammengefasst. Das Startspektrum aller Probanden liegt im Bereich zwischen 0,20 und 0,78 ng/ml und ist damit über einen größeren Bereich gestreut als bei den zweijährigen Hengsten. Die nachfolgenden Proben sind nur für die Probanden 33, 34, 35, 36, 38 und 39 gemessen worden. Proband 38 erreicht zum Zeitpunkt T_{0D} den Spitzenwert von 1,48 ng/ml. Die Werte der anderen Probanden liegen im Bereich zwischen 0,20 und 0,35 ng/ml. Auch hier ist ab dem Zeitpunkt T_{0D} eine Abnahme der T-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Verfahrens bis zum Zeitpunkt T_{+36W} festzustellen.

In Feld C sind die zweijährigen Hengste gemeinsam dargestellt. Zum Zeitpunkt T_{-4D} liegt das Probandenfeld (14, 15, 16, 17, 19 und 20) in einem Bereich mit einer T-Konzentration zwischen 0,06 und 0,16 ng/ml. Die nachfolgenden Werte lassen sich nicht zusammenfassen: Proband 14 zeigt zum Zeitpunkt T_{0D} ein relatives Maximum mit einer Konzentration von 0,61 ng/ml. Anschließend fallen die Werte ab, in einen Wertebereich zwischen 0,08 und 0,16 ng/ml in zickzackförmigen Verlauf, steigen dann aber zum Zeitpunkt T_{+20W} auf einen Wert von 1,10 ng/ml. Zum Zeitpunkt T_{+36W} fällt dieser Wert auf 0,43 ng/ml.

Proband 15 zeigt bei T_{0D} ein relatives Minimum mit 0,08 ng/ml. Anschließend steigen die Werte und erreichen bei positiver Steigung bei T_{+12W} einen Wert von 1,48 ng/ml. Die anschließend gemessenen Werte zeigen eine Schwankung im Bereich zwischen 0,18 und 0,77 ng/ml. Der letzte Messwert nach der Kastration bei T_{+36W} liegt unterhalb der Nachweisgrenze des Tests.

Bei Proband 16 zeigt sich ein Maximum zum Zeitpunkt T_{0D} mit 1,04 ng/ml. Die Werte fallen anschließend auf 0,18 ng/ml ab und steigen danach wieder kontinuierlich bis zum Zeitpunkt T_{+12W} an. Die Messwerte nach der Kastration bei T_{+20W} und T_{+36W} liegen unterhalb der Nachweisgrenze.

Die Werte bei Proband 17 zeigen einen kontinuierlich, langsam ansteigenden Kurvenverlauf mit einem Maximum bei 0,95 ng/ml zum Zeitpunkt T_{+36W} und einem Zwischenpeak bei T_{+16W} . Der Kurvenverlauf der Werte des Probanden 19 zeigt eine Zickzackbewegung im Bereich zwischen 0,13 und 0,65 ng/ml und zum Zeitpunkt T_{+20W} ein Maximum mit 1,20 ng/ml. Bei Zeitpunkt T_{+36W} liegen die Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze.

Die Werte des Probanden 20 erreichen zum Zeitpunkt T_{+4W} ein relatives Maximum bei 0,69 ng/ml, fallen anschließend und erreichen nach erneutem Anstieg zum Zeitpunkt T_{+12W} das Maximum der gesamten Gruppe mit 3,40 ng/ml. Nachfolgend fallen sie auf einen Wert von 0,25 ng/ml. Die Werte zeigen einen zickzackförmigen Verlauf zwischen 0,36 und 0,41 ng/ml. Die zum Zeitpunkt T_{-4D} gemessenen Werte liegen in einem sehr engen Spektrum im Vergleich zu der weiteren Entwicklung der Testosteron-Konzentrationen der Probanden. Trotz der zickzackförmigen Kurvenverläufe erreichen die einzelnen Probanden einen höheren T-Spiegel im Blut als bei ihrem jeweiligen, individuellen Ausgangswert zum Zeitpunkt T_{-4D} .

Der Abfall der Werte der Probanden 15, 16 und 19 unterhalb der Nachweisgrenze ($< 0,025$ ng/ml) ist durch ihre Kastration bedingt. Diese Probanden zeigen auch zu diesen Zeitpunkten bei der E_2 -Bestimmung Werte unterhalb der Nachweisgrenze.

4.2.4.2 Mittelwerte Testosteron-Konzentration

Testosteron-Konzentration in ng/ml

Zeitpunkt	Status								
	Feld A: Kastrat 2 Jahre			Feld B: Kastrat 3 Jahre			Feld C: Hengst 2 Jahre		
	Mittelwert	Standard-abweichung	N	Mittelwert	Standard-abweichung	N	Mittelwert	Standard-abweichung	N
T_{-4D}	0,173	0,160	5	0,587	0,261	9	0,095	0,041	6
T_{0D}	0,328	0,310	4	0,502	0,484	6	0,458	0,369	6
T_{+4W}	0,025	0,000	5	0,025	0,000	6	0,316	0,230	6
T_{+8W}	0,027	0,004	5	0,025	0,000	6	0,468	0,270	6
T_{+12W}	0,025	0,000	5	0,025	0,000	6	1,116	1,230	6
T_{+16W}	0,025	0,000	5	0,025	0,000	6	0,565	0,283	6
T_{+20W}	0,025	0,000	5	0,025	0,000	6	0,703	0,436	6
T_{+36W}	0,025	0,000	5	0,025	0,000	6	0,303	0,366	6

Tabelle 12: Übersicht der Mittelwerte und Standardabweichung der Testosteron-Konzentrationen in den Feldern A bis C

Ab einer Testosteron-Konzentration von 0,025 ng/ml wird ein Wert unterhalb der Nachweisgrenze erreicht. T_{-4D} (vier Tage für Feld A, C und D und elf Tage für Feld B vor der Kastration), T_{0D} (am Tag der Kastration), T_{+4W} bis T_{+20W} (fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus) und T_{+36W} nach 36 Wochen (für Feld A und C) beziehungsweise 42 Wochen (für Feld B), N: Probandenanzahl.

Die deutlichen Ergebnisse der Einzelfallbesprechung spiegeln sich auch bei der Betrachtung der Mittelwerte und der Standardabweichungen wieder. In Feld A werden für Zeitpunkt T_{-4D} und T_{0D} die Mittelwerte $0,173 \pm 0,160$ ng/ml mit einer Probandenanzahl von $n = 5$ und $0,328 \pm 0,310$ ng/ml mit $n = 4$. Ab T_{+4W} , also nach der Kastration, verlaufen die Werte unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testverfahrens bei allen fünf Probanden.

Ebenso verhalten sich die Mittelwerte für das Feld B. Hier können für die beiden Zeitpunkte vor der Kastration Mittelwerte mit $0,587 \pm 0,261$ ng/ml mit $n = 9$ und $0,502 \pm 0,484$ ng/ml mit $n = 6$ gemessen werden. Die nachfolgend gemessenen Werte liegen bei allen 6 Probanden unterhalb der Nachweisgrenze von 0,025 ng/ml.

Bei der Kontrollgruppe im Feld C verlaufen die Mittelwerte schwankend zwischen $0,095 \pm 0,041$ ng/ml und $1,116 \pm 1,230$ ng/ml. Ein Peak wird zum Zeitpunkt T_{+12W} (Januar) erreicht.

Das Minimum wird zu Zeitpunkt T_{-4D} (Oktober/ November) gemessen. Für die E_2 -Werte konnte das Maximum ebenfalls für Zeitpunkt 5 und das Minimum für Zeitpunkt 2 festgelegt werden.

4.2.4.3 Ergebniszusammenfassung für Testosteron

Spätestens vier Wochen nach der Kastration fallen die T-Konzentrationen der Probanden aus Feld A und Feld B unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Tests. Dabei liegen die Basiswerte der Dreijährigen höher als die der Zweijährigen. Der Verlauf der jeweiligen Graphen über den beobachteten Zeitraum von Feld C ist zunehmend mit starken Schwankungen und deutlichen Maxima.

4.2.5 Östradiol

4.2.5.1 Einzelwerte Östradiol-Konzentration

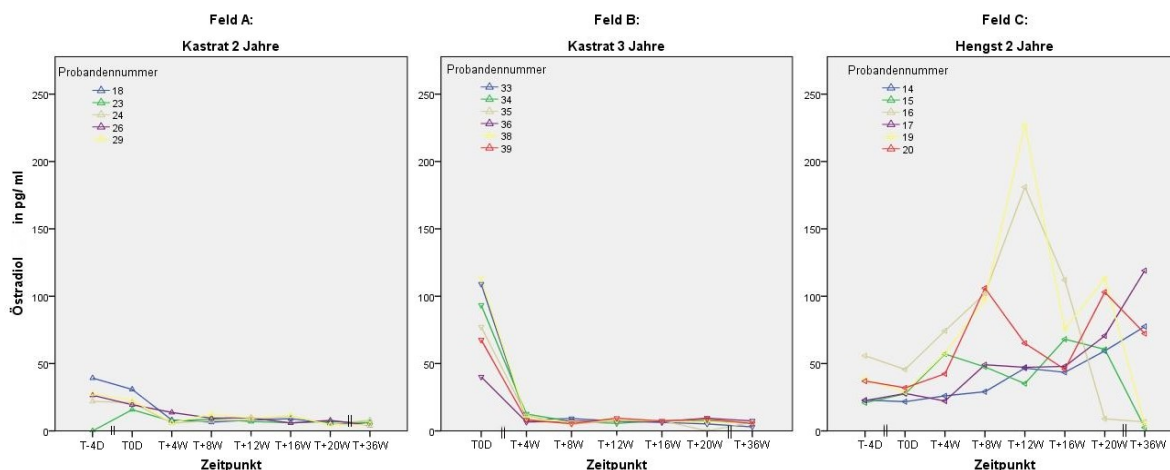


Abbildung 17: Liniendiagramm zur Darstellung der Östradiol-Konzentrationen zu den jeweiligen Zeitpunkten für Feld A bis C

T_{-4D} (vier Tage für Feld A, C und elf Tage für Feld B vor der Kastration), T_{0D} (am Tag der Kastration), T_{+4W} bis T_{+20W} (fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus) und T_{+36W} nach 36 Wochen (für Feld A und C) beziehungsweise 42 Wochen (für Feld B).

Bei der vorliegenden Grafik sind die E_2 -Konzentrationen auf die Zeitachse zu den acht Zeitpunkten aufgetragen. Dabei sind die Werte der jeweiligen Probanden in ihren Gruppen dargestellt. Es wurden für die Messung nur vollständig vorliegende Zeitreihen berücksichtigt. Bei der Gruppe der zweijährigen Kastraten im Feld A zeigt sich bei Proband 18 der höchste E_2 -Wert zum Zeitpunkt T_{-4D} . Der Folgewert ist ebenfalls der höchste gemessene Wert der Gruppe. Nach der Kastration nach dem Zeitpunkt T_{0D} wird ein Basalwert zwischen 5 und 10 pg/ml erreicht. Die Probanden 24, 26 und 29 haben einen ersten Messwert um 25 pg/ml, beim zweiten Zeitpunkt liegt dieser etwas niedriger, um 20 pg/ml. Bei Proband 23 war das Probenvolumen bei T_{-4D} für eine Messung nicht ausreichend. Der weitere Verlauf des Graphen verhält sich ähnlich wie bei den anderen Probanden.

Bei den dreijährigen Kastraten im Feld B beginnt die Messung erst bei T_{0D} . Die E_2 -Werte der Probanden 33, 34, 35, 36, 38, und 39 liegen zwischen 40 und 113 pg/ml. Ab dem zweiten Messwert sinken diese Werte auf einen Basalwert zwischen 2,5 und 10 pg/ml bis zum Messpunkt T_{+36W} .

Bei der Gruppe der zweijährigen Kontrollhengste in Feld C bewegen sich die Messwerte bei allen Probanden (14, 15, 16, 17, 19 und 20) in einem Bereich zwischen 21 und 61 pg/ml bei T_{-4D} und T_{0D} . Bei den nachfolgenden Zeitpunkten nehmen die Werte teils deutlich zu, teils schwanken sie. Sie enden jeweils bei mehr als 150 % ihres Startwerts. Bei Proband 16 sinkt der E-Wert ab Zeitpunkt T_{+20W} auf ein Basalniveau zwischen 9 und 6 pg/ml. Die Probanden 15 und 19 erreichen zum letzten Messpunkt ebenfalls ein Basalniveau um 2,5 und 5 pg/ml. Zu diesem Zeitpunkt und diesen Messwerten ist eine hormonelle Aktivität des

Hodengewebes ausgeschlossen. Die Pferde wurden vor dem jeweiligen Messzeitpunkt kastriert.

Bei der Analyse der drei Grafiken lassen sich folgende allgemeine Aussagen treffen: Bis zur Kastration ab dem Messpunkt T_{0D} haben die dreijährigen Hengste gegenüber den zweijährigen eine deutlich höhere E_2 -Ausschüttung. Bereits vier Wochen nach der Kastration lassen sich bei allen diesen Probanden nur noch Basalwerte im Bereich zwischen 2,5 und 10 pg/ml messen. Diese Konzentration an E_2 wird von der Nebennierenrinde fortwährend produziert. Die zweijährigen Hengste hingegen erreichen deutliche Maxima. Der Endwert liegt deutlich höher als ihr Startwert. Die Werte der Probanden 15, 16, und 19 sinken aufgrund der Kastration auf die Basalwerte ab.

4.2.5.2 Mittelwerte Östradiol-Konzentration

Östradiol-Konzentration in pg/ml

Zeitpunkt	Status								
	Feld A: Kastrat 2 Jahre			Feld B: Kastrat 3 Jahre			Feld C: Hengst 2 Jahre		
	Mittelwert	Standard-abweichung	N	Mittelwert	Standard-abweichung	N	Mittelwert	Standard-abweichung	N
T_{-4D}	23,04	14,37	5	-keine Messung-			32,90	13,58	6
T_{0D}	21,94	5,57	5	83,38	27,55	6	30,57	8,09	6
T_{+4W}	8,20	3,20	5	9,38	2,22	6	46,60	20,18	6
T_{+8W}	8,96	2,29	5	6,65	1,52	6	71,90	33,71	6
T_{+12W}	8,54	1,13	5	7,52	1,22	6	100,32	82,18	6
T_{+16W}	8,70	2,66	5	7,22	0,52	6	65,47	26,29	6
T_{+20W}	5,94	1,43	5	6,27	3,43	6	69,25	37,04	6
T_{+36W}	5,52	1,55	5	5,63	1,47	6	47,15	49,26	6

Tabelle 13: Übersicht der Mittelwerte und Standardabweichung der Östradiol-Konzentrationen in den Feldern A bis C

T_{-4D} (vier Tage für Feld A, C und elf Tage für Feld B vor der Kastration), T_{0D} (am Tag der Kastration), T_{+4W} bis T_{+20W} (fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus) und T_{+36W} nach 36 Wochen (für Feld A und C) beziehungsweise 42 Wochen (für Feld B), N: Probandenanzahl.

In Feld A, der Gruppe der zweijährigen Kastraten, ergibt sich ein Mittelwert von $23,04 \pm 14,37$ pg/ml zum Zeitpunkt T_{-4D} und von $21,94 \pm 5,57$ pg/ml zum Zeitpunkt T_{0D} vor der Kastration. Bei den Messungen nach der Kastration ergeben sich E_2 -Mittelwerte von T_{+4W} bis T_{+16W} im Bereich von $8,20 \pm 3,20$ pg/ml bis $8,96 \pm 2,29$ pg/ml. Ab Zeitpunkt T_{+20W} sinken die Mittelwerte auf $5,94 \pm 1,43$ und $5,52 \pm 1,55$ pg/ml zum Zeitpunkt T_{+36W} . Die Probandenanzahl liegt konstant bei $n = 5$.

Die Messergebnisse beginnen in Feld B mit Messung T_{0D} , direkt vor der Kastration. Es kann ein Mittelwert von $83,38 \pm 27,55$ pg/ml berechnet werden, der für eine größere hormonelle Aktivität der Dreijährigen im Vergleich zu den Zweijährigen spricht. Bei den nachfolgenden Messungen wird ein höchster Mittelwert zum Zeitpunkt T_{+4W} mit nur $9,38 \pm 2,22$ pg/ml und ein niedrigster Mittelwert zum Zeitpunkt T_{+36W} von $5,63 \pm 1,47$ pg/ml bestimmt. Die Probandenanzahl liegt konstant bei $n = 6$.

In Feld C werden zweijährige Hengste als Kontrollgruppe zum Feld A beprobt und deren Mittelwerte bestimmt. Der Ausgangswert zum Zeitpunkt T_{-4D} beträgt $32,90 \pm 13,58$ pg/ml. Zur Zuchtsaison steigen die Mittelwerte mit großer Streuung kontinuierlich an bis auf einen Wert von $100,32 \pm 82,18$ pg/ml zum Zeitpunkt T_{+12W} und fallen mit Schwankungen auf einen Mittelwert zum Zeitpunkt T_{+36W} von $47,15 \pm 49,26$ pg/ml. In Feld C ist die Standardabweichung sehr groß, gefolgt von variierenden, steigenden Mittelwerten. Die Probandenanzahl liegt konstant bei $n = 6$.

4.2.5.3 Ergebniszusammenfassung für Östradiol

Wie auch bei der Bestimmung der T-Konzentration zu beobachten war, fallen die Werte des E_2s nach der Kastration auf einen Wert in den Bereich der Nachweisgrenze. Die Basiswerte zu Zeitpunkt T_{0D} in Feld B sind doppelt so hoch angesiedelt wie in Feld A. In Feld C verlaufen die Graphen mit positivem Trend und zeigen auch hier deutliche Maxima zeitgleich mit den Maxima bei T.

4.2.6 Verhältnis Knochenstoffwechselmarkern zu Steroidhormonen

4.2.6.1 Einzelwerte des Verhältnisses von Knochenstoffwechselmarkern zu Geschlechtshormonen

Bei dieser Betrachtung sind die Probanden aus Feld C als zweijährige Hengste berücksichtigt worden. Hier kann dargestellt werden, wie sich die untersuchten Hormone im zeitlichen Verlauf auf den Knochenstoffwechsel auswirken.

Die Einzeldarstellungen der Graphen der BALP mit T fallen nicht eindeutig aus. Ein relatives Maximum der T-Konzentration ist mit einer positiven Steigung der BALP verbunden. Eine Ausnahme bilden die Probanden 15 und 19.

Für CTX-I und T kann formuliert werden, dass jedes relative Minimum von Testosteron mit einem Maximum der CTX-I-Konzentration zur gleichen Zeit oder spätestens dem darauf folgenden Zeitpunkt verbunden ist.

Für OC und T kann keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Bei den Einzeldarstellungen von E_2 mit BALP ist jeweils für 50% der Fälle ein Maximum des E_2s mit einem Maximum der BALP-Konzentration verbunden.

Bei der Darstellung der E_2 - und OC-Konzentrationen sind die Maxima in weniger als 50% übereinstimmend.

Bei der Darstellung des E_2s mit CTX-I lässt sich hingegen verallgemeinern, dass nach einem Minimum des E_2s ein Maximum für CTX-I stattfindet oder zum nächsten Messpunkt folgt. Die Maxima für E_2 werden durch ein Minimum für CTX-I zum gleichen Zeitpunkt bzw. vier Wochen später gekennzeichnet.

4.2.6.2 Mittelwerte des Verhältnisses von Knochenstoffwechselmarkern zu Geschlechtshormonen

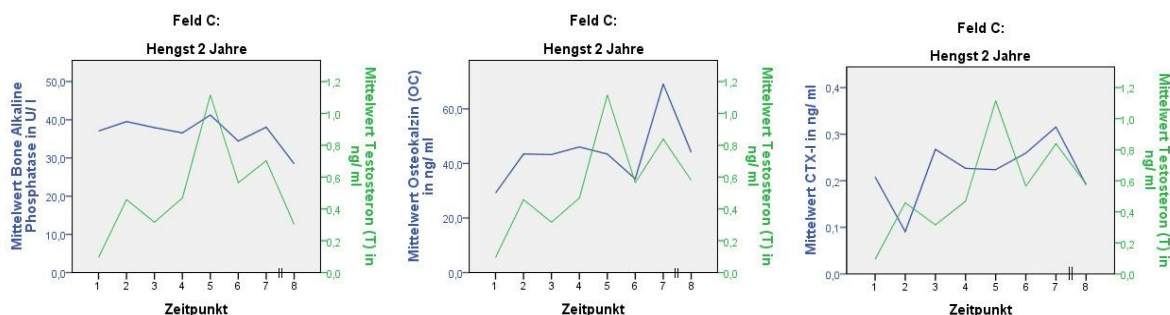


Abbildung 18: Liniendiagramme für Feld C der Knochenmarker Bone Alkaline Phosphatase (links), Osteokalzin (mittig) und Carboxy-terminales Telopeptid des Typ-I Kollagens (rechts) im Verhältnis zur mittleren Testosteron-Konzentration. Zeitpunkt 1 entspricht T_{-4D} , Zeitpunkt 2 T_{0D} , Zeitpunkt 3 bis 7 T_{+4W} bis T_{+20W} und Zeitpunkt 8 T_{+36W} .

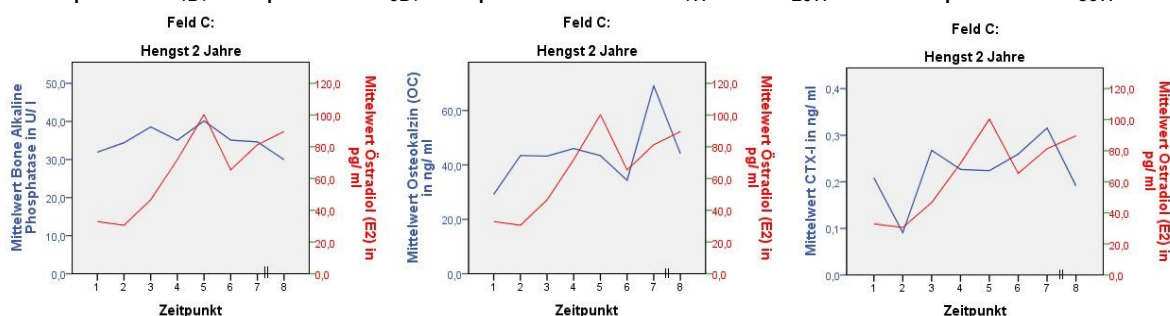


Abbildung 19: Liniendiagramme für Feld C der Knochenmarker Bone Alkaline Phosphatase (links), Osteokalzin (mittig) und Carboxy-terminales Telopeptid des Typ-I Kollagens (rechts) im Verhältnis zur mittleren Östradiol-Konzentration. Zeitpunkt 1 entspricht T_{-4D} , Zeitpunkt 2 T_{0D} , Zeitpunkt 3 bis 7 T_{+4W} bis T_{+20W} und Zeitpunkt 8 T_{+36W} .

Bei den vorliegenden Grafiken sind die Mittelwerte der Knochenmarker im direkten Vergleich zu den Mittelwerten von T und E_2 dargestellt.

Bei der Betrachtung der Mittelwerte für BALP und T fällt auf, dass jeweils die Maxima bei BALP mit den Maxima für Testosteron zu den gleichen Zeitpunkten T_{0D} , T_{+12W} und T_{+20W} auftreten, bei leichter Abwärtstendenz von BALP.

Für E_2 tritt nur zeitgleich zum Zeitpunkt T_{+12W} ein Maximum auf, zum Zeitpunkt T_{+20W} und T_{+36W} verlaufen die Kurven gegenläufig. Im Vergleich zu T verläuft die Kurve des E_2 s mit einem sanfteren Anstieg, einem deutlichen Peak zeitgleich zum T-Peak und weniger relativen Maxima, als sie bei der T-Kurve ausgeprägt sind.

Bei der Betrachtung der Mittelwerte für OC und T zeigt sich für beide Kurvenverläufe bei T_{0D} jeweils ein Maximum, ebenso bei T_{+20W} . Relative Minima treten für beide Kurvenverläufe zum Zeitpunkt T_{+4W} und T_{+16W} auf. Das Maximum von T zum Zeitpunkt T_{+12W} findet sich nicht im Kurvenverlauf von OC wieder.

Für Östradiol zeigt sich zum Zeitpunkt T_{+16W} ebenfalls ein Minimum. Der Kurvenverlauf ist etwas flacher als der von T.

Bei der Betrachtung der Mittelwerte für CTX-I und T zeigt sich ein inverses Verhalten. Die Maxima von T sind durch Minima von CTX-I zu den Zeitpunkten T_{0D} und T_{+12W} gekennzeichnet. Zum Zeitpunkt T_{+36W} zeigt sich für beide Kurven eine positive Tendenz.

Für E_2 zeigt sich zu den relativen Maxima zum Zeitpunkt T_{+12W} und T_{+36W} jeweils ein relatives Minimum des CTX-I. Nach den Minima bei T_{0D} und T_{+16W} des E_2 s folgt direkt ein relatives Maximum des CTX-I zu Zeitpunkt T_{+4W} und T_{+20W} .

4.2.6.3 Ergebniszusammenfassung des Verhältnisses Knochenstoffwechselmarker zu Steroidhormonen

Anhand der untersuchten Kurvenverläufe lässt sich zusammenfassend feststellen, dass T einen Einfluss auf die Knochenbildung bei den zweijährigen Hengsten auszuüben scheint oder den gleichen Einflüssen unterliegt. Mit den jeweiligen Peaks im Kurvenverlauf für BALP ist auch ein Peak bei T zu erkennen. Bei OC konnte dieser Zusammenhang nicht so deutlich dargestellt werden. Jedoch verlaufen die Minima und zwei von drei Maxima parallel. Für CTX-I ergibt sich, dass zu den relativen Maxima des E_2 s zu allen Zeitpunkten jeweils ein relatives Minimum für CTX-I zu verzeichnen ist. Nach den relativen Minima des E_2 s folgt nach etwa vier Wochen ein relatives Maximum des CTX-I. Somit scheint E_2 einen Einfluss auf den Knochenabbau auszuüben. Für die Einzelbetrachtungen scheint diese Regelmäßigkeit nicht immer zuzutreffen, wofür vermutlich weitere Einflussgrößen (siehe Abbildung 1) in Bezug auf den Knochenstoffwechsel verantwortlich sind.

4.2.7 Korrelationen

4.2.7.1 Darstellung der Korrelationen nach Pearson

Pearson		Bone Alkaline Phosphatase	Osteokalzin	CTX-I	Östradiol	Testosteron
Bone Alkaline Phosphatase	Korrelation nach Pearson	1.000	.345**	.285**	-.106	-.070
	Signifikanz (2-seitig)		.000	.000	.232	.413
	N	244	245	234	130	138
Osteokalzin	Korrelation nach Pearson	.345**	1.000	.405**	-.143	-.085
	Signifikanz (2-seitig)	.000		.000	.105	.322
	N	245	255	243	130	138
CTX-I	Korrelation nach Pearson	.285**	.405**	1.000	-.127	-.171
	Signifikanz (2-seitig)	.000	.000		.152	.054
	N	234	243	141	129	128
Östradiol	Korrelation nach Pearson	-.106	-.143	-.127	1.000	.536**
	Signifikanz (2-seitig)	.232	.105	.152		.000
	N	130	130	129	130	129
Testosteron	Korrelation nach Pearson	-.070	-.085	-.171	.536**	1.000
	Signifikanz (2-seitig)	.413	.322	.054	.000	
	N	138	138	128	129	138

** : Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0.01 (2-seitig) signifikant.

Tabelle 14: Darstellung der Korrelationen nach Pearson für die untersuchten Parameter
CTX-I: Carboxyterminales Telopeptid des Typ I Kollagens, N: Probandenanzahl.

Mit der Bestimmung von Korrelationen nach Pearson (r_p) innerhalb der Messergebnisse dieser Arbeit ergibt sich ein sehr signifikanter, linearer Zusammenhang zwischen den Knochenaufbaumarkern OC und BALP von $r_p = 0.345$. Ein weiterer sehr signifikanter Zusammenhang zeigt sich zwischen BALP und CTX-I von $r_p = 0.285$, der aber etwas kleiner ist als der sehr signifikante Zusammenhang mit $r_p = 0.405$ zwischen OC und CTX-I. Als

weitere sehr signifikante Korrelation ergibt sich zwischen den Merkmalen T und E₂ ein Wert von $r_p = 0.536$.

Pearson		Geburtsdatum	Osteokalzin
Geburtsdatum	Korrelation nach Pearson	1	.437**
	Signifikanz (2-seitig)	80	.001
	N		53
Osteokalzin	Korrelation nach Pearson	.437**	1
	Signifikanz (2-seitig)	.001	
	N	53	53

** : Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0.01 (2-seitig) signifikant.

Tabelle 15: Darstellung der Korrelationen nach Pearson für die Parameter Osteokalzin und das Geburtsdatum

N: Probandenzahl.

Eine ebenfalls sehr signifikante Korrelation ergibt sich für das Alter der Hengste aus Feld D und die Ergebnisse des OC von $r_p = 0.437$. Dieser Zusammenhang kann mit einem Niveau von $P \leq 0.01$ statistisch abgesichert werden.

4.2.7.2 Darstellung der Korrelationen nach Spearman

Spearman-Rho		Bone Alkaline Phosphatase	Osteokalzin	CTX-I	Östradiol	Testosteron
Bone Alkaline Phosphatase	Korrelationskoeffizient	1.000	.393**	.290**	-.163	-.118
	Sig. (2-seitig)		.000	.000	.063	.169
	N	244	245	234	130	138
Osteokalzin	Korrelationskoeffizient	.393**	1.000	.457**	.206*	-.155
	Sig. (2-seitig)	.000		.000	.018	.069
	N	245	255	243	130	138
CTX-I	Korrelationskoeffizient	.290**	.457**	1.000	.202*	.337**
	Sig. (2-seitig)	.000	.000		.022	.000
	N	234	243	141	129	128
Östradiol	Korrelationskoeffizient	.163	.206*	.202*	1.000	.843**
	Sig. (2-seitig)	.063	.018	.022		.000
	N	130	130	129	130	129
Testosteron	Korrelationskoeffizient	.118	.155	.337**	.843**	1.000
	Sig. (2-seitig)	.169	.069	.000	.000	
	N	138	138	128	129	138

** : Die Korrelation ist auf dem 0.01 Niveau signifikant (zweiseitig).

* : Die Korrelation ist auf dem 0.05 Niveau signifikant (zweiseitig).

Tabelle 16: Darstellung der Korrelationen nach Spearman-Rho für die untersuchten Parameter

CTX-I: Carboxyterminales Telopeptid des Typ I Kollagens, N: Probandenzahl, Sig: Signifikanz.

Beim Spearman-Rang-Korrelationskoeffizienten (r_{sp}) werden monotone Zusammenhänge betrachtet. Dabei ergibt sich aus den Daten eine sehr signifikante Korrelation für die Steroidhormone T und E_2 von $r_{sp} = 0.843$. Als weitere sehr signifikante Korrelation wird OC zu CTX-I mit 0.457 ausgegeben, BALP korreliert mit OC sehr signifikant mit $r_{sp} = 0.393$ und CTX-I korreliert mit BALP mit einem Wert von $r_{sp} = 0.290$. Als weitere signifikante Korrelation wird auch der Zusammenhang zwischen E_2 und OC mit $r_{sp} = 0.206$ und mit CTX-I mit $r_{sp} = 0.202$ ausgegeben. Eine sehr signifikante Korrelation ergibt sich für T und CTX-I mit $r_{sp} = 0.337$.

Spearman-Rho		Geburtsdatum	Osteokalzin
Geburtsdatum	Korrelationskoeffizient	1.000	.649**
	Sig. (2-seitig)		.000
	N	80	53
Osteokalzin	Korrelationskoeffizient	.649**	1.000
	Sig. (2-seitig)	.000	
	N	53	53

** : Die Korrelation ist auf dem 0.01 Niveau signifikant (zweiseitig).

Tabelle 17: Darstellung der Korrelationen nach Spearman-Rho für die Parameter OC und das Geburtsdatum

Sig.: Signifikanz.

Eine ebenfalls sehr signifikante Korrelation ergibt sich für das Alter der Hengste aus Feld D und die Ergebnisse des OCs von $r_{sp} = 0.649$. Dieser Zusammenhang kann mit einem Signifikanzintervall von $p \leq 0.01$ statistisch abgesichert werden.

4.2.8

Verhältnis Knochenaufbau zu Knochenabbau

4.2.8.1

Einzelwerte Verhältnis Knochenaufbau zu Knochenabbau

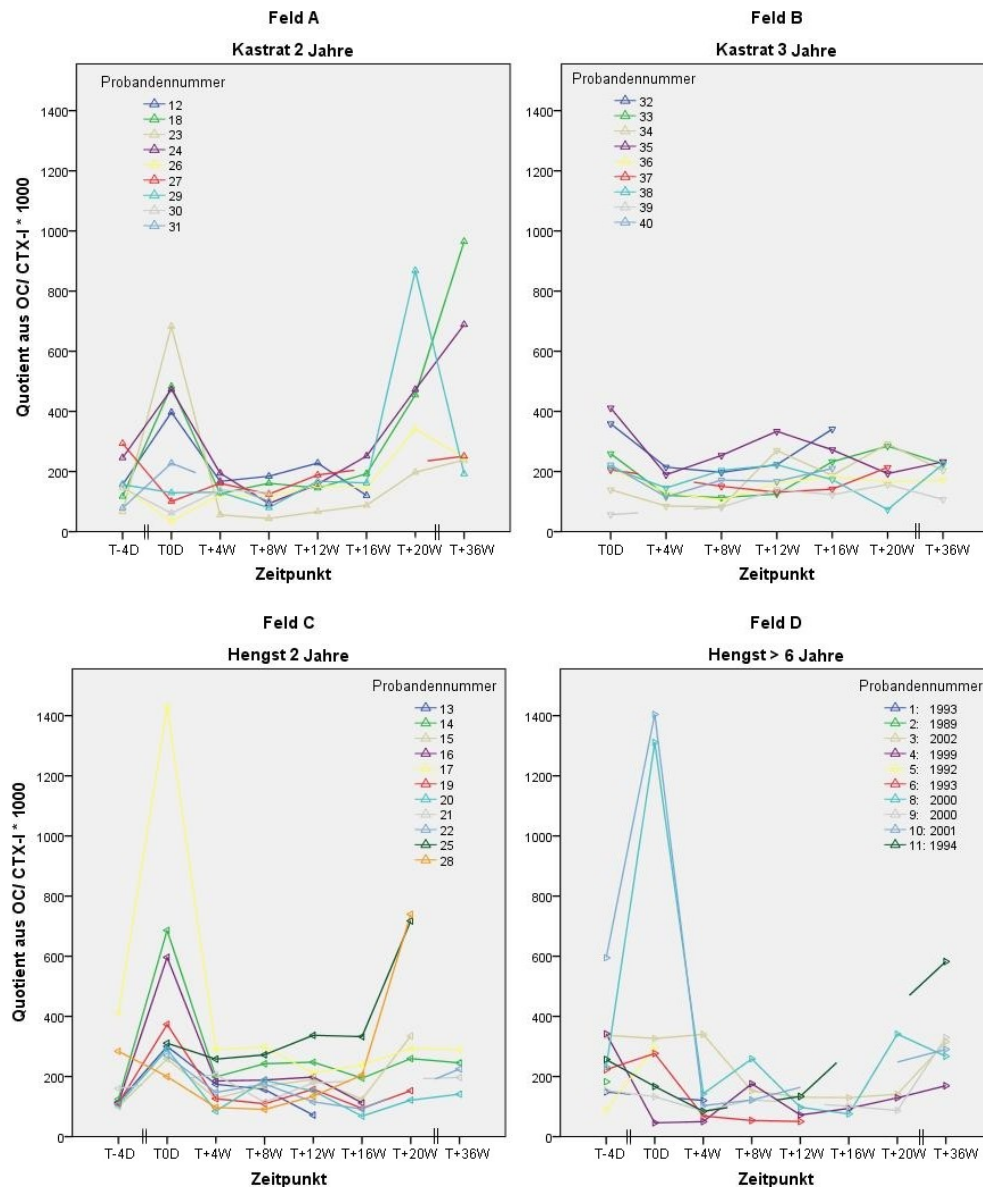


Abbildung 20: Liniendiagramme der Quotienten aus Verhältnis Knochenaufbau zu Knochenabbau mit zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probandengruppen (Feld A bis D). Fehlende Werte sind nicht eingezeichnet. Im Feld D sind zusätzlich die Geburtsjahrgänge eingezeichnet. T_{-4D} (vier Tage für Feld A, C und D und elf Tage für Feld B vor der Kastration), T_{0D} (am Tag der Kastration), T_{+4W} bis T_{+20W} (fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus) und T_{+36W} nach 36 Wochen (für Feld A, C und D) beziehungsweise 42 Wochen (für Feld B).

Der Quotient aus OC und CTX-I ist eine dimensionslose Größe und steht für das Verhältnis zwischen der Knochenaufbaurrate, wiedergegeben durch den Wert des OCs, und der Knochenabbaurate, wiedergegeben durch den Wert des CTX-I, wobei der Wert des CTX-I als ein Mass der Kollagendegradation gilt. Da beide Marker den gleichen äußeren Einflüssen unterliegen, ist es sinnvoll, die Marker ins Verhältnis zu setzen, um Störgrößen zu minimieren und ggf. identifizieren zu können und die Verschiebung von Verhältnissen zu detektieren.

Ist die Steigung des jeweiligen Graphen dabei negativ, ist die Balance in Richtung Knochenabbau verschoben. Bei positiver Steigung überwiegt der Knochenaufbau. Dabei wird als Bezugsgröße die Kontrollgruppe angenommen. Dieser Quotient wird von

Donabedian für Pferde ab 20 Wochen als Gleichgewicht ausgegeben, mit größeren und kleineren Schwankungen (Donabedian, van Weeren et al. 2008). Auch in der Humanmedizin wird dieser Quotient als Vergleichsgröße berechnet. In der Regel wird dabei aber das Verhältnis von CTX-I/OC ausgegeben (Hotta, Shibasaki et al. 1998; Weinbrenner, Zittermann et al. 2003). Der Quotient wird für Gruppen gebildet, die miteinander verglichen werden:

In Feld A sind die Werte der zweijährigen Kastraten dargestellt. Zum Zeitpunkt T_{-4D} liegt der Wertebereich der Probanden zwischen 46 und 293. Zum Messpunkt T_{0D} wird der Bereich breiter (zwischen 36 und 683), bei fünf Probanden steigen die Werte, bei vier Probanden sinken die Werte ab. Zum Zeitpunkt T_{+4W} liegt der Bereich wieder enger zusammen, zwischen 56 und 194. Im weiteren Kurvenverlauf zeigen die Werte von sechs Probanden einen Abwärtstrend, die restlichen Probanden zeigen eine minimale positive Steigung. Der Wertebereich bleibt bis zum Zeitpunkt T_{+16W} in diesem leicht erhöhten Wertebereich zwischen 88 und 256. Zum Zeitpunkt T_{+20W} sind alle Werte der verbleibenden Probanden erhöht, so dass zum Zeitpunkt T_{+36W} ein Wertebereich zwischen 162 und 985 erreicht wird. Nur Proband 26 zeigt einen niedrigeren Wert als zum vorherigen Zeitpunkt.

In Feld B werden die dreijährigen Kastraten dargestellt. Der Wertebereich liegt zu Beginn der Messungen zum Zeitpunkt T_{0D} zwischen 56 und 411, schrumpft zum nächsten Messpunkt auf einen Bereich zwischen 85 und 214 zusammen. Der Bereich setzt sich in leichter Wellenbewegung bis zum Zeitpunkt T_{+36W} mit individuellen Schwankungen fort und mündet in einen Wertebereich zwischen 107 und 232. Das Feld entwickelt sich recht homogen.

In Feld C sind die zweijährigen Hengste dargestellt. Der Wertebereich zum Zeitpunkt T_{-4D} liegt dabei zwischen 106 und 412. Zum Zeitpunkt T_{0D} zeigt sich, wie auch schon bei T_{0D} im Feld A sichtbar, ein sich verbreiternder Wertebereich zwischen 200 und 1429, mit einem relativen Maximum für alle Probanden, außer für Proband 28. Zum Zeitpunkt T_{+4W} zeigt sich ein kleinerer Wertebereich und zwar im Bereich zwischen 85 und 289. Bis T_{+16W} verlaufen die Kurven in Wellenform, teils zu- oder abnehmend im größer werdenden Intervallen zwischen 68 und 332. Zum Zeitpunkt T_{+20W} vergrößert sich die Wertespanne auf einen Bereich zwischen 116 und 773. Die Werte aller Probanden zeigen hier eine positive Steigung im Kurvenverlauf, so dass auch zum Zeitpunkt T_{+36W} ein Bereich zwischen 141 und 504 erreicht wird. Die Probanden liegen insgesamt, bis auf einige Ausreißer, sehr eng in ihrem Feld zusammen.

In Feld D sind die Hengste dargestellt, die älter als sechs Jahre alt sind. Bei T_{-4D} liegt der Messbereich zwischen 89 und 595, wobei nur ein Proband einen Wert jenseits von 243 erreicht. Zum Zeitpunkt T_{0D} vergrößert sich die Spanne auf einen Bereich zwischen 46 und 1404. Nur drei der Probanden verzeichnen hier ein relatives Maximum. Zum Zeitpunkt T_{+4W} liegt der Wertebereich wieder zwischen 50 und 339. Dies bildet einen Korridor, der sich nach oben hin leicht verschiebt und etwas breiter wird und schließlich zum Zeitpunkt T_{+36W} einen Wertebereich zwischen 169 und 296 abdeckt. Die einzelnen Probanden zeigen in ihrem Verlauf ab T_{+4W} individuelle Schwankungen mit leicht positivem Trend.

Bis auf zwei 7 und 8 Jahre alte Hengste sind die Werte der Gruppen in Feld A bis D kleiner als 1000. Dieses Verhältnis wird von Donabedian für Pferde ab 20 Wochen als Gleichgewicht ausgegeben, mit größeren und kleineren Schwankungen (Donabedian, van Weeren et al. 2008).

Bei der Betrachtung der drei Gruppen aus Schwaiganger (Feld A, B und C) fällt auf, dass die Maxima einiger Probanden zu den Zeitpunkten T_{0D} und T_{+20W} übergreifend in allen Gruppen vorkommen. Bei den Tieren aus Prussendorf kann dies nicht gezeigt werden. Eine altersabhängige höhere Konzentration der Knochenstoffwechselmarker kann in den vergleichenden Grafiken nicht festgestellt werden. Dieser Effekt scheint sich durch die Quotientenbildung zu minimieren.

4.2.8.2 Mittelwerte Verhältnis Knochenaufbau zu Knochenabbau

Quotient aus OC/CTX-I * 1000 -ohne Dimension-

Zeitpunkt	Status											
	Feld A: Kastrot 2 Jahre			Feld B: Kastrot 3 Jahre			Feld C: Hengst 2 Jahre			Feld D: Hengst >6 Jahre		
	Mittelwert	Standardabweichung	N	Mittelwert	Standardabweichung	N	Mittelwert	Standardabweichung	N	Mittelwert	Standardabweichung	N
T _{-4D}	156,15	73,02	9	-keine Messungen-			169,38	107,65	9	255,92	143,80	10
T _{0D}	287,79	229,03	9	230,08	106,12	9	471,42	370,68	10	495,19	540,92	8
T _{+4W}	137,15	40,85	8	143,02	44,68	7	172,22	64,13	11	124,23	91,92	8
T _{+8W}	114,83	42,10	9	150,83	60,27	9	182,04	66,86	11	147,45	68,26	6
T _{+12W}	158,23	49,23	7	197,10	70,94	9	181,34	70,65	11	96,96	36,47	5
T _{+16W}	159,80	57,37	6	206,94	67,42	9	162,38	86,55	9	100,02	22,50	4
T _{+20W}	466,82	249,80	5	196,97	76,12	7	373,98	253,39	7	174,64	113,41	4
T _{+36W}	430,05	320,14	6	193,93	48,08	6	219,58	55,32	5	325,64	137,88	6

Tabelle 18: Mittelwerte und Standardabweichungen des Verhältnisses Knochenaufbau zu Knochenabbau für die Felder A bis D

T_{-4D} (vier Tage für Feld A, C und elf Tage für Feld B vor der Kastration), T_{0D} (am Tag der Kastration), T_{+4W} bis T_{+20W} (fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus) und T_{+36W} nach 36 Wochen (für Feld A und C) beziehungsweise 42 Wochen (für Feld B), N: Probandenzahl.

Bei der Betrachtung der Mittelwerte werden für Feld A mit n = 9 Probanden zum Zeitpunkt T_{-4D} und T_{0D} Mittelwerte von 156,15 ± 73,02 sowie von 287,79 ± 229,03 errechnet. Nach der Kastration werden niedrigere Werte gemessen, die zum Zeitpunkt T_{+8W} mit n = 9 ein Minimum von 114,83 ± 42,10 markieren. Anschließend steigen die Werte auf 158,23 ± 49,23 bei T_{+12W} mit n = 7 und 159,8 ± 57,37 bei T_{+16W} mit noch sechs Probanden an. Ein relatives Maximum wird bei T_{+20W} mit fünf Probanden erreicht mit 466,82 ± 249,80 und breiter Streuung. Zum Zeitpunkt T_{+36W} nimmt der Mittelwert gering ab und erreicht einen Wert von 430,05 ± 320,14 mit sechs Probanden mit einer ebenfalls breiten Streuung.

Die Mittelwerte der Dreijährigen in Feld B starten zum Zeitpunkt T_{0D} mit einem Wert von 230,08 ± 106,12 mit neun Probanden. Nach der Kastration fallen die nachfolgend errechneten Mittelwerte niedriger aus. Ein Minimum wird direkt vier Wochen nach der Kastration mit 143,02 ± 44,68 mit n = 7 gemessen. Die Werte steigen allmählich auf ein relatives Maximum zum Zeitpunkt T_{+16W} von 206,94 ± 67,42 mit n = 9 an und enden zum Zeitpunkt T_{+36W} mit einem Mittelwert von 193,93 ± 48,08 mit sechs Probanden.

Bei der Betrachtung der Mittelwerte für die Gruppe C werden bei T_{-4D} mit n = 9 und T_{0D} mit n = 10 die Mittelwerte von 169,38 ± 107,65 und 471,42 ± 370,68 gemessen. Anschließend bleiben die Werte auf dem Niveau des ersten Wertes mit einem relativen Maximum zum Zeitpunkt T_{+8W} mit 182,04 ± 66,86 mit n = 11 Probanden. Bis T_{+16W} fällt der Mittelwert der Gruppe mit n = 9 auf 162,38 ± 86,55, steigt dann zum Zeitpunkt T_{+20W} auf einen Mittelwert von 373,98 ± 253,39 mit sieben Probanden an und flacht zum Zeitpunkt T_{+36W} auf einen Mittelwert von 219,58 ± 55,32 mit fünf Probanden ab.

Die Mittelwerte der Gruppe der adulten Hengste in Feld D fallen bei T_{-4D} und T_{0D} mit 255,92 ± 143,80 mit zehn Probanden und 495,19 ± 540,92 mit acht Probanden sehr hoch aus. Die anschließend gemessenen Werte zeigen eine wellenförmige Bewegung mit einem relativen Minimum zum Zeitpunkt T_{+4W} von 124,23 ± 91,92 und einem n = 8 und zum Zeitpunkt T_{+12W} von 96,96 ± 36,47 mit n = 5; ein Zwischenhoch wird zum Zeitpunkt T_{+8W} mit 147,45 ± 68,26 gemessen aus einer Probandenzahl von n = 6. Zum Zeitpunkt T_{+36W} wird ein Mittelwert mit n = 6 von 325,64 ± 137,88 gemessen.

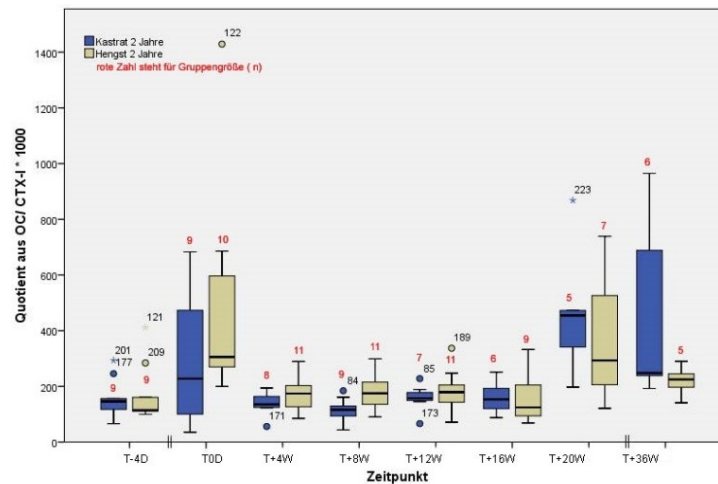


Abbildung 21: Boxplot-Darstellung des Verhältnisses Knochenaufbau zu Knochenabbau der Felder A und C im Vergleich

T_{-4D} (vier Tage vor der Kastration), T_{0D} (am Tag der Kastration), T_{+4W} bis T_{+20W} (fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus) und T_{+36W} nach 36 Wochen.

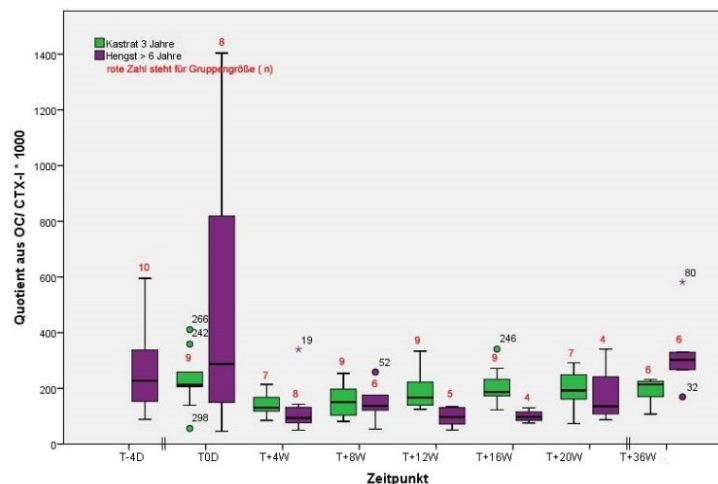


Abbildung 22: Boxplot-Darstellung des Verhältnisses Knochenaufbau zu Knochenabbau der Felder B und D im Vergleich

T_{-4D} (elf Tage für Feld B), T_{0D} (am Tag der Kastration), T_{+4W} bis T_{+20W} (fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus) und T_{+36W} nach 36 Wochen (für Feld D) beziehungsweise 42 Wochen (für Feld B).

Bei der Grafik zeigt sich, dass die Mittelwerte in Feld B nach der Kastration zunächst abnehmen, eine Talsohle durchschreiten und dann nach einem sanften Anstieg abflachen und anschließend auf einem Niveau bleiben. Dabei ist zu berücksichtigen, dass etwa sechs Monate zwischen den letzten beiden Messungen liegen.

Die Kurvenverläufe aller Probanden aus Schwaiganger (Feld A, C und D) zeigen zunächst ein Maximum am 25.11.2008 im Vergleich zum 21.11.2008. Anschließend werden einige Unterschiede deutlich: Feld C zeigt in seinem Kurvenverlauf einen minimalen Anstieg und ebenso minimalen Abfall der Kurve bis einschließlich zum Zeitpunkt T_{+16W}. Geht man davon aus, dass diese Kurve ein Basisniveau für die zweijährigen Hengste darstellt, so wird der Einfluss der Kastration auf Feld A mit einem deutlichen Kurvenabschwung bis zum Zeitpunkt T_{+8W} mit negativer Steigung und bis zum Zeitpunkt T_{+16W} mit entsprechender Ausgleichsbewegung und positiver Steigung zurück auf ein Niveau der anderen Zweijährigen aus Feld C. Zum Zeitpunkt T_{+20W} zeigen beide Gruppen eine positive Steigung, wobei die

Gruppe in Feld A die Werte der Gruppe in Feld C übersteigt und auch zum Zeitpunkt T_{+36W} noch ein höheres Niveau erreicht.

Die Hengste in Feld D zeigen ebenfalls bei T_{0D} ein Maximum. Wie die Gruppe in Feld A erfährt die Kurve mit negativer Steigung einen Aufschwung ab T_{+16W} , im Vergleich zu Feld A aber etwas weniger steil, was auch bis T_{+36W} noch anhält. Es ist zu berücksichtigen, dass der Kurvenverlauf in natura nicht so linear verläuft, wie dargestellt, da ein Zeitraum von etwa 16 Wochen dazwischen liegt.

Die Unterschiede der Mittelwerte zwischen den Gruppen aus Feld A und Feld C können in Abbildung 27 betrachtet werden, konnten nicht mit $P \leq 0,05$ abgesichert werden.

4.2.9.3 Einordnung Verhältnis Knochenaufbau zu Knochenabbau bei den nachträglich Kastrierten aus Feld C

Zeitpunkt -angepasst-	Proband 15	Proband 16	Proband 19	Mw \pm SD von Feld A	Mw \pm SD von Feld C	
$T_{\text{corr}+4W}$		773,70		137,15 \pm 40,85	172,22 \pm 64,13	T_{+4W}
$T_{\text{corr}+16W}$	148,20	566,69	291,69	159,80 \pm 57,37	162,38 \pm 86,55	T_{+16W}
$T_{\text{corr}+20W}$				466,82 \pm 249,80	373,98 \pm 253,39	T_{+20W}

Tabelle 19: Darstellung der Einzelwerte des Verhältnisses Knochenaufbau zu Knochenabbau der nachträglich Kastrierten aus Feld C zu den Mittelwerten

T_{+4W} : 4 Wochen nach der Kastration, T_{+16W} : 16 Wochen nach der Kastration T_{+20W} : 20 Wochen nach der Kastration. Bei den „angepassten“ Zeitpunkten ($T_{\text{corr}+4W}$, $T_{\text{corr}+16W}$ und $T_{\text{corr}+20W}$) wird der Messwert der zu einem anderen Zeitpunkt als zum Zeitpunkt T_0 kastrierten Tiere im zeitlich gleichen Verhältnis mit den Mittelwerten der vergleichbaren Probanden verglichen. Eine mögliche Saisonalität der Werte kann nicht berücksichtigt werden. Mw: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

Wie aus der oben dargestellten Tabelle abzulesen ist, stellt sich der Quotient aus OC/CTX-I * 1000 bei den Probanden unterschiedlich dar: Bei Proband 15 liegt der Wert sowohl in der Quartilsspanne für Feld A als auch für Feld C. Er fällt im Vergleich zu seinem Vorgängerwert um mehr als die Hälfte. Für eine langfristige Abschätzung der Werte wären weitere Verlaufskontrollen von Vorteil.

Bei Proband 16 vervielfacht sich der Wert nach der Kastration sprunghaft um ca. 690% und wird anschließend kleiner. Daraus ist zu erkennen, dass zunächst eine Reaktion stattfindet, die aber in erster Linie in Richtung Knochen-Aufbau tendiert mit insgesamt abnehmendem Trend.

Proband 19 zeigt eine Steigerung des Quotienten um ca. 90% nach der Kastration und befindet sich in einem Wertebereich, wie er mehr für Feld C als für Feld A typisch ist. Auch hier wären weitere Verlaufskontrollen für eine langfristige Abschätzung der Werte von Vorteil. Abschließend fällt auf, dass der Quartilsbereich bei den Kastrierten in Feld A zum Zeitpunkt T_{+20W} und T_{+36W} sehr breit wird, was sich auch in diesen Ergebnissen wiederfindet, da die Werte stark divergieren, auch wenn der korrigierte Zeitpunkt keine Rückschlüsse zulässt.

4.2.8.4 Ergebniszusammenfassung für das Verhältnis Knochenabbau zu Knochenaufbau

Beim Vergleich der Felder A und C bei Darstellung des Quotienten aus OC/CTX-I * 1000 zeigt sich nach der Kastration, dass die Probanden aus Feld A die Mittelwerte aus Feld C bis zum Zeitpunkt T_{+12W} unterschreiten und auch die Quartilsspanne kleiner ist, aber die Mittelwerte anschließend im Verlauf teilweise deutlich höher liegen. Das weist darauf hin, dass der Knochenstoffwechselumsatz der Gruppe in Feld A nach der Kastration im Vergleich zu Feld C zunächst eine negative Bilanz zeigt und dann, ab Zeitpunkt T_{+16W} , zunimmt. Der Verlauf bei den Dreijährigen aus Feld B ähnelt dem Verlauf von Feld A.

4.2.9 Abweichungen der Laboreergebnisse

Einige Laboreergebnisse weisen Abweichungen von den Referenzwerten auf. In Feld B sind die Werte der γ -GT-Aktivität bei allen Probanden gering- bis mittelgradig erhöht. Dieses Enzym gilt für das Pferd als leberspezifisch. Vermutlich kann hier von einer alimentären Ursache ausgegangen werden, da das gesamte Feld betroffen ist. Schon leichte Futterintoxikationen, beispielsweise durch Fusarien (Aller, Edds et al. 1981), können zu einer Aktivitätserhöhung der γ -GT im Blut führen.

Ebenso zeigte sich in Feld A bei Proband 31 und in Feld C bei Proband 15 eine minimale Erhöhung der γ -GT-Aktivität. Eine Beurteilung ist auch hier nur in Verbindung mit anderen klinischen Parametern und der klinischen Allgemeinuntersuchung sinnvoll. Die klinischen Untersuchungen waren bei allen Probanden unauffällig.

Des Weiteren fiel eine geringgradige Leukopenie bei den Probanden 4, 5 und 8 in Feld D auf. Die Fibrinogenwerte lagen jedoch im Referenzbereich. Die klinische Untersuchung war ebenfalls unauffällig, so dass von einer möglicherweise stressbedingten, kurzzeitigen Leukopenie ausgegangen werden kann.

5 Diskussion

Zur Überprüfung der Hypothese der Arbeit wurde eine Feldstudie durchgeführt: Dabei sollte eine Gegenüberstellung von zwei- bis dreijährigen Kastraten und älteren Kastraten mit jeweils gleichaltrigen Hengsten erfolgen. Eine ausreichend große Gruppe älterer Kastraten (älter als sechs Jahre) konnte während des Zeitraumes der Studie nicht zusammengestellt werden.

Im Folgenden werden zunächst die gegebenen Versuchsbedingungen analysiert. Im Anschluss daran werden die Ergebnisse hinsichtlich des Knochenstoffwechsels und der Altersabhängigkeit genauer betrachtet.

Abschließend wird diskutiert, ob die Ergebnisse dieser Arbeit dafür sprechen, ein neues Modell für die Osteoporose- und Osteopenieforschung beim Menschen zu etablieren.

5.1 Methodenkritik

5.1.1 Pferde, Haltung und Fütterung

Für die Durchführung der Feldstudie standen 39 deutsche Warmbluthengste aus zwei Zuchtgebieten Deutschlands zur Verfügung.

In verschiedenen, bereits vorangegangenen Studien wurde eine Altersabhängigkeit der jeweils untersuchten Knochenmarker nachgewiesen. Deshalb war die Verwendung homogener Altersgruppen für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von höchster Priorität zu sein (Lepage, Marcoux et al. 1990; Price, Jackson et al. 1995a; Black, Schoknecht et al. 1999; Chiappe, Gonzalez et al. 1999).

Eine beim Pferd verwendete Altersbezeichnung nach Jahrgängen ist mit einer breiten Streuung von mehr als einem halben Jahr möglich. Die Probanden innerhalb der Felder A und C lagen dabei vom Altersquerschnitt mit maximal vier Monaten sehr eng zusammen mit einer Gruppengröße von 9 bzw. 10 Probanden.

Aus verschiedenen, veröffentlichten Studien war bekannt, dass zwischen dem ersten Lebensmonat und dem dritten Lebensjahr die größten Veränderungen am Skelettsystem vorkommen (Lepage, Marcoux et al. 1990; Price, Jackson et al. 1995a). Trotzdem wurde eine Gruppe mit Zweijährigen (Feld A) als Probanden ausgewählt, da es parallel dazu eine gleichaltrige Hengstgruppe (Feld C) gab, die ebenfalls untersucht werden konnte und somit den gleichen Umweltbedingungen unterlag. Die durchgeführten Untersuchungen bei den Dreijährigen (Feld B) konnten den direkten Einfluss des Alters im Vergleich zu den Zweijährigen widerspiegeln. Messbare Wachstumsunterschiede innerhalb der Gruppen bestanden nicht.

Vor Beginn des Untersuchungszeitraumes waren die Probanden im jeweiligen Landgestüt für mindestens zwei Monate aufgestellt. Die Probanden erhielten am jeweiligen Ort das gleiche Futter und wurden unter gleichen Bedingungen gehalten. Der individuelle Fressplatz jedes Probanden sicherte ab, dass die Tiere tatsächlich ihre berechnete, tägliche Ration

aufnahmen, womit auch die regelmäßige Kontrolle der Tiere trotz der Gruppenhaltung gewährleistet war.

Da die Art der Fütterung maßgeblichen Einfluss auf die Konzentration der Knochenmarker (de Behr, Daron et al. 2003) und des Parathormons (Vervuert, Stanik et al. 2006) hat, wurden Rationsunterschiede ausgeschlossen.

Neben dem Einfluss der E, wie schon von Lemazurier für den Hengst und von Jackson bei der Stute belegt (Lemazurier, Toquet et al. 2002; Jackson, Dyson et al. 2006), hat die Bewegung maßgeblichen Einfluss auf den Umsatz des Knochengewebes. Deshalb erfolgte die Einteilung der Gruppen in Feld A und C unmittelbar vor Beginn der Studie. Somit besaßen die Probanden jeweils die gleichen konditionellen und haltungsbedingten Voraussetzungen. Auch nach der Kastration wurden die Gruppen unter den gleichen Bedingungen gehalten.

Der Einfluss des Trainings auf den Knochenstoffwechsel wurde schon in vorangegangenen Studien untersucht (Price, Jackson et al. 1995b; Jackson, Goodship et al. 2003; Carstanjen, Amory et al. 2005; Vervuert, Winkelsett et al. 2007). Den berichteten Ergebnissen dieser Studien folgend, wurde eine ungleiche Trainingsbelastung der Gruppen ausgeschlossen. Die Hengste aus Feld D wurden täglich für eine Stunde in den Beritt einbezogen.

Die Pferde in Feld B wurden im Anschluss an den 70-Tage-Test kastriert und nach der Kastration für etwa acht Wochen tagsüber auf die Weide gebracht. Nachts wurden sie separat in Boxen gehalten. Nach Verstreichen dieses Zeitraumes wurden die Probanden, in Vorbereitung auf eine Vermarktung, in den täglichen Beritt einbezogen und für etwa eine Stunde belastet. Somit waren auch hier die gleichen Trainingsbedingungen vor und nach der Kastration als Voraussetzung für eine Vergleichbarkeit der Probanden gewährleistet.

5.1.2 Versuchsdurchführung

Da uneinheitliche Studienergebnisse zur tageszeitlichen Schwankung der Knochenmarker vorliegen (siehe Kapitel 3.3.1 Osteokalzin), musste eine Vergleichbarkeit gewährleistet werden (Lepage, DesCoteaux et al. 1991; Black, Schoknecht et al. 1999). Die Versuchsdurchführung begann bei den Probanden mit der Blutentnahme morgens in einem Zeitfenster zwischen 7.30 und 10.30 Uhr.

Um zu Beginn der Studie zu prüfen, ob die untersuchten Probanden unter einer stärkeren Entzündung litten und somit vermehrt Kollagen abbauten (van Wuijckhuise-Sjouke 1984; Newquist und Baxter 2009) oder durch Einschränkungen ihrer Leber- und Nierenfunktion Knochenstoffwechselprodukte retinierten (Pagani, Bonetti et al. 2000), wurden zum einen die chemischen Parameter γ -GT-Aktivität und Creatinin-Konzentration untersucht. Zum anderen wurden die Messung der Fibrinogen-Konzentration und die Untersuchung des Blutbildes durchgeführt. Derzeit stuft man den Serum-Amyloid A Wert (SAA) sensibler zur Detektion knöcherner Entzündungen ein als erhöhte Fibrinogenwerte (Nunokawa, Fujinaga et al. 1993; Belgrave, Dickey et al. 2013). Zum Zeitpunkt der Planung der Studie konnte das Potential dieses Parameters noch nicht hinreichend eingeschätzt werden.

Bei einer Beeinflussung der Leber- sowie der Nierenfunktion ist die renale Exkretion der Knochenmarker gestört, so dass es zu einer Konzentration der Knochenmarker im Blut kommen kann (Price, Williamson et al. 1981; Farrugia und Melick 1986; Allen 2003; Seibel 2005). Eine Abweichung der Messwerte von den Normwerten hätte vor Beginn der Messungen zum Ausschluss aus der Studie geführt.

5.1.3 Auswahl der Untersuchungsparameter

Biochemische Knochenmarker im Blut bieten einen einfachen, schnellen und vor allem nicht-invasiven Weg, den Knochenstoffwechsel beim Pferd zu untersuchen. Doch die für die Untersuchung herangezogenen Knochenmarker geben einen Einblick in den dynamischen Knochenmetabolismus. Dabei lässt sich keine quantitative Aussage zur veränderten Knochenmasse und -architektur treffen.

Mit der Auswahl des OCs als Aufbaumarker der Knochensubstanz wurde ein Produkt der Osteoblasten gewählt, das im Blutserum nachgewiesen werden konnte (Brown, Delmas et al. 1984). Die durch einen RIA ermittelten Serum-Werte des OCs korrelieren mit der

Knochenneubildungsrate, die durch Histomorphometrie ermittelt werden konnte (Delmas, Malaval et al. 1985).

Problematisch ist der rasche Abbau des Peptids bei Raumtemperatur in der gewonnenen Probe durch die körpereigenen Proteasen im Serum (Seibel 2005). Aus diesem Grund wurde unmittelbar nach der Gewinnung der Serumfraktion eine Konservierung durch Einfrieren bei minus 20°C eingeleitet.

Für andere Einflussgrößen, wie die Kupferversorgung der Probanden und die Bewegung, wurden durch gleiches Handling und Versorgung gleiche Voraussetzungen geschaffen.

Für die Bestimmung des OCs wurde ein Pferde-spezifischer RIA verwendet, der gegenüber den Rinder-spezifischen, kommerziellen RIAs höhere Werte und sensitivere Ergebnisse als die heterologen Systeme liefert (Carstanjen, Sulon et al. 2003).

Der spezifische Knochenaufbaumarker BALP ist gegenüber der Umwelt ein sehr stabiles Isoenzym, das nur von aktiven Osteoblasten vor der Knochenmineralisation exprimiert wird. Es konnte beim Pferd histochemisch in der Wachstumsfuge nachgewiesen werden (Henson, Davies et al. 1995) und reflektiert zudem die Osteoblastenaktivität sehr gut. Neben einem modernen ELISA steht ein WGL-Präzipitationsassay als geeignetes Nachweisverfahren zur Auswahl. Obwohl der WGL-Präzipitationsassay spezifischer ist als die kommerziell erhältlichen Kits (Jackson, Eastell et al. 1996), gibt es derzeit nur in-house WGL-Präzipitationsassays, deren Entwicklung und Validierung im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen waren.

Bei dem verwendeten ELISA ist eine Kreuzreaktivität mit der Leber AP von 3 bis 8% als sehr gering einzustufen (Trumble, Brown et al. 2008). Deshalb wurde dieses Nachweisverfahren gewählt.

Als Knochenresorptionsmarker stehen für die Bestimmung aus dem Blutserum Kollagenabbauprodukte zur Verfügung. Neben dem CTX-MMP gibt es ein stabileres Kollagen-I-Telopeptid zum Nachweis beim Pferd aus dem Blutserum. Das CTX-I zeigt mit kommerziellen, humanmedizinischen Assays eine sehr gute Kreuzreaktivität und ist zudem für das Pferd validiert worden (Carstanjen, Hoyle et al. 2004).

Für CTX-MMP hat sich im Rahmen weiterer Untersuchungen herausgestellt, dass beispielweise eine Interferenz mit Cathepsin κ die Antigenität des CTX-MMPs herabsetzt (Sassi, Eriksen et al. 2000) und der etablierte Test nicht pferdespezifisch ist (Carstanjen, Amory et al. 2005), weshalb eine Verwendung weniger geeignet erschien.

Bei dem verwendeten Nachweisverfahren für E_2 handelt es sich um das derzeit sensitivste Nachweisverfahren mittels RIA mit kleinem Probenvolumen mit weniger Kreuzreaktionen mit E_1 , Equilin und Equilenin als bei anderen kommerziell verfügbaren RIAs (Hoppen und Niederstucke 2008).

Für den T-Nachweis wurde ein automatisiertes Verfahren angewandt, das erst 2009 für das Pferd validiert worden war (Janett, Stump et al. 2009). In der Methodenbeschreibung von Wang wurden gängige, humanmedizinische, automatisierte Systeme (RIAs) gegen die Flüssigkeits-Chromatographie-Massen-Tandem-Spektrometrie getestet. Die Ergebnisse mit dem Elecsys 2010 Analyser wiesen engste Korrelationen mit der Kontrolle auf (Wang, Catlin et al. 2004).

5.2 Vergleichbarkeit der Ergebnisse zum wissenschaftlichen Kontext

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen mit denen, bereits vorgelegter Publikationen verglichen werden, um einen Zusammenhang zu Ergebnissen herzustellen, die durch andere etablierte Methoden erzielt wurden. Bei vielen Studien mit großen Populationen werden Rennpferde untersucht, die im Vergleich zu Warmblütern viel früher in ein kontinuierliches Training einbezogen werden und auch frühreifer sind, als die in dieser Studie untersuchten Warmblüter oder Kaltblüter (Lepage, Hartmann et al. 1998). Ein direkter Vergleich ist schwer durchzuführen, wird aber im einzelnen nachfolgend diskutiert.

5.2.1 Vergleichbarkeit der Messergebnisse für Bone Alkaline Phosphatase

In einer Studie von Price wurde die BALP-Aktivität in die Betrachtung einer Longitudinalstudie mit einbezogen (Price, Jackson et al. 2001). Dabei wurde die BALP mit

dem WGL-Assay gemessen, der von Hank validiert worden war (Hank, Hoffmann et al. 1993; Jackson, Eastell et al. 1996). Als Ergebnis konnte eine mit zunehmendem Alter ständig abnehmende Aktivität bis zu einem Endwert von 111 U/l bei 18 Monate alten Tieren ($n = 24$) gemessen werden.

Im Jahr 2003 publizierte Jackson Ergebnisse einer BALP-Messung bei 12 zweijährigen Stuten im Kontext zu einer Messung von Knochenstoffwechselmarkern, assoziiert mit Training (Jackson, Goodship et al. 2003). Gemessen wurde nach dem oben genannten Verfahren, zu dem es auch noch weitere Vergleichsdaten gibt (Jackson, Eastell et al. 1996). Für die Kontrollgruppe ($n = 6$) konnte hierbei ein Wert von $73,6 \pm 12,6$ U/l ermittelt werden. Die Gruppe, die belastet wurde, zeigt eine geringere Baseline-Aktivität von $63,1 \pm 5,9$ U/l mit ebenfalls sechs Probanden.

Die untersuchten Zweijährigen in dieser Arbeit zeigten im direkten Vergleich eine etwas niedrigere Aktivität, wobei zu berücksichtigen ist, dass es sich bei den Probanden dieser Arbeit zum einen um Hengste handelt und zum anderen ein anderes Messverfahren angewandt worden ist.

Mit einem von Jackson 1996 veröffentlichten Vergleich der Methoden der BALP-Bestimmung, werden keine genauen Werte publiziert. In einer Grafik veranschaulichte Jackson, dass bei den 14 Zweijährigen der BALP-Bereich zwischen 50 und 100 U/l und bei 22 Drei- bis Vierjährigen ein Wertebereich zwischen 40 und 60 U/l gemessen werden konnte. Allerdings wurde nur eine Stutenpopulation untersucht.

Ein so deutlicher Unterschied zwischen den Altersgruppen konnte mit den Messergebnissen dieser Arbeit nicht herausgearbeitet werden, jedoch ließ sich auch hier das inverse Verhältnis von Knochenaufbaumarker BALP zum Alter darstellen. Die ausgewachsenen Hengste jenseits von sechs Jahren zeigen deutlich niedrigere Werte als die Zwei- und Dreijährigen. Eine direkte Vergleichbarkeit ist allerdings nur mit der Anwendung des identischen Verfahrens und der gleichen Trainingsmethode herzustellen.

Schon bei geringen Einflüssen reagiert die BALP, als frühes Enzym der Osteoblasten, mit einer Aktivitätserhöhung im Blut. Auch Price konnte nach Durchführung ihrer Studie konstatieren, dass die Aussage über die Konzentration der BALP, die von Monat zu Monat schwankt, von begrenztem Wert ist und sich nur bei direkter Vergleichbarkeit verwerten lässt (Jackson, Eastell et al. 1996; Price, Jackson et al. 2001).

Genauere Referenzwerte sind unabhängig von der Methode schwer zu bestimmen.

5.2.2 Vergleichbarkeit der Messergebnisse für Osteokalzin

In dieser Arbeit liegen zu den Zeitpunkten T_{-4D} und T_{0D} die Ausgangswerte der Zweijährigen auf einem ähnlichen Level wie bei den nachfolgend aufgeführten Veröffentlichungen.

Im Rahmen einer Untersuchung zu den Auswirkungen des Trainings auf den Knochenstoffwechsel wurden drei zweijährige Stuten sowie vier zweijährige Wallache untersucht (Vervuert, Coenen et al. 2002). Mit Hilfe des nicht-pferdespezifischen ELISA Metra Novo Calcin Tests wurde die OC-Konzentration bestimmt. Dieses Verfahren wurde zuvor durch Hoyt validiert (Hoyt und Siciliano 1999). Bei der Messung der Basis-Aktivitäten vor der Belastung schwankten die Werte zwischen $39,0 \pm 6,4$ ng/ml und $52,4 \pm 8,1$ ng/ml zwischen den einzelnen Belastungsgruppen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit ($33,72 \pm 13,67$ ng/ml) sind in einem niedrigeren Wertebereich, was für weniger Kreuzreaktionen des hier angewandten Tests spricht. Eine jahreszeitliche Differenzierung wurde von Vervuert nicht vorgenommen.

Bei der Untersuchung von Jackson zum Risiko der „Dorsal Metacarpal Disease“ (DMD) bei Zweijährigen wurde auch die OC-Konzentration nach der Methode von Hoyt bestimmt. Dabei erreichten 141 männlichen Probanden ohne DMD bei einem durchschnittlichen Alter von $20,44 \pm 1,26$ Monaten einen durchschnittliche OC-Median von $33,97 \pm 8,79$ ng/ml (Jackson, Lonnell et al. 2005). Diese Werte sind mit den vor der Kastration ermittelten Daten dieser Arbeit ($33,72 \pm 13,67$ ng/ml) vergleichbar.

In der Studie von Price wurden Knochenmarker von 24 Warmblütern in einer longitudinalen Studie von der Geburt an bis zu einem Alter von 18 Monaten bestimmt (Price, Jackson et al. 2001). Für die OC-Bestimmung wurde ein etablierter „in-house“-inhibierender ELISA genutzt

(Gray 1996). Die Ergebnisse dieser Studie konnten zeigen, dass die OC-Niveaus zwischen Oktober und Januar um 38% höher waren als zu anderen Zeiten im Jahr, bei nur geringer Gewichtszunahme. Mit steigendem Lebensalter aber fielen die OC-Werte generell, bei einer steigenden Gewichtszunahme der Probanden.

In der Studie von Jackson wurden Blutproben von zweijährigen (19 bis 24 Monate) und dreijährigen (31 bis 37 Monate) Stuten und Hengsten auf den Gehalt an OC und auf die Frakturinzidenz hin untersucht. Dabei wurde die OC-Bestimmungsmethode nach Hoyt verwendet (Hoyt und Siciliano 1999; Jackson, Dyson et al. 2009). Die Frakturfälle und die nicht-Frakturfälle wurden in Gruppen geordnet: Bei den nicht-Frakturfällen der 261 Hengste ließ sich ein Mittelwert von 37,2 ng/ml in einem Quartilsbereich von 32,2 bis 43,0 ng/ml ermitteln. Diese Werte lagen knapp oberhalb der Ergebnisse der eigenen Untersuchungen. Bei den dreijährigen Wallachen lag der Mittelwert der 189 Probanden bei 29,9 ng/ml und damit in einem Bereich des ersten und dritten Quartils zwischen 25,8 und 29,9 ng/ml. Auch hier sind die eigenen Messergebnisse höher ausgefallen. Dafür sind die unterschiedlichen Testsysteme verantwortlich zu machen. Die von Carstanjen entwickelte Methode gibt an, höhere Werte zu erzielen, weil sie einen pferdespezifischen Antikörper nutzt.

In einer Studie von Black wurden die tageszeitliche Schwankung des OCs und die OC-Basalwerte acht ausgewachsener Wallache ($16,7 \pm 4,6$ Jahre) und sieben Fohlen ($4,6 \pm 0,4$ Monate) gemessen (Black, Schoknecht et al. 1999). Zur Messung wurde ein heterogener RIA-Kit verwendet, der von Patterson-Allen validiert worden war (Patterson-Allen, Brautigam et al. 1982). Für die Fohlen konnte eine dreimal höhere OC-Konzentration im Vergleich zu den adulten Wallachen gemessen werden. Das untermauert die von Lepage berichteten Erkenntnisse, dass bis zum 5. Lebensjahr eine inverse Korrelation zwischen OC-Konzentration und dem Lebensalter besteht (Lepage, Marcoux et al. 1990). Diese Aussage war auch in den Ergebnissen dieser Arbeit wiederzufinden.

Bei den 8 adulten Wallachen zeigte sich ein Mittelwert von $12,8 \pm 2,0$ ng/ml, was etwa den Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Hengste ($13,27 \pm 5,79$ Jahre) entspricht. Der Unterschied der beiden Gruppen könnte an den hormonellen Einflüssen der Hengstgruppe liegen. Eine jahreszeitliche Schwankung wurde nicht berücksichtigt.

Bei der Veröffentlichung von Jackson wurden die Geschlechtsunterschiede und die saisonalen Abhängigkeiten des OCs bei Zweijährigen untersucht (Jackson, Lonnell et al. 2003). Für den OC-Nachweis wurde ein kompetitiver, heterogener RIA verwendet, der von Lepage validiert worden war (Lepage, Marcoux et al. 1990). Dabei konnte bei den 84 Junghengsten im Alter von 20 Monaten ein Mittelwert von $33,9 \pm 9,0$ ng/ml ermittelt werden. Diese Werte sind den Startwerten der Zweijährigen der eigenen Untersuchungen ähnlich. Bei den 30 Monate alten Tieren lag der Mittelwert bei $28,7 \pm 6,1$ ng/ml und bei den Ergebnissen dieser Arbeit mit $36,33 \pm 9,47$ ng/ml höher.

5.2.3 Vergleichbarkeit der Messergebnisse für die Konzentration des Carboxy-terminalen Telopeptids des Typ-I-Kollagens

Bei der Veröffentlichung von Jackson zur Ermittlung des Frakturrisikos bei zwei- und dreijährigen Hengsten wurde unter anderem auch CTX-I als Knochenabbaumarker nach der Methode von Billinghamurst bestimmt (Billinghurst, Brama et al. 2003; Jackson, Dyson et al. 2009). Für die 261 zweijährigen Hengste ohne Fraktur konnte ein Mittelwert von 0,48 (0,37 bis 0,64) ng/ml berechnet werden. Für die 189 dreijährigen Hengste ohne Fraktur ergab sich ein Mittelwert von 0,35 (0,25 bis 0,46) ng/ml.

Im Vergleich sind die Werte dieser Arbeit niedriger ausgefallen. Zum einen ist nach anderen Methoden gearbeitet worden. Zum anderen sind die Trainingsmethoden und die Rasse gerade für die Knochenresorption von großer Bedeutung (Vervuert, Coenen et al. 2002). Die Probanden der Studie von Jackson waren zwar in das ständige Training auf der Rennbahn eingebunden. Es wurde aber keine Aussage zur Intensität oder Frequenz des Trainings getroffen.

In der Studie von Donabedian wird zur Ermittlung der Knochenabbaurate die CTX-I-Konzentration mit einem ELISA nach Herstellerangaben bestimmt (Donabedian, van Weeren et al. 2008). Bei der Veröffentlichung sind jedoch keine Absolutzahlen ausgegeben.

In der Veröffentlichung von Carstanjen wurde die Validierung des ECLIA für CTX-I bei 75 Pferden mit einem Ergebnis von $0,11 \pm 0,08$ ng/ml mit ein Durchschnittsalter von $9,8 \pm 9,3$ Jahren beschrieben (Carstanjen, Hoyle et al. 2004). Dabei ist die von Carstanjen beschriebene inverse Korrelation zwischen Alter und der Konzentration von CTX-I zu beachten, die sich auch in dieser Arbeit darstellen lässt. Bei der Untersuchung von Pastoret (Pastoret, Carstanjen et al. 2007) wird die Methode näher beleuchtet, jedoch werden die Ergebnisse nur in Korrelationen ausgegeben.

Demnach ist es sehr schwierig, die erarbeiteten Ergebnisse in einen Kontext mit den vorliegenden Veröffentlichungen zu bringen. Die Werte dieser Arbeit sind ähnlich den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Carstanjen, die mit der gleichen Methode erarbeitet worden sind. Eine Abweichung zu den Ergebnissen von Jackson (2009) ist mit großer Wahrscheinlichkeit durch eine unterschiedliche Trainingsintensität und das damit ausgelöste Knochenremodeling bedingt.

5.2.4 Vergleichbarkeit der Messergebnisse für Testosteron

Bei Untersuchungen von Janett wird der Einfluss einer GnRH-Vakzine auf das Sexualverhalten und auf die Testikelfunktion hin untersucht (Janett, Stump et al. 2009). Hierfür wurde auch die T-Konzentration aus dem Plasma bestimmt. Dazu wurden acht Warmbluthengste zwischen sechs und 15 Jahren untersucht. Der Nachweis erfolgte, wie bei dieser Arbeit, über einen ECLIA. Die Methode ist von Wang vorgestellt und von der o.g. Gruppe für das Pferd validiert worden (Wang, Catlin et al. 2004; Janett, Stump et al. 2009). Bei den drei Kontrolltieren lag die in Peaks verlaufende T-Konzentration zwischen 0,1 und 1,4 ng/ml. Diese Werte entsprechen auch dem Wertebereich dieser Arbeit.

Die Gruppe um Hinojosa hat sich mit den T-Konzentrationen aus dem Blut nach der Injektion mit einem GnRH-Antagonisten (Hinojosa, Bloeser et al. 2001) beschäftigt. Die untersuchten Tiere waren vier Shetlandpony-Hengste im Alter zwischen zwei und fünf Jahren. Es wurde eine ELISA-Nachweismethode auf Grundlage eines kommerziell erhältlichen Kits für die Bestimmung der T-Konzentration validiert. Bei den Untersuchungen kommt diese Gruppe auf Ergebnisse zwischen 0,7 und 3,5 ng/ml, was auch für die Untersuchungen dieser Arbeit während der Zuchtsaison bei den zweijährigen Hengsten zutrifft.

Bei den Untersuchungen von Cox zu T-Konzentrationen bei sieben normalen, älter als drei Jahre alten; 29 kryptorchiden Hengsten sowie 15 Wallachen wurden folgende Ergebnisse veröffentlicht: Bei den Hengsten mit einem oder zwei Hoden wird eine Standard-T-Konzentration im Bereich von 0,08 bis 1,6 ng/ml gemessen. Wallache hingegen zeigen eine tiefere T-Konzentration im Plasma mit einem Median von $0,0153 \pm 0,0049$ ng/ml. Als Nachweisverfahren wird ein RIA, nach hier beschriebener Methode, angewandt (Cox, Williams et al. 1973).

Ähnliche Ergebnisse finden sich auch im Wertebereich dieser Arbeit wieder, allerdings ist der maximal gemessene Wert von 3,4 ng/ml bei einem Zweijährigen in Feld C höher als die Werte der Dreijährigen bei Cox.

5.2.5 Vergleichbarkeit der Messergebnisse für Östradiol

Wenige Untersuchungen beschäftigen sich mit der Bestimmung des E_2 s im Blutplasma von fertilen und infertilen Hengsten. Die Gruppe um Hinojosa untersuchte bei vier zwei- bis fünfjährigen Shetlandpony-Hengsten den Einfluss eines GnRH-Analogons auf die endogene Hormonsituation (Hinojosa, Bloeser et al. 2001). Die Messung des E_2 s konnte mit einem RIA nach Ätherextraktion nach der Methode von Glasier durchgeführt werden (Glasier, Irvine et al. 1989). Dabei wurden für E_2 von 65 bis 215 pg/ml ermittelt. Diese Werte entsprechen den in dieser Arbeit gemessenen Werten für die fertilen, zweijährigen Hengste, (siehe obenstehende Tabelle in Kap. 4.2.5.2 Mittelwerte für Östradiol).

Die Kastraten zeigten eine niedrigere Grundaktivität zu Messpunkt T_{-4D} und T_{0D} , da dieser Zeitraum noch außerhalb der natürlichen Zuchtsaison liegt, ebenso wie die zweijährigen Hengste, die aber zur Zuchtsaison die oben genannten Werte erreichen.

5.3 Einfluss des Alters auf die Knochenstoffwechselmarker

Bei den Ergebnissen der Arbeit stellte sich heraus, dass alle untersuchten Knochenmarker bei den unkastrierten Tieren mit zunehmendem Alter eine geringere Aktivität resp. eine entsprechend niedrigere Konzentration aufwiesen. Am deutlichsten konnte dies für OC bei den Hengsten in Feld D gezeigt und mit einer Korrelation von $r_p = 0.437$ (bei $p \leq 0.01$) statistisch abgesichert werden.

Aus diesem Ergebnis lässt sich ableiten, dass mit zunehmendem Alter der Stoffwechselumsatz im Bereich des Knochens beim deutschen Warmblüter geringer wird; zum einen in Richtung Abbau für CTX-I, zum anderen in Richtung Aufbau für BALP konnte dies in den Ergebnissen hinreichend dargestellt werden. Die gemessenen Konzentrationen und Aktivitäten entsprechen dem wissenschaftlichen Kontext sofern die Nachweismethode gleich ist. Insgesamt scheint sich der jeweilige Kurvenverlauf um einen individuellen Basiswert einzupendeln, der altersabhängig zu sein scheint.

Bei den kastrierten Tieren in Feld A und B fällt auf, dass die Knochenaufbaumarker-Konzentrationen über den beobachteten Zeitraum sich nicht entlang eines kontinuierlich sinkenden linearen Trends verhalten, sondern stattdessen zulegen, was für eine Reaktion spricht, die mit der Kastration ausgelöst wird.

5.4 Einfluss der Kastration auf den Knochenstoffwechsel

Die deutlichsten Einflussgrößen für den Knochenstoffwechsel für Mensch, Tier und das Pferd sind mechanische Belastung und E (Frost 1990a; Price, Jackson et al. 1995b; Lemazurier, Toquet et al. 2002; Van Harreveld, Lillich et al. 2002; Knothe Tate 2003; Jackson, Dyson et al. 2006; Delguste, Amory et al. 2007; Weisrock, Winkelsett et al. 2011).

Mit der Kastration der Hengste verändert sich der Serumspiegel der Steroidhormone, die in den Gonaden produziert wurden. Innerhalb von 24 Stunden sinkt der T-Spiegel unterhalb der Nachweisgrenze ab. Die ebenfalls in den Gonaden produzierten E nehmen im Körper der Kastraten ab und konnten bei dieser Untersuchung 28 Tage nach der Kastration im Plasma nur noch im marginalen Bereich detektiert werden.

Die Konzentration des Abbaumarkers CTX-I steigt ab Kastrationszeitpunkt bis 16 Wochen danach auf ein Niveau über dem der Vergleichsgruppe an. Für die Aufbaumarker konnte direkt nach der Kastration eine Steigerung der BALP gegenüber der Vergleichsgruppe ermittelt werden, die nach 36 Wochen statistisch signifikant war. Der ebenfalls untersuchte Aufbaumarker OC zeigt zunächst bis zur 12. Woche gleichbleibende Konzentrationen, steigt dann aber gegenüber der Vergleichsgruppe an. Diese Differenz konnte nach 36 Wochen als statistisch signifikant abgesichert werden.

Nach der Kastration tritt somit ein messbarer Abbau der Knochenmasse auf, der anschließend offenbar reaktiv von Aufbaumarkern gemildert wird. Bekannt ist, dass der Aufbaumarker BALP eine Aktivitätssteigerung der Osteoblasten sehr früh anzeigt. Der Aufbaumarker OC tritt erst bei der Reifung der neu gebildeten Matrix auf. Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass eine reaktive Veränderung der Aktivität der Osteoblasten und der Osteoklasten nach der Kastration eintritt. Dies konnte durch die Darstellung der Knochenmarker in Abhängigkeit beider Steroidhormone T und E_2 bei den zweijährigen Hengsten in Feld C wird gezeigt werden.

Wie bereits in der Literatur bei Mäusen beschrieben (Manolagas 2000) scheint E_2 einen knochenkonservierenden und T eher einen anabolen Effekt auf die Knochenmasse auszuüben: Denn mit den Maxima des E_2 s sind zeitgleich die Minima von CTX-I verknüpft. Neben dem Einwirken biomechanischer Kräfte haben E, zu denen auch E_2 gehört, einen direkten Effekt auf die positive Bilanz des Knochenstoffwechsels. Bei Stuten konnten im Alters- und Geschlechtvergleich ebenfalls mit Einsetzen der Pubertät höhere OC-Spiegel gemessen werden (Fletcher, Topliff et al. 2000). Lemazurier konnte ebenfalls einen positiven Zusammenhang zwischen E und dem Knochenaufbau zeigen (Lemazurier, Toquet et al. 2002).

Mit den Maxima des Ts sind in dieser Arbeit die Maxima der BALP verknüpft. Für OC konnte dieser Zusammenhang nicht so deutlich dargestellt werden, was aber in der Studie von

Fletcher für junge Wallache im Verhältnis zu Stuten auch schon gezeigt wurde (Fletcher, Topliff et al. 2000).

Die Einzelwerte der Probanden zeigten teilweise Abweichungen des Kurvenverlaufs der Gruppe, die durch unterschiedlich intensive Bewegung in der Gruppenhaltung, einem individuellen Wachstum oder der Reifung des Skelettes der Zweijährigen erklärt werden können. Diese Effekte scheinen sich dann bei der Betrachtung der jeweiligen Gruppe zu relativieren.

Auf der zellulären Ebene beim Menschen und der Tiermodelle ist bekannt, dass E die Aktivität, Lebensdauer und Entwicklung sowohl von Osteoblasten als auch von Osteoklasten beeinflussen. Sie reduzieren die Osteoklastenbildungsrate und deren Aktivität. Durch gesteigerte Apoptose wird zudem die Lebensdauer der Osteoklasten reduziert (Hughes, Dai et al. 1996). Diese Wirkung wird durch die Aromatisierung des Ts zu E₂ vermittelt (Falahati-Nini, Riggs et al. 2000). Genau wie die E wirkt T durch Beeinflussung der Apoptose auf die Lebensspanne der Osteoblasten und der Osteoklasten. T hat einen leicht steigernden Effekt auf die Osteoblastenproliferation (Kasperk, Wergedal et al. 1989). Beide Effekte (Stimulation der Proliferation und Verhinderung der Apoptose) tragen dazu bei, den Knochenaufbau zu verstärken.

Aus den Ergebnissen der Probanden in Feld C wird deutlich, dass Osteoblasten unter T-Einfluss eine verstärkte Aktivität zeigen und als Indikator dieser Stoffwechsellistung auch eine erhöhte Aktivität der BALP resultiert. Ein konservierender Effekt der E auf die Knochensubstanz wird ebenfalls aus den Ergebnissen der Probanden in Feld C deutlich, da die Graphen des E₂s und des CTX-I sich im Vergleich gegenläufig verhalten.

Östrogen-Mangel steigert bei Versuchstieren und dem Menschen die Rate der Aktivierungsfrequenz der BMUs, was zu einem größeren Knochenstoffwechselumsatz mit negativer Bilanz führt. Bei den Osteoklasten wird durch E-Mangel die Resorption gesteigert, weil ihre Apoptose verzögert wird. Durch die Verlängerung der Resorptionsphase und die Verkürzung der Aufbauphase wird eine Imbalance geschaffen.

Die Apoptose der Osteoklasten wird mit dem T-Wegfall verzögert. Diese Osteoklasten sind also über das „normale Maß hinaus“ aktiv und konnten beim Versuchstier pro Zeiteinheit dreimal mehr Knochensubstanz abbauen, als die Osteoblasten aufbauen können (Noble 2008).

Der zunehmende Gehalt an Knochenaufbaumarkern ab T_{+16W} markiert nach der Kastration eine Reaktion des Knochengewebes. Dies wird verdeutlicht durch den Anstieg der OC-Konzentration und auch der stetig zunehmenden Aktivitätserhöhung der BALP. Nach der Modellvorstellung von Frost wird offenbar hier eine „neue“ Steady-State erlangt.

Zur Vermittlung der Effekte des Es und Ts sind ER und AR und deren Subtypen an der Zelloberfläche nötig (Eriksen, Colvard et al. 1988; Oursler, Osdoby et al. 1991), welche die Hormonwirkung direkt vermitteln, beispielsweise durch Beeinflussung der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (Kawaguchi, Pilbeam et al. 1995; Pacifici 1996; Manolagas 2000). Denn E und A kommen sowohl mit der Unterdrückung der Produktion des IL-6 als auch mit der Suppression der Ausbildung der IL-6-Rezeptoren Schlüsselrollen zu, da dieses Zytokin die Osteoblastogenese und die Osteoklastogenese im Knochenmark massiv beeinflusst (Lin, Yamate et al. 1997; Manolagas 1998).

ER und AR konnten bisher nur bei Vögeln und einigen Säugetieren nachgewiesen werden. Beim Pferd ist der Nachweis dieser Rezeptoren an Knochenzellen bisher¹ nicht veröffentlicht worden. Aber auch ohne direkten Beweis ist die Annahme des Vorkommens dieser Rezeptoren für die Vermittlung der beschriebenen Effekte existenziell. Die beschriebenen Effekte der Wirkung der Rezeptoren erklären die Resultate der Studie.

Das Ausmaß der Resorption, also wie viel Knochenmasse tatsächlich verloren geht, bleibt jedoch unbekannt, da aufgrund der Konzentration von CTX-I im Blut nur schwer

¹ Stand der Literaturrecherche: 25.05.2020

Rückschlüsse auf eine tatsächlich abgebaute Menge von Knochengewebe beim Pferd gezogen werden können. Eine Steigerung des Umsatzes ist bewiesen worden.

Vergleichende CT-Untersuchungen bei männlichen Ratten konnten zeigen, dass bereits zwei Monate nach einer Kastration ein erheblicher Verlust der Knochenmasse stattgefunden hatte (Wink und Felts 1980; Verhas, Schoutens et al. 1986). Auch beim lebenden Pferd wird der tatsächliche Umfang einer gesteigerten Knochenresorption erst über vergleichende CT-Untersuchungen oder andere Strahlungsabsorptionsverfahren deutlich zu machen sein.

Ebenfalls muss der Nachweis eines regulatorischen Einflusses von FSH auf die Knochenmasse berücksichtigt werden. Denn die Gruppe um Zaidi konnte zeigen, dass G_{12a} -gekoppelte FSH-Rezeptoren an humanen Osteoklastenvorläuferzellen und Osteoklasten vorkommen und dass deren Aktivität mit einer gesteigerten Knochenresorption einhergeht (Sun, Peng et al. 2006). Nach Ausbleiben eines negativen Feedbackmechanismus durch den Hypogonadismus zirkulieren erhöhte Konzentrationen des FSHs durch den Organismus (Thompson, Pickett et al. 1979). Ob dadurch ein maßgeblicher Einfluss auf die Knochenresorption erreicht wird, ist noch nicht abschließend geklärt und derzeit Gegenstand kontroverser Diskussionen.

Aus der Osteoporoseforschung beim Menschen ist weiterhin bekannt, dass nach Eintreten eines Hypogonadismus die Adaptation von Knochengewebe an mechanische Belastungen deutlich schlechter funktioniert, als unter Einfluss von E (Lee, Jessop et al. 2003). Nach der Phase eines schnellen Verlustes von Knochensubstanz, innerhalb einer Zeitspanne von vier bis acht Jahren, stellt sich trotz gleich gebliebener Belastungen wieder ein Steady-State ein. Entsprechend der mechanischen Belastungen wird die Knochenmasse erhalten, eine neue Balance wird aufrechterhalten, die beim Menschen aber anschließend durch einen sekundären Hyperparathyreodismus beeinträchtigt wird.

Verursacht wird der Knochenabbau beim Menschen in dieser zweiten langsamen Phase durch fehlende oder eingeschränkte UV-Lichtexposition und eine generell reduzierte oder einseitige Nahrungsaufnahme. So kann zum einen nur eingeschränkt Vitamin D aufgenommen und synthetisiert werden, zum anderen ist im Chymus selbst nur wenig Kalzium enthalten, so dass es zu einer gesteigerten PTH-Ausschüttung kommt, was wiederum zu einer Reduktion der Knochenmasse führt, da Kalzium für die Versorgung des Körpers aus dem Knochengewebe gelöst wird. Oft lassen sich die Epithelkörperchen nicht ausreichend rückkoppeln, so dass es zu einer weitgehend autonomen PTH-Sekretion kommt. Vitamin D_3 induziert eine gesteigerte Aktivität der Zellen in Verbindung mit Wachstumsfaktoren der monozytären Zellreihen im Knochenmark (Orikasa, Kawase et al. 1993).

Die Beobachtungen eines sekundären Hyperparathyreodismus sind beim Pferd in Verbindung mit Tumoren oder als Stoffwechselerkrankungen ebenfalls beschrieben (Joyce, Pierce et al. 1971; Marr, Love et al. 1989; Calvo 1994; Peuroi, Fisher et al. 1998; Benders, Junker et al. 2001). In pflanzlicher Nahrung sind aber in der Regel ausreichend Kalzium und Vitamin D_3 enthalten. Vitamin D_3 -Mangel beim Pferd spielt demnach eine geringere Rolle als unausgewogene Kalzium-Phosphat-Verhältnisse in der Ration. Durch die intensiv genutzten Weideflächen ändert sich oft regional gehäuft die Zusammensetzung der Mineralien im Raufutter bei gleichzeitig intensiver Fütterung von phosphathaltigen Konzentratfuttermitteln (Joyce, Pierce et al. 1971; McKenzie, Gartner et al. 1981; Ronen, van Heerden et al. 1992).

5.5 Schlussbemerkung

Neben den zahlreichen Einflussfaktoren auf den Knochenstoffwechsel übt die Kastration des Hengstes einen messbaren Einfluss auf den Knochenstoffwechsel, über den beobachteten Zeitraum, in Richtung Knochenabbau aus.

Dies entspricht einem Effekt, der auch beim Wegfall der Geschlechtshormone bei Menschen (Riggs, Khosla et al. 2002; Bonnicksen 2006) und bei verschiedenen Tierarten (Wink und Felts 1980; Malluche und Rodgers 1993; Arteaga-Silva, Rodriguez-Dorantes et al. 2007) zu messen war.

Dieser Effekt scheint die Knochendichte der Wallache so massiv zu beeinflussen, dass daraus mit zunehmendem Alter eine klinische Problematik mit zunehmenden Fraktur- oder

Mikrofrakturinzidenz entsteht. Dies muss Gegenstand weiterer Untersuchungen in den Bereichen der Orthopädie, Geriatrie und der modernen Bildgebung beim Pferd sein. In diesem Zusammenhang sollten auch Langzeiteffekte nach einer Kastration betrachtet werden.

Aus klinischer Sicht und dem derzeitigen Erkenntnisstand nach scheint es ratsam, die Kastration des Hengstes möglichst spät durchzuführen, damit die Hengste eine maximale Knochenmasse erreichen, von welcher sie beim nachfolgenden Abbauprozess „zehren“ können. Ein ausgewogenes Kalzium-Phosphor-Verhältnis in der Futtermittelration kann dann weitere unphysiologische Abbauprozesse verhindern.

Nach der Kastration sollte damit begonnen werden, den Wallach vorsichtig anzutrainieren: Wechselnde Arten des Bodenbelags erzeugen vielfältige mechanische Spannungen, die Knochenzellen anregen, sich den Anforderungen entsprechend zu adaptieren und Knochenmasse aufzubauen. Daraus entsteht eine hohe Stabilität des Gliedmaßen- und Stammskeletts.

Eine Überbeanspruchung fördert das übermäßige Auftreten von Mikrofrakturen, die bei einer Ermüdung in Stressfrakturen münden.

Unterschiedliche Darstellungen in der Literatur zum Einfluss des Geschlechts auf die Frakturinzidenz beim Pferd sind oft dadurch geprägt, dass nicht genau zwischen Hengst und Wallach differenziert wird und oftmals sehr junge Populationen betrachtet werden.

Das Auftreten klinischer Symptome, vermutlich erst bei Auftreten eines subklinischen sekundären Hyperparathyreodismus, und die Beschreibung einer Osteoporose respektive Osteopenie in der Literatur sind demnach erst bei älteren Wallachen zu verzeichnen. Hier ist es schwer größere Populationen zu erfassen und einen sicheren Datenpool zu erzeugen.

Mit dieser Untersuchung wurde versucht, ein weiteres Modell für das Osteoporose- und Osteopenie- Syndrom beim Menschen zu entwickeln. Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen eine Imbalance des Knochenremodelings beim jungen Hengst nach der Kastration darzustellen.

Für eine Etablierung einer neuen Modelltierart „Pferd“ sollten die Untersuchungen noch vertieft werden: Insbesondere bildgebende Verfahren zur Knochendichtemessung können den Untersuchungen weitere solide Fakten beisteuern. Ein Studium der Langzeiteffekte auf das Knochengewebe nach der Kastration vervollständigt dieses komplexe Untersuchungsgebiet.

Das hier vorgestellte Modell scheint besonders wertvoll im Hinblick auf die Biomechanik, die Trainingsphysiologie des Knochens und seine Adaptationsfähigkeit mit oder ohne den Einfluss der Steroidhormone zu sein.

6 Zusammenfassung

Martin Thunig (2020)

Klinik für Pferde, Freie Universität Berlin

Einfluss der Kastration auf die Steroidhormone und den Knochenstoffwechsel beim Hengst

Erkrankungen der Knochen des Pferdes stellen weiterhin einen großen Problembereich in der heutigen Pferdeindustrie dar. Hypogonadismus bei anderen Spezies und beim Mann führt zur Osteopenie und Osteoporose. Auf dieser Basis wurde die These entwickelt, dass die Kastration zwei- und dreijähriger Hengste und adulter Hengste einen maßgeblichen Einfluss auf ihren Hormon- und Knochenstoffwechsel ausübt.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine Feldstudie durchgeführt: Dabei sollte eine Gegenüberstellung von zwei- bis dreijährigen Kastraten und älteren Kastraten mit jeweils gleichaltrigen Hengsten erfolgen. (Eine ausreichend große Gruppe älterer Kastraten konnte während des Zeitraumes der Studie nicht zusammengestellt werden.) Eine Altersabhängigkeit der verwendeten Untersuchungsparameter wurde ebenfalls untersucht. Um die Probanden nachhaltig zu schonen, wurde diese These mit wenig-invasiven Techniken untersucht. Durch die Bestimmung von Knochenmarkern aus dem Blutserum konnten Raten eines zunehmenden Auf- oder Abbaus von Knochensubstanz dargestellt und die Balance des Knochenstoffwechsels angegeben werden, in Abhängigkeiten zu den Geschlechtshormonen Östradiol (E_2) und Testosteron (T).

Die Hengste wurden in Gruppen eingeteilt (Feld A: zweijährige Kastraten, Feld B: dreijährige Kastraten, Feld C: zweijährige Hengste, Feld D: Hengste älter als 6 Jahre). Zu den Zeitpunkten T_{-4D} (vier Tage vor der Kastration), T_{0D} (am Tag der Kastration), T_{+4W} bis T_{+20W} (fünfmal jeweils im vierwöchigen Rhythmus) und T_{+36W} (nach 36 Wochen) wurden allen Probanden morgens zwischen 7.30 und 10.30 Uhr Blutproben entnommen.

Es konnten 263 Blutproben auf ihren Gehalt an Osteokalzin (OC), knochenspezifische alkalische Phosphatase (BALP), carboxy-terminales Telopeptide des Typ I Kollagens (CTX-I), T und E_2 untersucht werden: OC wurde mit einem pferdespezifischen RIA untersucht. Zur Ermittlung der BALP wurden die Proben mit dem kommerziell erhältlichen ELISA-Kit bestimmt. Die CTX-I Bestimmung erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen, automatisierten ECLIA im Elecsys 2010 Analyzer. Die Bestimmung der E_2 -Werte erfolgte mit dem Ultra-Sensitive-Estradiol-RIA-Kit von Diagnostic Systems Laboratories mit vorgeschaltetem Extraktionsschritt. Die T-Werte wurden durch ECLIA-Sandwich-Assay, (Elecsys-Testosteron Immunoassay) mit dem Elecsys 2010 Analyzer gemessen.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1. Nach der Kastration sank der Spiegel der Steroidhormone, für T bei den Kastraten unterhalb der Nachweisgrenze, für E₂ in den Bereich der unteren Nachweisgrenze des Tests. Die heranwachsenden Hengste aus Feld C konnten steigende Konzentrationen verzeichnen.
2. Für die Knochenstoffwechselfmarker konnte nach der Kastration eine Steigerung der BALP gegenüber der Vergleichsgruppe ab Zeitpunkt T_{+4W} verzeichnet werden, die zum Zeitpunkt T_{+36W} als statistisch signifikant abzusichern war ($p \leq 0.05$). Der Aufbaumarker Osteokalzin zeigte bis zum Zeitpunkt T_{+12W} eine gleichbleibende Konzentration, stieg dann gegenüber der Vergleichsgruppe in Feld C bis einschließlich dem letzten Messpunkt an. Diese Differenz konnte zum Zeitpunkt T_{+36W} als statistisch signifikant abgesichert werden ($p \leq 0.05$). Die Konzentration des Knochenabbaumarkers CTX-I stieg ab Zeitpunkt T_{+4W} bis zum Zeitpunkt T_{+16W} auf ein Niveau über dem des Feldes C an. Anschließend übertreffen die Werte von Feld C den weiteren Kurvenverlauf von Feld A. Zu den Zeitpunkten T_{+8W} und T_{+12W} konnte der Unterschied der CTX-I-Konzentration zwischen Feld A und Feld C als signifikant dargestellt werden ($p \leq 0.05$).
3. Alle untersuchten Knochenmarker zeigten bei den unkastrierten Tieren mit zunehmendem Alter eine geringere Aktivität respektive eine niedrigere Konzentration. Für OC konnte dies bei den Hengsten aus Feld D gezeigt und mit einer Korrelation zum Alter von $r_p = 0.437$ ($p \leq 0.001$) statistisch abgesichert werden.
4. Die gemessenen Konzentrationen und Aktivitäten der Knochenmarker und Steroidhormone entsprechen dem wissenschaftlichen Kontext.

Somit wurde bewiesen, dass innerhalb von 36 Wochen nach der Kastration der Hengste eine messbare Veränderung des Knochenstoffwechsels in Richtung Abbau und verstärktem Umsatz im Vergleich zur Hengstgruppe stattfindet.

7 Summary

Martin Thunig (2020)

Equine Clinic, Free University of Berlin

Influence of castration on steroid hormones and bone metabolism in the male horse

Bone diseases in horses constitute a major and persistent problem in equine industry. Hypogonadism in other species and in men leads to osteoporosis and osteopenia. On this basis, we hypothesized that castration in two to three year old stallions and stallions older than six years have significant influences on their hormone and bone metabolism.

To test this hypothesis, a field study was carried out: A comparison of 2-3 years old and stallions older than six years should be castrated and compared to each peers. (However, a sufficiently large group of older castrates could not be collected during period of the study.) In order to avoid compromising the test horses' well-being, non-invasive methods were applied. Stallions were divided into four groups (field A: two years old castrati, field B: three years old castrati, field C: two year old stallions, field D: stallions older than 6 years). Blood samples were taken from all probands between 7.30 to 10.30 a.m., at T_{-4D} (four days before castration), T_{0D} (day of castration), T_{+4W} to T_{+20W} (five times each in the four-week intervals) and T_{+36W} (36 weeks after).

Finally, the levels of osteocalcin (OC), bone alkaline phosphatase (BALP), c-terminal telopeptide of type I collagen (CTX-I), testosterone (T) and estradiol (E_2) could be measured in 263 blood samples: OC was examined with a horse-specific RIA. To determine the BALP, the samples were analyzed using a commercially available ELISA kit. CTX-I was determined using a commercially available, automated elektrochemiluminiscent sandwich assay (ECLIA) in the Elecsys 2010 analyzer. Determination of E_2 was carried out by "Biocontrol" laboratory. This test based on modified ultra-sensitive-estradiol-RIA kit from Diagnostic Systems Laboratories. T levels were determined via ECLIA (Elecsys testosterone immunoassay) with the Elecsys 2010 analyzer.

The following results were obtained:

1. After castration of the stallions levels of T dropped below detection limit. Levels of E_2 decreased slight above detection limit. In contrast, rising concentrations were recorded for the adolescent stallions (field C).
2. BALP increased after castration compared to the peer group (field C) from time T_{+4W} to T_{+36W} . At T_{+36W} the difference was statistically significant ($P \leq 0.05$). The OC showed until T_{+12W} steady concentrations, and then rose in comparison to the peer group (field C) up to T_{+36W} . At T_{+36W} the difference could be safeguarded statistically significant ($p \leq 0.05$). The concentration of CTX-I rose from T_{+12W} to T_{+16W} at levels above field C. Then the values of field C dropped below the value of field A. At T_{+8W} and T_{+12W} , differences of CTX-I concentrations between field A and C was statistical significant ($p \leq 0.05$).
3. All selected bone markers exhibited lower activity respectively lower concentrations in non-castrated horses with increasing age. OC and age correlated with $r_p = 0.437$ ($p \leq 0.001$) in field D.
4. All measured concentrations and activities of the bone markers and steroid hormones correspond to scientific context.

It was shown that within 36 weeks after the castration of the stallions bone metabolism changes towards bone loss and increased turnover in comparing to the stallion group.

8 Literaturübersicht²

- Abney, T. O. (1999):
The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review.
Steroids. 64(9), 610-7.
- Adachi, E.; Hayashi, T. (1985):
In vitro formation of fine fibrils with a D-periodic banding pattern from type V collagen.
Coll Relat Res. 5(3), 225-32.
- Ahern, B. J.; Boston, R. C.; Ross, M. W. (2014):
Enostosis-like lesions in equids: 79 cases (1997-2009).
J Am Vet Med Assoc. 245(9), 1042-7.
- Allen, M. J. (2003):
Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations.
Vet Clin Pathol. 32(3), 101-13.
- Aller, W. W., Jr.; Edds, G. T.; Asquith, R. L. (1981):
Effects of aflatoxins in young ponies.
Am J Vet Res. 42(12), 2162-4.
- Almadhidi, J.; Seralini, G. E.; Fresnel, J.; Silberzahn, P.; Gaillard, J. L. (1995):
Immunohistochemical localization of cytochrome P450 aromatase in equine gonads.
J Histochem Cytochem. 43(6), 571-7.
- Amann, R. P. (1993):
Physiology and endocrinology.
In: *Equine Reproduction*. / Hrsg. A. O. McKinnon and J. L. Voss. - Philadelphia: Lea and Febiger. - ISBN:9780721602523. S. 658-685.
- Anderson, D. M.; Maraskovsky, E.; Billingsley, W. L.; Dougall, W. C.; Tometsko, M. E.; Roux, E. R.; Teepe, M. C.; DuBose, R. F.; Cosman, D.; Galibert, L. (1997):
A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function.
Nature. 390(6656), 175-9.
- Anderson, F. H.; Francis, R. M.; Selby, P. L.; Cooper, C. (1998):
Sex hormones and osteoporosis in men.
Calcif Tissue Int. 62(3), 185-8.
- Apley, A. G.; Solomon, L.; Nayagam, S. (2010):
Apley's System of orthopaedics and Fractures. - London: Hodder Education. -.9.
- Arteaga-Silva, M.; Rodriguez-Dorantes, M.; Baig, S.; Morales-Montor, J. (2007):
Effects of castration and hormone replacement on male sexual behavior and pattern of expression in the brain of sex-steroid receptors in BALB/c AnN mice.

² Zeitschriftentitelabkürzungen gemäß: List of journals indexed in Index Medicus.
[Entrez Journals database] Bethesda, MD: National Library of Medicine.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=journals>

Comp Biochem Phys A 147(3), 607-15.

Arts, J.; Kuiper, G. G.; Janssen, J. M.; Gustafsson, J. A.; Lowik, C. W.; Pols, H. A.; van Leeuwen, J. P. (1997):

Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells.

Endocrinology. 138(11), 5067-70.

Aubin, J. E.; Turksen, K. (1996):

Monoclonal antibodies as tools for studying the osteoblast lineage.

Microsc Res Tech. 33(2), 128-40.

Aurich, C.; Sieme, H.; Hoppe, H.; Schlote, S. (1994):

Involvement of endogenous opioids in the regulation of LH and testosterone release in the male horse.

J Reprod Fertil. 102(2), 327-36.

Bais, R.; Edwards, J. B. (1976):

An optimized continuous-monitoring procedure for semiautomated determination of serum acid phosphatase activity.

Clin Chem. 22(12), 2025-8.

Bar-Shavit, Z.; Kahn, A. J.; Pegg, L. E.; Stone, K. R.; Teitelbaum, S. L. (1984):

Glucocorticoids modulate macrophage surface oligosaccharides and their bone binding activity.

J Clin Invest. 73(5), 1277-83.

Barkhem, T.; Carlsson, B.; Nilsson, Y.; Enmark, E.; Gustafsson, J.; Nilsson, S. (1998):

Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists.

Mol Pharmacol. 54(1), 105-12.

Bedrak, E.; Samuels, L. T. (1969):

Steroid biosynthesis by the equine testis.

Endocrinology. 85(6), 1186-95.

Belgrave, R. L.; Dickey, M. M.; Arheart, K. L.; Cray, C. (2013):

Assessment of serum amyloid A testing of horses and its clinical application in a specialized equine practice.

J Am Vet Med Assoc. 243(1), 113-9.

Bellido, T.; Jilka, R. L.; Boyce, B. F.; Girasole, G.; Broxmeyer, H.; Dalrymple, S. A.; Murray, R.; Manolagas, S. C. (1995):

Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor.

J Clin Invest. 95(6), 2886-95.

Bendall, A. J.; Abate-Shen, C. (2000):

Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development.

Gene. 247(1-2), 17-31.

Benders, N. A.; Junker, K.; Wensing, T.; van den Ingh, T. S.; van der Kolk, J. H. (2001):

Diagnosis of secondary hyperparathyroidism in a pony using intact parathyroid hormone radioimmunoassay.

Vet Rec. 149(6), 185-7.

- Benz, D. J.; Haussler, M. R.; Thomas, M. A.; Speelman, B.; Komm, B. S. (1991): High-affinity androgen binding and androgenic regulation of alpha 1(I)-procollagen and transforming growth factor-beta steady state messenger ribonucleic acid levels in human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Endocrinology*. 128(6), 2723-30.
- Bianco, P.; Fisher, L. W.; Young, M. F.; Termine, J. D.; Robey, P. G. (1991): Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int*. 49(6), 421-6.
- Billingham, R. C.; Brama, P. A.; van Weeren, P. R.; Knowlton, M. S.; McIlwraith, C. W. (2003): Significant exercise-related changes in the serum levels of two biomarkers of collagen metabolism in young horses. *Osteoarthritis Cartilage*. 11(10), 760-9.
- Black, A.; Schoknecht, P. A.; Ralston, S. L.; Shapses, S. A. (1999): Diurnal variation and age differences in the biochemical markers of bone turnover in horses. *J Anim Sci*. 77(1), 75-83.
- Black, D.; Duncan, A.; Robins, S. P. (1988): Quantitative analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in urine using ion-paired reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 169(1), 197-203.
- Blair, H. C.; Robinson, L. J.; Zaidi, M. (2005): Osteoclast signalling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 328(3), 728-38.
- Blom, E.; Ali, M. M.; Mortensen, B.; Huseby, N. E. (1998): Elimination of alkaline phosphatases from circulation by the galactose receptor. Different isoforms are cleared at various rates. *Clin Chim Acta*. 270(2), 125-37.
- Bonewald, L. F. (2007): Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1116, 281-90.
- Bonnick, S. L. (2006): Osteoporosis in men and women. *Clin Cornerstone*. 8(1), 28-39.
- Bord, S.; Horner, A.; Beavan, S.; Compston, J. (2001): Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab*. 86(5), 2309-14.
- Boskey, A. L.; Posner, A. S. (1984): Bone structure, composition, and mineralization. *Orthop Clin North Am*. 15(4), 597-612.
- Braidman, I.; Baris, C.; Wood, L.; Selby, P.; Adams, J.; Freemont, A.; Hoyland, J. (2000): Preliminary evidence for impaired estrogen receptor-alpha protein expression in osteoblasts and osteocytes from men with idiopathic osteoporosis. *Bone*. 26(5), 423-7.

Brown, J. P.; Delmas, P. D.; Malaval, L.; Edouard, C.; Chapuy, M. C.; Meunier, P. J. (1984): Serum bone Gla-protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis.

Lancet. 1(8386), 1091-3.

Buckingham, S. H.; Jeffcott, L. B. (1991):

Osteopenic effects of forelimb immobilisation in horses.

Vet Rec. 128(16), 370-3.

Buckwalter, J. A.; Glimcher, M. J.; Cooper, R. R.; Recker, R. (1996):

Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function.

Instr Course Lect. 45, 387-99.

Budras; Fricke; Richter (2000):

Atlas der Anatomie des Hundes. -

Hannover: Schlütersche. - ISBN:3877065848.6.

Calvo, M. S. (1994):

The effects of high phosphorus intake on calcium homeostasis.

Adv Nutr Res. 9, 183-207.

Caron, J. P.; Peters, T. L.; Hauptman, J. G.; Eberhart, S. W.; Orth, M. W. (2002):

Serum concentrations of keratan sulfate, osteocalcin, and pyridinoline crosslinks after oral administration of glucosamine to standardbred horses during race training.

Am J Vet Res. 63(8), 1106-10.

Carroll, R. S.; Kowash, P. M.; Lofgren, J. A.; Schwall, R. H.; Chin, W. W. (1991):

In vivo regulation of FSH synthesis by inhibin and activin.

Endocrinology. 129(6), 3299-304.

Carstanjen, B. (2006):

[Use of biochemical markers of bone metabolism in veterinary medicine].

Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 119(9-10), 425-35.

Carstanjen, B.; Amory, H.; Sulon, J.; Hars, O.; Remy, B.; Langlois, P.; Lepage, O. M. (2005): Serum osteocalcin and CTX-MMP concentration in young exercising thoroughbred racehorses.

J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 52(3), 114-20.

Carstanjen, B.; Hoyle, N. R.; Gabriel, A.; Hars, O.; Sandersen, C.; Amory, H.; Remy, B. (2004):

Evaluation of plasma carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen concentration in horses.

Am J Vet Res. 65(1), 104-9.

Carstanjen, B.; Sulon, J.; Banga-Mboko, H.; Beckers, J. F.; Remy, B. (2003):

Development and validation of a specific radioimmunoassay for equine osteocalcin.

Domest Anim Endocrinol. 24(1), 31-41.

Chang, M. K.; Raggatt, L. J.; Alexander, K. A.; Kuliwaba, J. S.; Fazzalari, N. L.; Schroder, K.; Maylin, E. R.; Ripoll, V. M.; Hume, D. A.; Pettit, A. R. (2008):

Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo.

J Immunol. 181(2), 1232-44.

- Chen, J.; Zhang, Q.; McCulloch, C. A.; Sodek, J. (1991):
Immunohistochemical localization of bone sialoprotein in foetal porcine bone tissues: comparisons with secreted phosphoprotein 1 (SPP-1, osteopontin) and SPARC (osteonectin).
Histochem J. 23(6), 281-9.
- Chen, P.; Satterwhite, J. H.; Licata, A. A.; Lewiecki, E. M.; Sipos, A. A.; Misurski, D. M.; Wagman, R. B. (2005):
Early changes in biochemical markers of bone formation predict BMD response to teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis.
J Bone Miner Res. 20(6), 962-70.
- Chiappe, A.; Gonzalez, G.; Fradinger, E.; Iorio, G.; Ferretti, J. L.; Zanchetta, J. (1999):
Influence of age and sex in serum osteocalcin levels in thoroughbred horses.
Arch Physiol Biochem. 107(1), 50-4.
- Chiba, S.; Kanematsu, S.; Murakami, K.; Satoh, A.; Asahina, M.; Numakunai, S.; Goryo, M.; Ohshima, K.; Okada, K. (2000):
Serum parathyroid hormone and calcitonin levels in racehorses with fracture.
J Vet Med Sci. 62(4), 361-5.
- Claus, R.; Dimmick, M. A.; Gimenez, T.; Hudson, L. W. (1992):
Estrogens and prostaglandin F₂alpha in the semen and blood plasma of stallions.
Theriogenology. 38(4), 687-93.
- Clauss, A. (1957):
Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens.
Acta haemat. 17(4), 237-246.
- Cogger, N.; Evans, D. L.; Hodgson, D. R.; Reid, S. W.; Perkins, N. (2008):
Incidence rate of musculoskeletal injuries and determinants of time to recovery in young Australian Thoroughbred racehorses.
Aust Vet J. 86(12), 473-80.
- Cohen, N. D.; Dresser, B. T.; Peloso, J. G.; Mundy, G. D.; Woods, A. M. (1999):
Frequency of musculoskeletal injuries and risk factors associated with injuries incurred in Quarter Horses during races.
J Am Vet Med Assoc. 215(5), 662-9.
- Collingsworth, M. G.; Fuller, Z.; Cox, J. E.; Argo, C. M. (2001):
Changes in plasma gonadotrophin and prolactin concentrations following castration of the pony stallion.
Theriogenology. 55(5), 1171-80.
- Colvard, D. S.; Eriksen, E. F.; Keeting, P. E.; Wilson, E. M.; Lubahn, D. B.; French, F. S.; Riggs, B. L.; Spelsberg, T. C. (1989):
Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells.
Proc Natl Acad Sci U S A. 86(3), 854-7.
- Cooke, P. S.; Holsberger, D. R.; Witorsch, R. J.; Sylvester, P. W.; Meredith, J. M.; Treinen, K. A.; Chapin, R. E. (2004):
Thyroid hormone, glucocorticoids, and prolactin at the nexus of physiology, reproduction, and toxicology.
Toxicol Appl Pharmacol. 194(3), 309-35.

- Couse, J. F.; Korach, K. S. (1999):
Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?
Endocr Rev. 20(3), 358-417.
- Cox, J. E.; Williams, J. H.; Rowe, P. H.; Smith, J. A. (1973):
Testosterone in normal, cryptorchid and castrated male horses.
Equine Vet J. 5(2), 85-90.
- Curlewis, J. D. (1992):
Seasonal prolactin secretion and its role in seasonal reproduction: a review.
Reprod Fertil Dev. 4(1), 1-23.
- de Behr, V.; Daron, D.; Gabriel, A.; Remy, B.; Dufrasne, I.; Serteyn, D.; Istasse, L. (2003):
The course of some bone remodelling plasma metabolites in healthy horses and in horses offered a calcium-deficient diet.
J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 87(3-4), 149-59.
- de Rooij, K. E.; van der Velde, M.; de Wilt, E.; Deckers, M. M.; Bezemer, M.; Waarsing, J. H.; Que, I.; Chan, A. B.; Kaijzel, E. L.; Lowik, C. W. (2015):
Identification of receptor-type protein tyrosine phosphatase mu as a new marker for osteocytes.
Histochem Cell Biol.
- Delguste, C.; Amory, H.; Doucet, M.; Piccot-Crezollet, C.; Thibaud, D.; Garnero, P.; Detilleux, J.; Lepage, O. M. (2007):
Pharmacological effects of tiludronate in horses after long-term immobilization.
Bone. 41(3), 414-21.
- Delguste, C.; Amory, H.; Guyonnet, J.; Thibaud, D.; Garnero, P.; Detilleux, J.; Lepage, O. M.; Doucet, M. (2008):
Comparative pharmacokinetics of two intravenous administration regimens of tiludronate in healthy adult horses and effects on the bone resorption marker CTX-1.
J Vet Pharmacol Ther. 31(2), 108-16.
- Delmas, P. D.; Malaval, L.; Arlot, M. E.; Meunier, P. J. (1985):
Serum bone Gla-protein compared to bone histomorphometry in endocrine diseases.
Bone. 6(5), 339-41.
- Döcke, F. (1994):
Veterinärmedizinische Endokrinologie. 3. -
Jena: Fischer-Verlag. - ISBN:3334604322.
- Dominguez Cabrera, C.; Sosa Henriquez, M.; Traba, M. L.; Alvarez Villafane, E.; de la Piedra, C. (1998):
Biochemical markers of bone formation in the study of postmenopausal osteoporosis.
Osteoporos Int. 8(2), 147-51.
- Donabedian, M.; van Weeren, P. R.; Perona, G.; Fleurance, G.; Robert, C.; Leger, S.; Bergero, D.; Lepage, O.; Martin-Rosset, W. (2008):
Early changes in biomarkers of skeletal metabolism and their association to the occurrence of osteochondrosis (OC) in the horse.
Equine Vet J. 40(3), 253-9.
- Ducy, P.; Desbois, C.; Boyce, B.; Pinero, G.; Story, B.; Dunstan, C.; Smith, E.; Bonadio, J.; Goldstein, S.; Gundberg, C.; Bradley, A.; Karsenty, G. (1996):

Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice.
Nature. 382(6590), 448-52.

Ekman, S.; Skioldebrand, E.; Heinegard, D.; Hultenby, K. (2005):
Ultrastructural immunolocalisation of bone sialoprotein in the osteocartilagenous interface of the equine third carpal bone.
Equine Vet J. 37(1), 26-30.

Eriksen, E. F.; Colvard, D. S.; Berg, N. J.; Graham, M. L.; Mann, K. G.; Spelsberg, T. C.; Riggs, B. L. (1988):
Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells.
Science. 241(4861), 84-6.

Eriksen, E. F.; Langdahl, B. (1995):
Bone changes in metabolic bone disease.
Acta Orthop Scand Suppl. 266, 195-201.

Eriksen, E. F.; Langdahl, B.; Vesterby, A.; Rungby, J.; Kassem, M. (1999):
Hormone replacement therapy prevents osteoclastic hyperactivity: A histomorphometric study in early postmenopausal women.
J Bone Miner Res. 14(7), 1217-21.

Estberg, L.; Stover, S. M.; Gardner, I. A.; Johnson, B. J.; Case, J. T.; Ardans, A.; Read, D. H.; Anderson, M. L.; Barr, B. C.; Daft, B. M.; Kinde, H.; Moore, J.; Stoltz, J.; Woods, L. W. (1996):
Fatal musculoskeletal injuries incurred during racing and training in thoroughbreds.
J Am Vet Med Assoc. 208(1), 92-6.

Eyre, L. J.; Bland, R.; Bujalska, I. J.; Sheppard, M. C.; Stewart, P. M.; Hewison, M. (1998):
Characterization of aromatase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in rat osteoblastic cells.
J Bone Miner Res. 13(6), 996-1004.

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

Fan, X.; Roy, E.; Zhu, L.; Murphy, T. C.; Ackert-Bicknell, C.; Hart, C. M.; Rosen, C.; Nanes, M. S.; Rubin, J. (2004):
Nitric oxide regulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells.
Endocrinology. 145(2), 751-9.

Farrugia, W.; Melick, R. A. (1986):
Metabolism of osteocalcin.
Calcif Tissue Int. 39(4), 234-8.

Fedarko, N. S.; Fohr, B.; Robey, P. G.; Young, M. F.; Fisher, L. W. (2000):
Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack.
J Biol Chem. 275(22), 16666-72.

Filipovic, N.; Stojevic, Z.; Prvanovic, N.; Tucek, Z. (2010):
The influence of late pregnancy and lactation on bone metabolism in mares.

Res Vet Sci. 88(3), 405-10.

Firth, E. C.; van Weeren, P. R.; Pfeiffer, D. U.; Delahunt, J.; Barneveld, A. (1999):
Effect of age, exercise and growth rate on bone mineral density (BMD) in third carpal bone
and distal radius of Dutch Warmblood foals with osteochondrosis.
Equine Vet J Suppl. 31, 74-8.

Fisher, L. W.; Whitson, S. W.; Avioli, L. V.; Termine, J. D. (1983):
Matrix sialoprotein of developing bone.
J Biol Chem. 258(20), 12723-7.

Fletcher, K. L.; Topliff, D. R.; Cooper, S. R.; Freeman, D. W.; Geisert, D. (2000):
Influence of age and sex on serum osteocalcin concentrations in horses at weaning and
during physical conditioning.
J Equine Vet J. 20(2), 124-126.

Franceschi, R. T.; Xiao, G.; Jiang, D.; Gopalakrishnan, R.; Yang, S.; Reith, E. (2003):
Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate
osteoblast differentiation.
Connect Tissue Res. 44 Suppl 1, 109-16.

Frasor, J.; Gibori, G. (2003):
Prolactin regulation of estrogen receptor expression.
Trends Endocrinol Metab. 14(3), 118-23.

Friedenstein, A. J.; Ivanov-Smolenski, A. A.; Chajlakjan, R. K.; Gorskaya, U. F.; Kuralesova,
A. I.; Latzinik, N. W.; Gerasimow, U. W. (1978):
Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants.
Exp Hematol. 6(5), 440-4.

Frisbie, D. D.; Mc Ilwraith, C. W.; Arthur, R. M.; Blea, J.; Baker, V. A.; Billingham, R. C.
(2010):
Serum biomarker levels for musculoskeletal disease in two- and three-year-old racing
Thoroughbred horses: A prospective study of 130 horses.
Equine Vet J. 42(7), 643-51.

Frost, H. M. (1960):
Micropetrosis.
J Bone Joint Surg Am. 42-A, 144-50.

Frost, H. M. (1983):
The skeletal intermediary organization.
Metab Bone Dis Relat Res. 4(5), 281-90.

Frost, H. M. (1990a):
Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 1. Redefining Wolff's law: the
bone modeling problem.
Anat Rec. 226(4), 403-13.

Frost, H. M. (1990b):
Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the
remodeling problem.
Anat Rec. 226(4), 414-22.

Frost, H. M. (1990c):

Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 3. The hyaline cartilage modeling problem.

Anat Rec. 226(4), 423-32.

Frost, H. M. (1990d):

Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 4. Mechanical influences on intact fibrous tissues.

Anat Rec. 226(4), 433-9.

Fujikawa, Y.; Shingu, M.; Torisu, T.; Itonaga, I.; Masumi, S. (1996):

Bone resorption by tartrate-resistant acid phosphatase-positive multinuclear cells isolated from rheumatoid synovium.

Brit J Rheumatol. 35(3), 213-7.

Gallop, P. M.; Lian, J. B.; Hauschka, P. V. (1980):

Carboxylated calcium-binding proteins and vitamin K.

N Engl J Med. 302(26), 1460-6.

Ganjam, V. K.; Kenney, R. M. (1975):

Androgens and oestrogens in normal and cryptorchid stallions.

J Reprod Fertil Suppl(23), 67-73.

Garnero, P.; Borel, O.; Delmas, P. D. (2001):

Evaluation of a fully automated serum assay for C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen in osteoporosis.

Clin Chem. 47(4), 694-702.

Gastal, E. L.; Gastal, M. O.; Ginther, O. J. (1999):

Experimental assumption of dominance by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares.

Biol Reprod. 61(3), 724-30.

Genetos, D. C.; Geist, D. J.; Liu, D.; Donahue, H. J.; Duncan, R. L. (2005):

Fluid shear-induced ATP secretion mediates prostaglandin release in MC3T3-E1 osteoblasts.

J Bone Miner Res. 20(1), 41-9.

Gerlach, T.; Aurich, J. E. (2000):

Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster.

Anim Reprod Sci. 58(3-4), 197-213.

Gill, R. K.; Turner, R. T.; Wronski, T. J.; Bell, N. H. (1998):

Orchiectomy markedly reduces the concentration of the three isoforms of transforming growth factor beta in rat bone, and reduction is prevented by testosterone.

Endocrinology. 139(2), 546-50.

Glasier, A. F.; Irvine, D. S.; Wickings, E. J.; Hillier, S. G.; Baird, D. T. (1989):

A comparison of the effects on follicular development between clomiphene citrate, its two separate isomers and spontaneous cycles.

Hum Reprod. 4(3), 252-6.

Glass, D. A.; Bialek, P.; Ahn, J. D.; Starbuck, M.; Patel, M. S.; Clevers, H.; Taketo, M. M.; Long, F.; McMahon, A. P.; Lang, R. A.; Karsenty, G. (2005):

Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation.

Dev Cell. 8(5), 751-64.

- Gori, F.; Hofbauer, L. C.; Conover, C. A.; Khosla, S. (1999):
Effects of androgens on the insulin-like growth factor system in an androgen-responsive human osteoblastic cell line.
Endocrinology. 140(12), 5579-86.
- Goto, T.; Yamaza, T.; Tanaka, T. (2003):
Cathepsins in the osteoclast.
J Electron Microsc (Tokyo). 52(6), 551-8.
- Grafenau, P.; Carstanjen, B.; Lepage, O. M. (2000):
Osteocalcin: A biochemical marker of bone formation in equine medicine.
Vet Med-Czech. 45(7), 209-216.
- Grafenau, P.; Eicher, R.; Uebelhart, B.; Tschudi, P.; Lepage, O. M. (1999):
General anaesthesia decreases osteocalcin plasma concentrations in horses.
Equine Vet J. 31(6), 533-6.
- Gray, A. W.; Davies, M. E.; Jeffcott, L. B. (1998):
In vitro generation of equine osteoclasts from bone marrow cells using a novel culture system.
Res Vet Sci. 65(2), 155-60.
- Gray, A. W.; Davies, M. E.; Jeffcott, L. B. (2002):
Localisation and activity of cathepsins K and B in equine osteoclasts.
Res Vet Sci. 72(2), 95-103.
- Gray, J. A. (1996):
Investigations into the use of biochemical markers of bone metabolism in the horse. PhD thesis. -: Open University Press. -.
University of Cambridge.
- Green, P. (2001):
Castration techniques in the horse.
In Practice. 23(5), 250-261.
- Green, S.; Anstiss, C. L.; Fishman, W. H. (1971):
Automated differential isoenzyme analysis. II. The fractionation of serum alkaline phosphatases into "liver", "intestinal" and "other" components.
Enzymologia. 41(1), 9-26.
- Greiner, C.; Cavalier, E.; Remy, B.; Gabriel, A.; Farnir, F.; Gajewski, Z.; Carstanjen, B. (2012):
Pol J Vet Sci. 15(4), 793-5.
- Gross, T. S.; Akeno, N.; Clemens, T. L.; Komarova, S.; Srinivasan, S.; Weimer, D. A.; Mayorov, S. (2001):
Selected Contribution: Osteocytes upregulate HIF-1alpha in response to acute disuse and oxygen deprivation.
J Appl Physiol. 90(6), 2514-9.
- Gu, G.; Hentunen, T. A.; Nars, M.; Harkonen, P. L.; Vaananen, H. K. (2005):
Estrogen protects primary osteocytes against glucocorticoid-induced apoptosis.
Apoptosis. 10(3), 583-95.
- Hall, J.; McDonnell, D. (1999):

The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens.

Endocrinology. 140(12), 5566-78.

Halleen, J.; Hentunen, T. A.; Hellman, J.; Vaananen, H. K. (1996):

Tartrate-resistant acid phosphatase from human bone: purification and development of an immunoassay.

J Bone Miner Res. 11(10), 1444-52.

Halleen, J. M.; Alatalo, S. L.; Suominen, H.; Cheng, S.; Janckila, A. J.; Vaananen, H. K. (2000):

Tartrate-Resistant Acid Phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption.

J Bone Miner Res. 15(7), 1337-45.

Han, B.; Copeland, M.; Geiser, A. G.; Hale, L. V.; Harvey, A.; Ma, Y. L.; Powers, C. S.; Sato, M.; You, J.; Hale, J. E. (2007):

Development of a highly sensitive, high-throughput, mass spectrometry-based assay for rat procollagen type-I N-terminal propeptide (PINP) to measure bone formation activity.

J Proteome Res. 6(11), 4218-29.

Han, Y.; Cowin, S. C.; Schaffler, M. B.; Weinbaum, S. (2004):

Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes.

Proc Natl Acad Sci U S A. 101(47), 16689-94.

Hank, A. M.; Hoffmann, W. E.; Sanecki, R. K.; Schaeffer, D. J.; Dorner, J. L. (1993):

Quantitative determination of equine alkaline phosphatase isoenzymes in foal and adult serum.

J Vet Intern Med. 7(1), 20-4.

Haussler, K. K.; Stover, S. M. (1998):

Stress fractures of the vertebral lamina and pelvis in Thoroughbred racehorses.

Equine Vet J. 30(5), 374-81.

Henson, F. M.; Davies, M. E.; Skepper, J. N.; Jeffcott, L. B. (1995):

Localisation of alkaline phosphatase in equine growth cartilage.

J Anat. 187 (1), 151-9.

Hernandez, J.; Hawkins, D. L.; Scollay, M. C. (2001):

Race-start characteristics and risk of catastrophic musculoskeletal injury in Thoroughbred racehorses.

J Am Vet Med Assoc. 218(1), 83-6.

Hert, J.; Fiala, P.; Petrtyl, M. (1994):

Osteon orientation of the diaphysis of the long bones in man.

Bone. 15(3), 269-77.

Hillam, R. A.; Skerry, T. M. (1995):

Inhibition of bone resorption and stimulation of formation by mechanical loading of the modeling rat ulna in vivo.

J Bone Miner Res. 10(5), 683-9.

Hinojosa, A. M.; Bloeser, J. R.; Thomson, S. R.; Watson, E. D. (2001):

The effect of a GnRH antagonist on endocrine and seminal parameters in stallions.

Theriogenology. 56(5), 903-12.

- Hoekstra, K. E.; Nielsen, B. D.; Orth, M. W.; Rosenstein, D. S.; Schott, H. C., 2nd; Shelle, J. E. (1999):
Comparison of bone mineral content and biochemical markers of bone metabolism in stall- vs. pasture-reared horses.
Equine Vet J Suppl. 30, 601-4.
- Hofbauer, L. C.; Khosla, S.; Dunstan, C. R.; Lacey, D. L.; Boyle, W. J.; Riggs, B. L. (2000):
The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption.
J Bone Miner Res. 15(1), 2-12.
- Hofbauer, L. C.; Khosla, S.; Dunstan, C. R.; Lacey, D. L.; Spelsberg, T. C.; Riggs, B. L. (1999):
Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells.
Endocrinology. 140(9), 4367-70.
- Hoffman, L. S.; Adams, T. E.; Evans, J. W. (1987):
Circadian, circalunar and seasonal variation in patterns of gonadotrophin secretion in geldings.
J Reprod Fertil Suppl. 35, 51-8.
- Hoppen, H. O.; Niederstucke, H. (2008):
Ultra sensitive steroid radioimmunoassays for the diagnosis of equine gonadal dysfunction.
Pferdeheilkunde. 24(1), 4.
- Hotta, M.; Shibasaki, T.; Sato, K.; Demura, H. (1998):
The importance of body weight history in the occurrence and recovery of osteoporosis in patients with anorexia nervosa: evaluation by dual X-ray absorptiometry and bone metabolic markers.
Eur J Endocrinol. 139(3), 276-83.
- Hoyt, S.; Siciliano, P. D. (1999):
A comparison of ELISA and RIA techniques for the detection of serum osteocalcin in horses: 16th Equine Nutrition Physiology Symposium, 351–352.
- Hughes, D. E.; Dai, A.; Tiffée, J. C.; Li, H. H.; Mundy, G. R.; Boyce, B. F. (1996):
Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta.
Nat Med. 2(10), 1132-6.
- Hung, C. T.; Allen, F. D.; Pollack, S. R.; Brighton, C. T. (1996):
What is the role of the convective current density in the real-time calcium response of cultured bone cells to fluid flow?
J Biomech. 29(11), 1403-9.
- Hunter, G. K.; Kyle, C. L.; Goldberg, H. A. (1994):
Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation.
Biochem J. 300 (Pt 3), 723-8.
- Hussein, H.; Ishihara, A.; Menendez, M.; Bertone, A. (2014):
Pharmacokinetics and bone resorption evaluation of a novel Cathepsin K inhibitor (VEL-0230) in healthy adult horses.
J Vet Pharmacol Ther. 37(6), 556-564.

Inoue, K.; Mikuni-Takagaki, Y.; Oikawa, K.; Itoh, T.; Inada, M.; Noguchi, T.; Park, J. S.; Onodera, T.; Krane, S. M.; Noda, M.; Itohara, S. (2006):

A crucial role for matrix metalloproteinase 2 in osteocytic canalicular formation and bone metabolism.

J Biol Chem. 281(44), 33814-24.

Irvine, C. H.; Alexander, S. (1982):

Importance of testicular hormones in maintaining the annual pattern of LH secretion in the male horse.

J Reprod Fertil Suppl. 32, 97-102.

Jackson, B.; Eastell, R.; Russell, R. G.; Lanyon, L. E.; Price, J. S. (1996):

Measurement of bone specific alkaline phosphatase in the horse: a comparison of two techniques.

Res Vet Sci. 61(2), 160-4.

Jackson, B. F.; Blumsohn, A.; Goodship, A. E.; Wilson, A. M.; Price, J. S. (2003):

Circadian variation in biochemical markers of bone cell activity and insulin-like growth factor-I in two-year-old horses.

J Anim Sci. 81(11), 2804-10.

Jackson, B. F.; Dyson, P. K.; Hattersley, R. D.; Kelly, H. R.; Pfeiffer, D. U.; Price, J. S. (2006):

Relationship between stages of the estrous cycle and bone cell activity in Thoroughbreds.

Am J Vet Res. 67(9), 1527-32.

Jackson, B. F.; Dyson, P. K.; Lonnell, C.; Verheyen, K. L.; Pfeiffer, D. U.; Price, J. S. (2009):

Bone biomarkers and risk of fracture in two- and three-year-old Thoroughbreds.

Equine Vet J. 41(4), 410-3.

Jackson, B. F.; Goodship, A. E.; Eastell, R.; Price, J. S. (2003):

Evaluation of serum concentrations of biochemical markers of bone metabolism and insulin-like growth factor I associated with treadmill exercise in young horses.

Am J Vet Res. 64(12), 1549-56.

Jackson, B. F.; Lonnell, C.; Verheyen, K.; Wood, J. L.; Pfeiffer, D. U.; Price, J. S. (2003):

Gender differences in bone turnover in 2-year-old Thoroughbreds.

Equine Vet J. 35(7), 702-6.

Jackson, B. F.; Lonnell, C.; Verheyen, K. L.; Dyson, P.; Pfeiffer, D. U.; Price, J. S. (2005):

Biochemical markers of bone metabolism and risk of dorsal metacarpal disease in 2-year-old Thoroughbreds.

Equine Vet J. 37(1), 87-91.

Jaeschke, G. (1975):

[Routine determination of free hydroxyproline in horse serum. Methods and normal values].

Zentralbl Veterinarmed A. 22(2), 89-101.

Janett, F.; Stump, R.; Burger, D.; Thun, R. (2009):

Suppression of testicular function and sexual behavior by vaccination against GnRH (Equity) in the adult stallion.

Anim Reprod Sci. 115(1-4), 88-102.

Jee, W. S.; Mori, S.; Li, X. J.; Chan, S. (1990):

Prostaglandin E2 enhances cortical bone mass and activates intracortical bone remodeling in intact and ovariectomized female rats.
Bone. 11(4), 253-66.

Jorgensen, N. R.; Geist, S. T.; Civitelli, R.; Steinberg, T. H. (1997):
ATP- and gap junction-dependent intercellular calcium signaling in osteoblastic cells.
J Cell Biol. 139(2), 497-506.

Joyce, J. R.; Pierce, K. R.; Romane, W. M.; Baker, J. M. (1971):
Clinical study of nutritional secondary hyperparathyroidism in horses.
J Am Vet Med Assoc. 158(12), 2033-42.

Junqueira; Carneiro; Kelley (2002):
Histologie. -
Berlin: Springer Verlag. - ISBN:354041858.

Kafienah, W.; Bromme, D.; Buttle, D. J.; Croucher, L. J.; Hollander, A. P. (1998):
Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix.
Biochem J. 331 (Pt 3), 727-32.

Kanis, J. A. (1994):
Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group.
Osteoporos Int. 4(6), 368-81.

Karmatschek, M.; Maier, I.; Seibel, M. J.; Woitge, H. W.; Ziegler, R.; Armbruster, F. P. (1997):
Improved purification of human bone sialoprotein and development of a homologous radioimmunoassay.
Clin Chem. 43(11), 2076-82.

Kasperk, C.; Fitzsimmons, R.; Strong, D.; Mohan, S.; Jennings, J.; Wergedal, J.; Baylink, D. (1990):
Studies of the Mechanism by Which Androgens Enhance Mitogenesis and Differentiation in Bone-Cells.
J Clin Endocr Metab. 71(5), 1322-1329.

Kasperk, C. H.; Wergedal, J. E.; Farley, J. R.; Linkhart, T. A.; Turner, R. T.; Baylink, D. J. (1989):
Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro.
Endocrinology. 124(3), 1576-8.

Kawaguchi, H.; Pilbeam, C. C.; Vargas, S. J.; Morse, E. E.; Lorenzo, J. A.; Raisz, L. G. (1995):
Ovariectomy Enhances and Estrogen Replacement Inhibits the Activity of Bone-Marrow Factors That Stimulate Prostaglandin Production in Cultured Mouse Calvariae.
J Clin Invest. 96(1), 539-548.

Kellerhouse, P.; Brown, C.; Newhall, K. (2000):
Assessment of bone resorption marker assays in thoroughbred horses.
J Bone Miner Res Suppl 1. 15(3), 526.

Khosla, S.; Atkinson, E. J.; Dunstan, C. R.; O'Fallon, W. M. (2002):

Effect of estrogen versus testosterone on circulating osteoprotegerin and other cytokine levels in normal elderly men.

J Clin Endocrinol Metab. 87(4), 1550-4.

Kimble, R. B.; Srivastava, S.; Ross, F. P.; Matayoshi, A.; Pacifici, R. (1996):

Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production.

J Biol Chem. 271(46), 28890-7.

Knothe Tate, M. L. (2003):

“Whither flows the fluid in bone?” An osteocyte’s perspective.

J. Biomechan. 36, 1409-1424.

Komm, B. S.; Terpening, C. M.; Benz, D. J.; Graeme, K. A.; Gallegos, A.; Korc, M.; Greene, G. L.; O'Malley, B. W.; Haussler, M. R. (1988):

Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells.

Science. 241(4861), 81-4.

König, H. E.; Liebich, H. G. (2001):

Anatomie der Haussäugetiere Band 1, Bewegungsapparat. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. -

Hannover: Schattauer. - ISBN:978-3-7945-2153-1. Bewegungsapparat.

Korpela, J.; Tiitinen, S. L.; Hiekkanen, H.; Halleen, J. M.; Selander, K. S.; Vaananen, H. K.; Suominen, P.; Helenius, H.; Salminen, E. (2006):

Serum TRACP 5b and ICTP as markers of bone metastases in breast cancer.

Anticancer Res. 26(4B), 3127-32.

Kousteni, S.; Bellido, T.; Plotkin, L. I.; O'Brien, C. A.; Bodenner, D. L.; Han, L.; Han, K.; DiGregorio, G. B.; Katzenellenbogen, J. A.; Katzenellenbogen, B. S.; Roberson, P. K.; Weinstein, R. S.; Jilka, R. L.; Manolagas, S. C. (2001):

Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: Dissociation from transcriptional activity.

CELL. 104(5), 719-730.

Kraft, W.; Dürr, U. M. (2005):

[Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin]. -

Hannover: Schattauer. - ISBN:978-3-7945-2308-5.6.

Krishnan, V.; Bryant, H. U.; Macdougald, O. A. (2006):

Regulation of bone mass by Wnt signaling.

J Clin Invest. 116(5), 1202-9.

Krstić, R. V. (1988):

Die Gewebe des Menschen und der Säugetiere. 2. -

Berlin: Springer Verlag. - ISBN:3540190074.

Kuiper, G. G.; Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Nilsson, S.; Gustafsson, J. A. (1996):

Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary.

Proc Natl Acad Sci U S A. 93(12), 5925-30.

Labrie, F.; Luu-The, V.; Lin, S. X.; Simard, J.; Labrie, C.; El-Alfy, M.; Pelletier, G.; Belanger, A. (2000):

Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease.

J Mol Endocrinol. 25(1), 1-16.

Lazenby, R. A. (1990a):

Continuing periosteal apposition. I: Documentation, hypotheses, and interpretation.

Am J Phys Anthropol. 82(4), 451-72.

Lazenby, R. A. (1990b):

Continuing periosteal apposition. II: The significance of peak bone mass, strain equilibrium, and age-related activity differentials for mechanical compensation in human tubular bones.

Am J Phys Anthropol. 82(4), 473-84.

Lee, K.; Jessop, H.; Suswillo, R.; Zaman, G.; Lanyon, L. (2003):

Endocrinology: bone adaptation requires oestrogen receptor-alpha.

Nature. 424(6947), 389.

Lemazurier, E.; Moslemi, S.; Sourdain, P.; Desjardins, I.; Plainfosse, B.; Seralini, G. E. (2002):

Free and conjugated estrogens and androgens in stallion semen.

Gen Comp Endocrinol. 125(2), 272-82.

Lemazurier, E.; Toquet, M. P.; Fortier, G.; Seralini, G. E. (2002):

Sex steroids in serum of prepubertal male and female horses and correlation with bone characteristics.

Steroids. 67(5), 361-9.

Lepage, O. M.; Carstanjen, B.; Uebelhart, D. (2001):

Non-invasive assessment of equine bone: an update.

Vet J. 161(1), 10-22.

Lepage, O. M.; DesCoteaux, L.; Marcoux, M.; Tremblay, A. (1991):

Circadian rhythms of osteocalcin in equine serum. Correlation with alkaline phosphatase, calcium, phosphate and total protein levels.

Can J Vet Res. 55(1), 5-10.

Lepage, O. M.; Eicher, R.; Uebelhart, B.; Tschudi, P. (1997):

Influence of type and breed of horse on serum osteocalcin concentration, and evaluation of the applicability of a bovine radioimmunoassay and a human immunoradiometric assay [corrected].

Am J Vet Res. 58(6), 574-8.

Lepage, O. M.; Hartmann, D. J.; Eicher, R.; Uebelhart, B.; Tschudi, P.; Uebelhart, D. (1998):

Biochemical markers of bone metabolism in draught and warmblood horses.

Vet J. 156(3), 169-75.

Lepage, O. M.; Marcoux, M.; Tremblay, A. (1990):

Serum osteocalcin or bone Gla-protein, a biochemical marker for bone metabolism in horses: differences in serum levels with age.

Can J Vet Res. 54(2), 223-6.

Li, J.; Duncan, R. L.; Burr, D. B.; Gattone, V. H.; Turner, C. H. (2003):

Parathyroid hormone enhances mechanically induced bone formation, possibly involving L-type voltage-sensitive calcium channels.

Endocrinology. 144(4), 1226-33.

Li, Z.; Yasuda, Y.; Li, W.; Bogyo, M.; Katz, N.; Gordon, R. E.; Fields, G. B.; Bromme, D. (2004):

Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans.
J Biol Chem. 279(7), 5470-9.

Liebich, H. G. (2009):

Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. -: Schattauer. -
ISBN:9783794526925.

Lin, S. C.; Yamate, T.; Taguchi, Y.; Borba, V. Z.; Girasole, G.; O'Brien, C. A.; Bellido, T.; Abe, E.; Manolagas, S. C. (1997):

Regulation of the gp80 and gp130 subunits of the IL-6 receptor by sex steroids in the murine bone marrow.

J Clin Invest. 100(8), 1980-90.

Locke, M. (2004):

Structure of long bones in mammals.

J Morphol. 262(2), 546-65.

Lowry, M.; Hall, D. E.; Brosnan, J. T. (1985):

Hydroxyproline metabolism by the rat kidney: distribution of renal enzymes of hydroxyproline catabolism and renal conversion of hydroxyproline to glycine and serine.

Metabolism. 34(10), 955-61.

Maenpaa, P. E.; Pirskanen, A.; Koskinen, E. (1988):

Biochemical indicators of bone formation in foals after transfer from pasture to stables for the winter months.

Am J Vet Res. 49(11), 1990-2.

Maenpaa, P. H.; Pirhonen, A.; Koskinen, E. (1988):

Vitamin A, E and D nutrition in mares and foals during the winter season: effect of feeding two different vitamin-mineral concentrates.

J Anim Sci. 66(6), 1424-9.

Malluche, H. H.; Rodgers, J. B. (1993):

Ernst Schering Research Foundation Workshop 9 - Sex steroid and bone. Animal Models for Osteoporosis. Berlin, Springer Verlag. 119.

Malpoux, B.; Migaud, M.; Tricoire, H.; Chemineau, P. (2001):

Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin.

J Biol Rhythms. 16(4), 336-47.

Manolagas, S. C. (1998):

The role of IL-6 type cytokines and their receptors in bone.

Ann N Y Acad Sci. 840, 194-204.

Manolagas, S. C. (2000):

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

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

Marotti, G. (1996):

The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition.

Ital J Anat Embryol. 101(4), 25-79.

- Marr, C. M.; Love, S.; Pirie, H. M. (1989):
Clinical, ultrasonographic and pathological findings in a horse with splenic lymphosarcoma and pseudohyperparathyroidism.
Equine Vet J. 21(3), 221-6.
- Martin, T. J. (2004):
Paracrine regulation of osteoclast formation and activity: milestones in discovery.
J Musculoskelet Neuronal Interact. 4(3), 243-53.
- Mason, D. J.; Suva, L. J.; Genever, P. G.; Patton, A. J.; Steuckle, S.; Hillam, R. A.; Skerry, T. M. (1997):
Mechanically regulated expression of a neural glutamate transporter in bone: a role for excitatory amino acids as osteotropic agents?
Bone. 20(3), 199-205.
- McHugh, K. P.; Hodivala-Dilke, K.; Zheng, M. H.; Namba, N.; Lam, J.; Novack, D.; Feng, X.; Ross, F. P.; Hynes, R. O.; Teitelbaum, S. L. (2000):
Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts.
J Clin Invest. 105(4), 433-40.
- McKenzie, R. A.; Gartner, R. J.; Blaney, B. J.; Glanville, R. J. (1981):
Control of nutritional secondary hyperparathyroidism in grazing horses with calcium plus phosphorus supplementation.
Aust Vet J. 57(12), 554-7.
- Melick, R. A.; Farrugia, W.; Heaton, C. L.; Quelch, K. J.; Scoggins, B. A.; Wark, J. D. (1988):
The metabolic clearance rate of osteocalcin in sheep.
Calcif Tissue Int. 42(3), 185-90.
- Meunier, P. J. (1986):
Cellular mechanisms of bone remodeling evaluated at the intermediary level of organization of bone.
Adv Exp Med Biol. 208, 247-54.
- Miyauchi, A.; Notoya, K.; Mikuni-Takagaki, Y.; Takagi, Y.; Goto, M.; Miki, Y.; Takano-Yamamoto, T.; Jinnai, K.; Takahashi, K.; Kumegawa, M.; Chihara, K.; Fujita, T. (2000):
Parathyroid hormone-activated volume-sensitive calcium influx pathways in mechanically loaded osteocytes.
J Biol Chem. 275(5), 3335-42.
- Muyan, M.; Roser, J. F.; Dybdal, N.; Baldwin, D. M. (1993):
Modulation of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release in cultured male equine anterior pituitary cells by gonadal steroids.
Biol Reprod. 49(2), 340-5.
- Nagata, S.; Miyake, Y. I.; Nambo, Y.; Nagamine, N.; Watanabe, G.; Tsunoda, N.; Taniyama, H.; Hondo, E.; Yamada, J.; Taya, K. (1998):
Inhibin secretion in the stallion.
Equine Vet J. 30(2), 98-103.
- Nakashima, K.; Zhou, X.; Kunkel, G.; Zhang, Z.; Deng, J. M.; Behringer, R. R.; de Crombrughe, B. (2002):
The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation.
Cell. 108(1), 17-29.

Nampe, A.; Hashimoto, J.; Hayashida, K.; Tsuboi, H.; Shi, K.; Tsuji, I.; Miyashita, H.; Yamada, T.; Matsukawa, N.; Matsumoto, M.; Morimoto, S.; Ogihara, T.; Ochi, T.; Yoshikawa, H. (2004):

Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone.

J Bone Miner Metab. 22(3), 176-84.

Nononen, A.; Cheng, S.; Ivaska, K. K.; Alatalo, S. L.; Lehtimäki, T.; Schmidt-Gayk, H.; Uusi-Rasi, K.; Heinonen, A.; Kannus, P.; Sievanen, H.; Vuori, I.; Vaananen, H. K.; Halleen, J. M. (2005):

Serum TRACP 5b is a useful marker for monitoring alendronate treatment: comparison with other markers of bone turnover.

J Bone Miner Res. 20(10), 1804-12.

Newquist, J. M.; Baxter, G. M. (2009):

Evaluation of plasma fibrinogen concentration as an indicator of physeal or epiphyseal osteomyelitis in foals: 17 cases (2002-2007).

J Am Vet Med Assoc. 235(4), 415-9.

Nielsen, B. D.; Cate, R. E.; O'Connor-Robison, C. I. (2010):

A Marine Mineral Supplement Alters Markers of Bone Metabolism in Yearling Arabians.

J Equine Vet Sci. 30(8), 419-424.

Nilsson, L.; Boman, A.; Sävendahl, L.; Grigelioniene, G.; Ohlsson, C.; Ritzén, E.; Wroblewski, J. (1999):

Demonstration of estrogen receptor-beta immunoreactivity in human growth plate cartilage.

J Clin Endocrinol Metab. 84(1), 370-3.

Niyibizi, C.; Eyre, D. R. (1994):

Structural characteristics of cross-linking sites in type V collagen of bone. Chain specificities and heterotypic links to type I collagen.

Eur J Biochem. 224(3), 943-50.

Noble, B. S. (2008):

The osteocyte lineage.

Arch Biochem Biophys. 473(2), 106-11.

Noble, B. S.; Reeve, J. (2000):

Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance.

Mol Cell Endocrinol. 159(1-2), 7-13.

Nunokawa, Y.; Fujinaga, T.; Taira, T.; Okumura, M.; Yamashita, K.; Tsunoda, N.; Hagio, M. (1993):

Evaluation of serum amyloid A protein as an acute-phase reactive protein in horses.

J Vet Med Sci. 55(6), 1011-6.

O'Donnell, L.; Robertson, K. M.; Jones, M. E.; Simpson, E. R. (2001):

Estrogen and spermatogenesis.

Endocr Rev. 22(3), 289-318.

Orikasa, M.; Kawase, T.; Suzuki, A. (1993):

Induction of macrophagic and granulocytic differentiation of murine bone marrow progenitor cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

Calcif Tissue Int. 53(3), 193-200.

- Oursler, M.; Pederson, L.; Fitzpatrick, L.; Riggs, B.; Spelsberg, T. (1994):
Human giant cell tumors of the bone (osteoclastomas) are estrogen target cells.
Proc Natl Acad Sci U S A. 91(12), 5227-31.
- Oursler, M. J.; Cortese, C.; Keeting, P.; Anderson, M. A.; Bonde, S. K.; Riggs, B. L.; Spelsberg, T. C. (1991):
Modulation of transforming growth factor-beta production in normal human osteoblast-like cells by 17 beta-estradiol and parathyroid hormone.
Endocrinology. 129(6), 3313-20.
- Oursler, M. J.; Osdoby, P.; Pyfferoen, J.; Riggs, B. L.; Spelsberg, T. C. (1991):
Avian Osteoclasts as Estrogen Target-Cells.
Proc Natl Acad Sci U S A. 88(15), 6613-6617.
- Oz, O. K.; Zerwekh, J. E.; Fisher, C.; Graves, K.; Nanu, L.; Millsaps, R.; Simpson, E. R. (2000):
Bone has a sexually dimorphic response to aromatase deficiency.
J Bone Miner Res. 15(3), 507-14.
- Pacifici, R. (1996):
Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis.
J Bone Miner Res. 11(8), 1043-51.
- Pagani, F.; Bonetti, G.; Stefini, F.; Panteghini, M. (2000):
Evaluation of a fully automated assay to measure C-telopeptide of type I collagen in serum.
Clin Chem Lab Med. 38(11), 1111-3.
- Parfitt, A. M. (1994):
Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone.
J Cell Biochem. 55(3), 273-86.
- Pastoret, V.; Carstanjen, B.; Lejeune, J. P.; Farnir, F.; Remy, B.; Reginster, J. Y.; Serteyn, D.; Gabriel, A. (2007):
Evaluation of serum osteocalcin and CTX-I in Ardenner horses with special reference to juvenile interphalangeal joint disease.
J Vet Med. 54(9), 458-463.
- Patterson-Allen, P.; Brautigam, C. E.; Grindeland, R. E.; Asling, C. W.; Callahan, P. X. (1982):
A specific radioimmunoassay for osteocalcin with advantageous species crossreactivity.
Anal Biochem. 120(1), 1-7.
- Pavalko, F. M.; Chen, N. X.; Turner, C. H.; Burr, D. B.; Atkinson, S.; Hsieh, Y. F.; Qiu, J.; Duncan, R. L. (1998):
Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions.
Am J Physiol. 275(6 Pt 1), C1591-601.
- Pavalko, F. M.; Gerard, R. L.; Ponik, S. M.; Gallagher, P. J.; Jin, Y.; Norvell, S. M. (2003):
Fluid shear stress inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in osteoblasts: a role for fluid shear stress-induced activation of PI3-kinase and inhibition of caspase-3.
J Cell Physiol. 194(2), 194-205.
- Peauroi, J. R.; Fisher, D. J.; Mohr, F. C.; Vivrette, S. L. (1998):

Primary hyperparathyroidism caused by a functional parathyroid adenoma in a horse.
J Am Vet Med Assoc. 212(12), 1915-8.

Pederson, L.; Kremer, M.; Judd, J.; Pascoe, D.; Spelsberg, T.; Riggs, B.; Oursler, M. (1999):
Androgens regulate bone resorption activity of isolated osteoclasts in vitro.
Proc Natl Acad Sci U S A. 96(2), 505-10.

Pinchbeck, G. L.; Clegg, P. D.; Boyde, A.; Barr, E. D.; Riggs, C. M. (2013):
Horse-, training- and race-level risk factors for palmar/plantar osteochondral disease in the
racing Thoroughbred.
Equine Vet J. 45(5), 582-6.

Price, J.; Jackson, B.; Gray, J. A.; Wright, I.; Harris, P. E.; Russell, R. G.; Eastell, R.; Mc
Ilwraith, C. W.; Ricketts, S. W.; Lanyon, L. (1997):
Serum levels of molecular markers in growing horses: the effects of age, season, and
orthopaedic disease.
Trans Orth Res Soc. 587(22).

Price, J. S.; Jackson, B.; Eastell, R.; Goodship, A. E.; Blumsohn, A.; Wright, I.; Stoneham, S.;
Lanyon, L. E.; Russell, R. G. (1995a):
Age related changes in biochemical markers of bone metabolism in horses.
Equine Vet J. 27(3), 201-7.

Price, J. S.; Jackson, B.; Eastell, R.; Wilson, A. M.; Russell, R. G.; Lanyon, L. E.; Goodship,
A. E. (1995b):
The response of the skeleton to physical training: a biochemical study in horses.
Bone. 17(3), 221-7.

Price, J. S.; Jackson, B. F.; Gray, J. A.; Harris, P. A.; Wright, I. M.; Pfeiffer, D. U.; Robins, S.
P.; Eastell, R.; Ricketts, S. W. (2001):
Biochemical markers of bone metabolism in growing thoroughbreds: a longitudinal study.
Res Vet Sci. 71(1), 37-44.

Price, P. A.; Fraser, J. D.; Metz-Virca, G. (1987):
Molecular cloning of matrix Gla protein: implications for substrate recognition by the vitamin
K-dependent gamma-carboxylase.
Proc Natl Acad Sci U S A. 84(23), 8335-9.

Price, P. A.; Williamson, M. K.; Lothringer, J. W. (1981):
Origin of the vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney
and bone.
J Biol Chem. 256(24), 12760-6.

Reich, K. M.; Gay, C. V.; Frangos, J. A. (1990):
Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production.
J Cell Physiol. 143(1), 100-4.

Reich, K. M.; McAllister, T. N.; Gudi, S.; Frangos, J. A. (1997):
Activation of G proteins mediates flow-induced prostaglandin E2 production in osteoblasts.
Endocrinology. 138(3), 1014-8.

Riggs, B. L. (2000):
The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption.
J Clin Invest. 106(10), 1203-4.

- Riggs, B. L.; Khosla, S.; Melton, L. J. (2002):
Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton.
Endocr Rev. 23(3), 279-302.
- Riggs, B. L.; Khosla, S.; Melton, L. J., 3rd (1998):
A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men.
J Bone Miner Res. 13(5), 763-73.
- Risteli, J.; Elomaa, I.; Niemi, S.; Novamo, A.; Risteli, L. (1993):
Radioimmunoassay for the pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone collagen degradation.
Clin Chem. 39(4), 635-40.
- Robledo, R. F.; Rajan, L.; Li, X.; Lufkin, T. (2002):
The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development.
Genes Dev. 16(9), 1089-101.
- Robling, A. G.; Niziolek, P. J.; Baldrige, L. A.; Condon, K. W.; Allen, M. R.; Alam, I.; Mantila, S. M.; Gluhak-Heinrich, J.; Bellido, T. M.; Harris, S. E.; Turner, C. H. (2008):
Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin.
J Biol Chem. 283(9), 5866-75.
- Ronen, N.; van Heerden, J.; van Amstel, S. R. (1992):
Clinical and biochemistry findings, and parathyroid hormone concentrations in three horses with secondary hyperparathyroidism.
J S Afr Vet Assoc. 63(3), 134-6.
- Rosen, H. N.; Dresner-Pollak, R.; Moses, A. C.; Rosenblatt, M.; Zeind, A. J.; Clemens, J. D.; Greenspan, S. L. (1994):
Specificity of urinary excretion of cross-linked N-telopeptides of type I collagen as a marker of bone turnover.
Calcif Tissue Int. 54(1), 26-9.
- Roser, J. F. (2008):
Regulation of testicular function in the stallion: an intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems.
Anim Reprod Sci. 107(3-4), 179-96.
- Roser, J. F.; McCue, P. M.; Hoye, E. (1994):
Inhibin activity in the mare and stallion.
Domest Anim Endocrinol. 11(1), 87-100.
- Ross, F. P.; Chappel, J.; Alvarez, J. I.; Sander, D.; Butler, W. T.; Farach-Carson, M. C.; Mintz, K. A.; Robey, P. G.; Teitelbaum, S. L.; Cheresch, D. A. (1993):
Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption.
J Biol Chem. 268(13), 9901-7.
- Rubin, J.; Murphy, T.; Nanes, M. S.; Fan, X. (2000):
Mechanical strain inhibits expression of osteoclast differentiation factor by murine stromal cells.
Am J Physiol Cell Physiol. 278(6), C1126-32.

- Salminen, E.; Ala-Houhala, M.; Korpela, J.; Varpula, M.; Tiitinen, S. L.; Halleen, J. M.; Vaananen, H. K. (2005):
Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of skeletal changes in prostate cancer.
Acta Oncol. 44(7), 742-7.
- Sassi, M. L.; Eriksen, H.; Risteli, L.; Niemi, S.; Mansell, J.; Gowen, M.; Risteli, J. (2000):
Immunochemical characterization of assay for carboxyterminal telopeptide of human type I collagen: loss of antigenicity by treatment with cathepsin K.
Bone. 26(4), 367-73.
- Savage, C. J.; Tidd, L. C.; Melsen, F.; Jeffcott, L. B.; Ostblom, L. (1991):
Bone biopsy in the horse. 2. Evaluation of histomorphometric examination.
Zentralbl Veterinarmed A. 38(10), 784-92.
- Saxne, T.; Zunino, L.; Heinegard, D. (1995):
Increased release of bone sialoprotein into synovial fluid reflects tissue destruction in rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum. 38(1), 82-90.
- Schaffler, M. B.; Burr, D. B.; Frederickson, R. G. (1987):
Morphology of the osteonal cement line in human bone.
Anat Rec. 217(3), 223-8.
- Seibel, M. J. (2005):
Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability.
Clin Biochem Rev. 26(4), 97-122.
- Seibel, M. J. (2006):
Dynamics of bone and cartilage metabolism: Principles and Clinical Applications. 2. -
San Diego. - ISBN:978-0-12-088562-6.
- Seibel, M. J.; Woitge, H. W.; Pecherstorfer, M.; Karmatschek, M.; Horn, E.; Ludwig, H.; Armbruster, F. P.; Ziegler, R. (1996):
Serum immunoreactive bone sialoprotein as a new marker of bone turnover in metabolic and malignant bone disease.
J Clin Endocrinol Metab. 81(9), 3289-94.
- Shevde, N. K.; Bendixen, A. C.; Dienger, K. M.; Pike, J. W. (2000):
Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression.
Proc Natl Acad Sci U S A. 97(14), 7829-34.
- Siciliano, P. D.; Kawcak, C. E.; McIlwraith, C. W. (2000):
The effect of initiation of exercise training in young horses on vitamin K status.
J Anim Sci. 78(9), 2353-8.
- Simonet, W. S.; Lacey, D. L.; Dunstan, C. R.; Kelley, M.; Chang, M. S.; Luthy, R.; Nguyen, H. Q.; Wooden, S.; Bennett, L.; Boone, T.; Shimamoto, G.; DeRose, M.; Elliott, R.; Colombero, A.; Tan, H. L.; Trail, G.; Sullivan, J.; Davy, E.; Bucay, N.; Renshaw-Gegg, L.; Hughes, T. M.; Hill, D.; Pattison, W.; Campbell, P.; Sander, S.; Van, G.; Tarpley, J.; Derby, P.; Lee, R.; Boyle, W. J. (1997):
Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density.
Cell. 89(2), 309-19.

Sims, N. A.; Dupont, S.; Krust, A.; Clement-Lacroix, P.; Minet, D.; Resche-Rigon, M.; Gaillard-Kelly, M.; Baron, R. (2002):

Deletion of estrogen receptors reveals a regulatory role for estrogen receptors-beta in bone remodeling in females but not in males.

Bone. 30(1), 18-25.

Srivastava, S.; Weitzmann, M. N.; Cenci, S.; Ross, F. P.; Adler, S.; Pacifici, R. (1999):

Estrogen decreases TNF gene expression by blocking JNK activity and the resulting production of c-Jun and JunD.

J Clin Invest. 104(4), 503-13.

Stepan, J. J.; Lachman, M.; Zverina, J.; Pacovsky, V.; Baylink, D. J. (1989):

Castrated men exhibit bone loss: effect of calcitonin treatment on biochemical indices of bone remodeling.

J Clin Endocrinol Metab. 69(3), 523-7.

Stinson, R. A.; Hamilton, B. A. (1994):

Human liver plasma membranes contain an enzyme activity that removes membrane anchor from alkaline phosphatase and converts it to a plasma-like form.

Clin Biochem. 27(1), 49-55.

Suda, T.; Takahashi, N.; Udagawa, N.; Jimi, E.; Gillespie, M. T.; Martin, T. J. (1999):

Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families.

Endocr Rev. 20(3), 345-57.

Sun, L.; Peng, Y.; Sharrow, A. C.; Iqbal, J.; Blair, H. C.; Zaidi, M. (2006):

FSH Directly Regulates Bone Mass.

Cell. 125, 247-260.

Suzuki, Y.; Kubota, T.; Koizumi, T.; Satoyoshi, M.; Teranaka, T.; Kawase, T.; Ikeda, T.; Yamaguchi, A.; Saito, S.; Mikuni-Takagaki, Y. (1996):

Extracellular processing of bone and dentin proteins in matrix mineralization.

Connect Tissue Res. 35(1-4), 223-9.

Thompson, D. L., Jr.; Pickett, B. W.; Squires, E. L.; Nett, T. M. (1979):

Effect of testosterone and estradiol-17 beta alone and in combination on LH and FSH concentrations in blood serum and pituitary of geldings and in serum after administration of GnRH.

Biol Reprod. 21(5), 1231-7.

Thoren-Tolling, K. (1988):

Serum alkaline phosphatase isoenzymes in the horse--variation with age, training and in different pathological conditions.

Zentralbl Veterinarmed A. 35(1), 13-23.

Tilbrook, A. J.; de Kretser, D. M.; Cummins, J. T.; Clarke, I. J. (1991):

The negative feedback effects of testicular steroids are predominantly at the hypothalamus in the ram.

Endocrinology. 129(6), 3080-92.

Tomkinson, A.; Gevers, E. F.; Wit, J. M.; Reeve, J.; Noble, B. S. (1998):

The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis.

J Bone Miner Res. 13(8), 1243-50.

- Toyosawa, S.; Shintani, S.; Fujiwara, T.; Ooshima, T.; Sato, A.; Ijuhin, N.; Komori, T. (2001):
Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts.
J Bone Miner Res. 16(11), 2017-26.
- Trumble, T. N.; Brown, M. P.; Merritt, K. A.; Billinghamurst, R. C. (2008):
Joint dependent concentrations of bone alkaline phosphatase in serum and synovial fluids of horses with osteochondral injury: an analytical and clinical validation.
Osteoarthritis Cartilage. 16(7), 779-86.
- Turner, R. T.; Colvard, D. S.; Spelsberg, T. C. (1990):
Estrogen inhibition of periosteal bone formation in rat long bones: down-regulation of gene expression for bone matrix proteins.
Endocrinology. 127(3), 1346-51.
- Vallance, S. A.; Case, J. T.; Entwistle, R. C.; Kinde, H.; Barr, B. C.; Moore, J.; Anderson, M. L.; Arthur, R. M.; Stover, S. M. (2012):
Characteristics of Thoroughbred and Quarter Horse racehorses that sustained a complete scapular fracture.
Equine Vet J. 44(4), 425-31.
- van de Lest, C. H.; Brama, P. A.; van Weeren, P. R. (2003):
The influence of exercise on bone morphogenic enzyme activity of immature equine subchondral bone.
Biorheology. 40(1-3), 377-82.
- Van Harreveld, P. D.; Lillich, J. D.; Kawcak, C. E.; Gaughan, E. M.; McLaughlin, R. M.; Debowes, R. M. (2002):
Clinical evaluation of the effects of immobilization followed by remobilization and exercise on the metacarpophalangeal joint in horses.
Am J Vet Res. 63(2), 282-8.
- Van Hoof, V. O.; Hoylaerts, M. F.; Geryl, H.; Van Mullem, M.; Lepoutre, L. G.; De Broe, M. E. (1990):
Age and sex distribution of alkaline phosphatase isoenzymes by agarose electrophoresis.
Clin Chem. 36(6), 875-8.
- van Wuijckhuise-Sjouke, L. A. (1984):
[Plasma fibrinogen as a parameter of the presence and severity of inflammation in horses and cattle].
Tijdschr Diergeneeskd. 109(21), 869-72.
- Vanderschueren, D.; Van Herck, E.; Suiker, A. M.; Visser, W. J.; Schot, L. P.; Chung, K.; Lucas, R. S.; Einhorn, T. A.; Bouillon, R. (1993):
Bone and mineral metabolism in the androgen-resistant (testicular feminized) male rat.
J Bone Miner Res. 8(7), 801-9.
- Vanderschueren, D.; Vandenput, L.; Boonen, S.; Lindberg, M. K.; Bouillon, R.; Ohlsson, C. (2004):
Androgens and bone.
Endocr Rev. 25(3), 389-425.
- Verborgt, O.; Tatton, N. A.; Majeska, R. J.; Schaffler, M. B. (2002):
Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation?

J Bone Miner Res. 17(5), 907-14.

Verhas, M.; Schoutens, A.; L'Hermite-Baleriaux, M.; Dourov, N.; Verschaeren, A.; Mone, M.; Heilporn, A. (1986):
The effect of orchidectomy on bone metabolism in aging rats.
Calcif Tissue Int. 39(2), 74-7.

Vervuert, I.; Coenen, M.; Wedemeyer, U.; Harmeyer, J. (2002):
Biochemical markers of bone activity in young standardbred horses during different types of exercise and training.
J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 49(8), 396-402.

Vervuert, I.; Stanik, K.; Coenen, M. (2006):
Effects of different levels of calcium and phosphorus intake on calcium homeostasis in exercising horses.
Equine Vet J Suppl(36), 659-63.

Vervuert, I.; Winkelsett, S.; Christmann, L.; Bruns, E.; Hoppen, H. O.; Distl, O.; Hertsch, B.; Coenen, M. (2007):
Evaluation of the influences of exercise, birth date, and osteochondrosis on plasma bone marker concentrations in Hanoverian Warmblood foals.
Am J Vet Res. 68(12), 1319-23.

Vidal, O.; Kindblom, L. G.; Ohlsson, C. (1999):
Expression and localization of estrogen receptor-beta in murine and human bone.
J Bone Miner Res. 14(6), 923-9.

Vidal, O.; Lindberg, M.; Savendahl, L.; Lubahn, D. B.; Ritzen, E. M.; Gustafsson, J. A.; Ohlsson, C. (1999):
Disproportional body growth in female estrogen receptor-alpha-inactivated mice.
Biochem Biophys Res Commun. 265(2), 569-71.

Vidal, O.; Lindberg, M. K.; Hollberg, K.; Baylink, D. J.; Andersson, G.; Lubahn, D. B.; Mohan, S.; Gustafsson, J. A.; Ohlsson, C. (2000):
Estrogen receptor specificity in the regulation of skeletal growth and maturation in male mice.
Proc Natl Acad Sci U S A. 97(10), 5474-9.

Voet, D. J.; Voet, J. G.; Pratt, W. G. (2002):
Lehrbuch der Biochemie. -: Wiley-VCH. - ISBN:3-527-30519-X.22.

Wakley, G. K.; Schutte, H. D., Jr.; Hannon, K. S.; Turner, R. T. (1991):
Androgen treatment prevents loss of cancellous bone in the orchidectomized rat.
J Bone Miner Res. 6(4), 325-30.

Walter, I.; Helmreich, M.; Handler, J.; Aurich, C. (2003):
Mineralised deposits in the uterine glands of mares with chronic endometrial degeneration.
Vet Rec. 153(23), 708-10.

Wang, C.; Catlin, D. H.; Demers, L. M.; Starcevic, B.; Swerdloff, R. S. (2004):
Measurement of total serum testosterone in adult men: comparison of current laboratory methods versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
J Clin Endocrinol Metab. 89(2), 534-43.

Wei, L. L.; Leach, M. W.; Miner, R. S.; Demers, L. M. (1993):
Evidence for progesterone receptors in human osteoblast-like cells.

Biochem Biophys Res Commun. 195(2), 525-32.

Weinbaum, S.; Cowin, S. C.; Zeng, Y. (1994):

A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses.

J Biomech. 27(3), 339-60.

Weinbaum, S.; Guo, P.; You, L. (2001):

A new view of mechanotransduction and strain amplification in cells with microvilli and cell processes.

Biorheology. 38(2-3), 119-42.

Weinbrenner, T.; Zittermann, A.; Gouni-Berthold, I.; Stehle, P.; Berthold, H. K. (2003):

Body mass index and disease duration are predictors of disturbed bone turnover in anorexia nervosa. A case-control study.

Eur J Clin Nutr. 57(10), 1262-7.

Weinstein, R. S.; Jia, D.; Powers, C. C.; Stewart, S. A.; Jilka, R. L.; Parfitt, A. M.; Manolagas, S. C. (2004):

The skeletal effects of glucocorticoid excess override those of orchidectomy in mice.

Endocrinology. 145(4), 1980-7.

Weise, M.; De-Levi, S.; Barnes, K. M.; Gafni, R. I.; Abad, V.; Baron, J. (2001):

Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion.

Proc Natl Acad Sci U S A. 98(12), 6871-6.

Weisrock, K. U.; Winkelsett, S.; Martin-Rosset, W.; Forssmann, W. G.; Parvizi, N.; Coenen, M.; Vervuert, I. (2011):

Long-term effects of intermittent equine parathyroid hormone fragment (ePTH-1-37) administration on bone metabolism in healthy horses.

Vet J. 190(2), e130-4.

Weitzmann, M. N.; Pacifici, R. (2007):

T cells: unexpected players in the bone loss induced by estrogen deficiency and in basal bone homeostasis.

Ann N Y Acad Sci. 1116, 360-75.

Wetterwald, A.; Hoffstetter, W.; Cecchini, M. G.; Lanske, B.; Wagner, C.; Fleisch, H.; Atkinson, M. (1996):

Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes.

Bone. 18(2), 125-32.

Wilsher, S.; Allen, W. R.; Wood, J. L. (2006):

Factors associated with failure of thoroughbred horses to train and race.

Equine Vet J. 38(2), 113-8.

Windahl, S. H.; Hollberg, K.; Vidal, O.; Gustafsson, J. A.; Ohlsson, C.; Andersson, G. (2001):

Female estrogen receptor beta^{-/-} mice are partially protected against age-related trabecular bone loss.

J Bone Miner Res. 16(8), 1388-98.

Wink, C. S.; Felts, W. J. (1980):

Effects of castration on the bone structure of male rats: a model of osteoporosis.

Calcif Tissue Int. 32(1), 77-82.

Woitge, H. W.; Scheidt-Nave, C.; Kissling, C.; Leidig-Bruckner, G.; Meyer, K.; Grauer, A.; Scharla, S. H.; Ziegler, R.; Seibel, M. J. (1998):

Seasonal variation of biochemical indexes of bone turnover: results of a population-based study.

J Clin Endocrinol Metab. 83(1), 68-75.

Yallampalli, C.; Osuamkpe, C.; Nagamani, M. (1993):

Influence of the anti-androgen hydroxyflutamide on in vitro development of mouse embryos.

J Reprod Fertil. 99(2), 467-70.

Yasuda, H.; Shima, N.; Nakagawa, N.; Mochizuki, S. I.; Yano, K.; Fujise, N.; Sato, Y.; Goto, M.; Yamaguchi, K.; Kuriyama, M.; Kanno, T.; Murakami, A.; Tsuda, E.; Morinaga, T.; Higashio, K. (1998):

Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro.

Endocrinology. 139(3), 1329-37.

Zachmann, M. (1992):

Interrelations between growth hormone and sex hormones: physiology and therapeutic consequences.

Horm Res. 38 Suppl 1, 1-8.

9 Anhang

Tabelle 20: Referenzwerte für Pferde (Kraft und Dürr 2005)

Parameter	von	bis	Einheit
Fibrinogen	0	400	mg/dl
gamma-Glutamyl-Transferase	11	44	U/l
Creatinin	71	159	µmol/l
Leukozyten	5	10	10 ⁹ /l
Erythrozyten	6,8	12,9	10 ¹² /l

Tabelle 21: Laborwerte der Probanden aus Feld A zum Zeitpunkt T_{4D}

Probanden-nummer	Geburts-datum	Fibrinogen in mg/dl	gamma-GT in U/l	Creatinin in µmol/l	Leukozyten *10 ⁹ /l	Erythrozyten *10 ¹² /l
12	05.2006	187,00	12,70	116,00	6,58	8,30
18	05.2006	308,00	18,8	99,00	7,68	8,86
23	04.2006	235,00	10,20	111,0	8,78	9,06
24	04.2006	264,00	12,20	101,00	6,37	9,00
26	04.2006	288,00	8,80	103,00	8,60	10,32
27	06.2006	288,00	16,80	115,00	8,54	10,79
29	05.2006	264,00	10,70	101,00	6,60	11,01
30	03.2006	235,00	15,30	100,00	9,98	9,24
31	05.2006	218,00	62,30	100,00	7,80	9,38

Referenzwerte siehe Tabelle 20. Abweichungen von den Referenzwerten sind fett gedruckt.

Tabelle 22: Laborwerte der Probanden aus Feld B zum Zeitpunkt T_{4D}

Probanden-nummer	Geburts-datum	gamma-GT in U/l	Creatinin in µmol/l	Leukozyten *10 ⁹ /l	Erythrozyten *10 ¹² /l
32	02.2005	62,30	100,00	7,80	9,38
33	01.2005	164,70	93,00	6,10	7,96
34	04.2005	229,00	100,00	4,50	8,89
35	05.2005	133,30	99,00	7,20	8,05
36	03.2005	102,40	78,00	7,00	9,18
37	03.2005	116,60	91,00	7,50	11,14
38	06.2005	118,00	91,00	6,20	8,83
39	02.2005	124,40	93,00	6,90	8,65
40	03.2005	49,30	75,00	6,60	7,74

Referenzwerte siehe Tabelle 20. Abweichungen von den Referenzwerten sind fett gedruckt.

Tabelle 23: Laborwerte der Probanden aus Feld C zum Zeitpunkt T_{4D}

Probanden-nummer	Geburts-datum	Fibrinogen in mg/dl	gamma-GT in U/l	Creatinin in µmol/l	Leukozyten *10 ⁹ /l	Erythrozyten *10 ¹² /l
13	05.2006	302,00	11,10	112,00	5,93	8,51
14	02.2006	218,00	7,50	93,00	9,77	9,96
15	03.2006	244,00	45,20	118,00	6,61	8,69
16	04.2006	176,00	11,50	121,00	5,81	7,48
17	05.2006	218,00	14,50	126,00	5,42	8,46
19	04.2006	226,00	8,20	113,00	8,03	8,04
20	03.2006	211,00	12,10	113,00	9,11	8,94
21	03.2006	235,00	13,60	89,00	7,11	8,32
22	02.2006	211,00	9,60	108,00	6,19	8,74
25	03.2006	318,00	13,20	95,00	8,87	10,11
28	05.2006	198,00	17,90	103,00	9,38	8,94

Referenzwerte siehe Tabelle 20. Abweichungen von den Referenzwerten sind fett gedruckt.

Tabelle 24: Laborwerte der Probanden aus Feld D zum Zeitpunkt T_{-4D}

Probanden- nummer	Geburts- datum	Fibrinogen in mg/dl	gamma- GT in U/l	Creatinin in µmol/l	Leukozyten *10 ⁹ /l	Erythrozyten *10 ¹² /l
1	05.1993	176,00	9,90	117,00	5,70	7,90
2	03.1989	253,00	16,90	116,00	6,15	7,28
3	01.2002	302,00	14,40	140,00	5,57	7,28
4	05.1999	167,00	10,60	99,00	3,12	8,77
5	06.1992	176,00	15,90	115,00	3,99	7,26
6	04.1993	198,00	24,30	119,00	5,14	7,17
8	02.2000	167,00	7,90	132,00	4,29	7,20
9	04.2000	211,00	10,00	119,00	7,25	8,57
10	03.2001	187,00	16,00	111,00	5,45	6,77
11	02.1994	152,00	14,30	101,00	4,66	7,64

Referenzwerte siehe Tabelle 20. Abweichungen von den Referenzwerten sind fett gedruckt.

Tabelle 25: Werte aller untersuchten und errechneten Parameter aller Probanden zu den jeweiligen Zeitpunkten

Die Werte sind auf zwei Nachkommastellen gerundet, grau-kursiv gedruckten Werte gelten für nach T_{0D} kastrierte Hengste in Feld C, X steht für: Pferd stand nicht zur Verfügung/ zu geringes Probenvolumen.

Probanden- nummer	Zeitpunkt	BALP in U/l	OC in ng/ ml	CTX-I in pg/ml	E ₂ in pg/ml	T in ng/ml	Quotient aus OC/CTX-I*1000
1	-4D	X	18,60	125,10	X	X	148,68
1	0D	X	X	X	X	X	X
1	+4W	X	10,70	89,07	X	X	120,13
1	+8W	X	9,00	X	X	X	X
1	+12W	X	X	X	X	X	X
1	+16W	X	X	X	X	X	X
1	+20W	X	X	X	X	X	X
1	+36W	X	X	X	X	X	X
2	-4D	12,71	7,30	39,95	X	X	182,73
2	0D	30,45	5,70	X	X	X	X
2	+4W	X	X	X	X	X	X
2	+8W	X	X	X	X	X	X
2	+12W	X	X	X	X	X	X
2	+16W	X	X	X	X	X	X
2	+20W	X	X	X	X	X	X
2	+36W	X	X	X	X	X	X
3	-4D	18,69	30,80	91,29	X	X	337,39
3	0D	21,02	24,00	73,55	X	X	326,31
3	+4W	15,65	29,00	85,27	X	X	340,10
3	+8W	15,80	20,50	134,50	X	X	152,42
3	+12W	18,54	32,90	251,20	X	X	130,97
3	+16W	15,99	27,80	214,40	X	X	129,66
3	+20W	18,65	30,20	214,00	X	X	141,12
3	+36W	16,73	35,60	113,00	X	X	315,04
4	-4D	16,38	9,70	28,35	X	X	342,15
4	0D	16,41	3,40	73,93	X	X	45,99
4	+4W	16,16	2,90	57,96	X	X	50,03
4	+8W	14,99	5,10	29,00	X	X	175,86
4	+12W	14,92	7,10	98,62	X	X	71,99
4	+16W	18,43	7,40	78,88	X	X	93,81
4	+20W	19,03	10,10	78,26	X	X	129,06

Probanden- nummer	Zeitpunkt	BALP in U/l	OC in ng/ ml	CTX-I in pg/ml	E ₂ in pg/ml	T in ng/ml	Quotient aus OC/CTX-I*1000
4	+36W	22,44	10,70	63,17	X	X	169,38
5	-4D	X	6,80	76,52	X	X	88,87
5	0D	X	9,90	33,25	X	X	297,74
5	+4W	X	X	X	X	X	X
5	+8W	X	X	X	X	X	X
5	+12W	X	X	X	X	X	X
5	+16W	X	X	X	X	X	X
5	+20W	X	X	X	X	X	X
5	+36W	X	X	X	X	X	X
6	-4D	17,56	6,20	27,82	X	X	222,86
6	0D	16,43	4,90	17,71	X	X	276,68
6	+4W	17,23	5,60	81,56	X	X	68,66
6	+8W	16,63	3,90	72,64	X	X	53,69
6	+12W	17,43	4,50	89,43	X	X	50,32
6	+16W	X	X	X	X	X	X
6	+20W	X	X	X	X	X	X
6	+36W	X	X	X	X	X	X
8	-4D	15,20	20,00	86,35	X	X	231,62
8	0D	18,08	15,80	12,05	X	X	1311,20
8	+4W	14,74	8,30	58,13	X	X	142,78
8	+8W	16,06	7,50	28,99	X	X	258,71
8	+12W	19,92	17,20	176,20	X	X	97,62
8	+16W	20,63	12,30	162,90	X	X	75,51
8	+20W	32,28	20,30	59,50	X	X	341,18
8	+36W	20,31	39,70	148,50	X	X	267,34
9	-4D	16,68	16,10	105,00	X	X	153,33
9	0D	18,32	10,10	76,09	X	X	132,74
9	+4W	33,39	7,00	82,46	X	X	84,89
9	+8W	18,32	12,60	103,00	X	X	122,33
9	+12W	X	X	X	X	X	X
9	+16W	X	8,20	81,12	X	X	101,08
9	+20W	X	11,30	129,60	X	X	87,19
9	+36W	X	21,60	65,50	X	X	329,77
10	-4D	42,63	28,00	47,05	X	X	595,11
10	0D	40,16	37,60	26,78	X	X	1404,03
10	+4W	25,31	8,60	83,59	X	X	102,88
10	+8W	38,41	12,00	98,63	X	X	121,67
10	+12W	X	X	X	X	X	X
10	+16W	X	X	X	X	X	X
10	+20W	26,62	X	X	X	X	X
10	+36W	X	22,90	78,95	X	X	290,06
11	-4D	25,09	15,60	60,82	X	X	256,49
11	0D	25,87	13,40	80,34	X	X	166,79
11	+4W	22,74	10,30	122,10	X	X	84,36
11	+8W	X	X	X	X	X	X
11	+12W	X	14,30	106,80	X	X	133,90
11	+16W	X	X	X	X	X	X
11	+20W	X	X	X	X	X	X
11	+36W	30,32	33,10	56,85	X	X	582,23
12	-4D	50,54	40,50	259,10	X	X	156,31
12	0D	51,42	58,10	146,40	X	X	396,86

Probanden- nummer	Zeitpunkt	BALP in U/l	OC in ng/ml	CTX-I in pg/ml	E ₂ in pg/ml	T in ng/ml	Quotient aus OC/CTX-I*1000
12	+4W	42,99	47,20	282,30	X	X	167,20
12	+8W	44,22	50,50	274,10	X	X	184,24
12	+12W	51,21	72,00	315,80	X	X	227,99
12	+16W	42,67	54,00	448,80	X	X	120,32
12	+20W	X	X	X	X	X	X
12	+36W	X	X	X	X	X	X
13	-4D	43,77	41,00	356,20	X	X	115,10
13	0D	46,28	51,70	172,30	X	X	300,06
13	+4W	X	52,30	299,90	X	X	174,39
13	+8W	40,07	34,30	218,80	X	X	156,76
13	+12W	45,09	9,10	127,30	X	X	71,48
13	+16W	X	X	X	X	X	X
13	+20W	X	X	X	X	X	X
13	+36W	X	X	X	X	X	X
14	-4D	21,94	32,00	257,50	22,90	0,06	124,27
14	0D	25,87	55,30	80,60	21,70	0,61	686,10
14	+4W	28,46	57,30	288,40	26,00	0,08	198,68
14	+8W	26,79	68,30	281,80	29,10	0,16	242,37
14	+12W	30,97	61,00	246,40	46,60	0,13	247,56
14	+16W	35,11	42,40	218,20	43,50	0,72	194,32
14	+20W	28,10	93,90	361,90	59,40	1,10	259,46
14	+36W	26,72	54,60	222,70	77,50	0,43	245,17
15	-4D	30,10	23,00	230,90	20,90	0,16	99,61
15	0D	35,11	32,90	127,30	27,50	0,08	258,44
15	+4W	33,88	29,40	230,70	57,10	0,41	127,44
15	+8W	30,20	34,60	206,50	47,50	0,66	167,55
15	+12W	32,39	38,40	201,40	35,10	1,48	190,67
15	+16W	34,75	36,40	292,20	68,10	0,18	124,57
15	+20W	40,90	66,20	197,80	60,50	0,77	334,68
15	+36W	46,52	41,23	278,20	2,50	0,03	148,20
16	-4D	36,67	25,20	224,90	55,80	0,11	112,05
16	0D	41,93	38,20	64,06	45,60	1,04	596,32
16	+4W	49,68	37,70	203,60	74,30	0,18	185,17
16	+8W	45,46	35,80	190,30	102,00	0,79	188,12
16	+12W	51,36	38,90	196,30	181,00	1,02	198,17
16	+16W	26,28	18,50	164,70	112,00	0,80	112,33
16	+20W	42,26	69,20	89,44	9,00	0,03	773,70
16	+36W	20,00	74,52	131,50	6,70	0,03	566,69
17	-4D	46,16	49,50	120,10	22,50	0,06	412,16
17	0D	44,27	54,80	38,34	27,80	0,11	1429,32
17	+4W	54,03	63,10	218,10	22,20	0,40	289,32
17	+8W	42,52	74,10	247,80	49,10	0,39	299,03
17	+12W	52,72	51,60	244,20	47,20	0,39	211,30
17	+16W	45,83	56,70	237,80	47,90	0,83	238,44
17	+20W	44,27	80,00	273,10	70,60	0,70	292,93
17	+36W	35,18	55,20	190,60	119,00	0,95	289,61
18	-4D	43,46	31,40	267,90	39,20	0,42	117,21
18	0D	43,35	54,10	112,00	30,80	X	483,04
18	+4W	49,55	42,90	339,60	8,10	0,03	126,33
18	+8W	43,58	44,90	278,70	6,50	0,04	161,11
18	+12W	46,05	54,20	373,70	8,10	0,03	145,04

Probanden- nummer	Zeitpunkt	BALP in U/l	OC in ng/ml	CTX-I in pg/ml	E ₂ in pg/ml	T in ng/ml	Quotient aus OC/CTX-I*1000
18	+16W	45,21	66,50	345,20	9,10	0,03	192,64
18	+20W	48,94	126,00	277,10	5,60	0,03	454,71
18	+36W	59,47	115,60	119,80	4,60	0,03	964,94
19	-4D	25,92	27,70	250,10	38,30	0,06	110,76
19	0D	29,34	51,00	136,70	28,80	0,62	373,08
19	+4W	31,68	47,60	377,20	57,60	0,14	126,19
19	+8W	32,61	24,60	225,30	97,70	0,65	109,19
19	+12W	32,28	41,30	262,00	227,00	0,27	157,63
19	+16W	35,01	29,50	313,60	75,60	0,61	94,07
19	+20W	29,77	73,00	477,40	113,00	1,20	152,91
19	+36W	38,10	161,42	553,40	4,90	0,03	291,69
20	-4D	30,83	17,70	166,70	37,00	0,12	106,18
20	0D	29,95	28,50	98,12	32,00	0,29	290,46
20	+4W	33,58	24,40	287,30	42,40	0,69	84,93
20	+8W	32,74	38,90	207,90	106,00	0,17	187,11
20	+12W	41,11	29,30	193,00	65,00	3,40	151,81
20	+16W	33,55	22,60	330,50	45,70	0,25	68,38
20	+20W	30,15	32,40	267,10	103,00	0,42	121,30
20	+36W	27,97	22,60	160,10	72,30	0,36	141,16
21	-4D	37,99	34,00	212,00	X	X	160,38
21	0D	X	X	X	X	X	X
21	+4W	30,99	41,80	202,40	X	X	206,52
21	+8W	36,96	25,90	226,50	X	X	114,35
21	+12W	41,91	30,50	170,10	X	X	179,31
21	+16W	X	X	X	X	X	X
21	+20W	X	X	X	X	X	X
21	+36W	30,77	28,50	144,60	X	X	197,10
22	-4D	X	X	X	X	X	X
22	0D	30,64	37,50	138,90	X	X	269,98
22	+4W	21,96	28,40	193,10	X	X	147,07
22	+8W	21,76	31,30	178,80	X	X	175,06
22	+12W	25,15	28,70	248,00	X	X	115,73
22	+16W	23,17	25,30	274,90	X	X	92,03
22	+20W	X	X	X	X	X	X
22	+36W	21,69	41,40	184,10	X	X	224,88
23	-4D	37,23	15,80	240,00	X	0,03	65,83
23	0D	39,70	14,80	21,66	15,80	0,28	683,29
23	+4W	40,16	17,80	317,80	7,20	0,03	56,01
23	+8W	40,06	17,50	399,60	8,80	0,03	43,79
23	+12W	45,50	26,00	393,00	7,00	0,03	66,16
23	+16W	37,83	24,90	284,30	6,00	0,03	87,58
23	+20W	39,95	49,10	248,70	7,00	0,03	197,43
23	+36W	53,36	47,00	197,30	6,10	0,03	238,22
24	-4D	47,53	39,10	159,20	21,90	0,23	245,60
24	0D	43,20	31,60	66,80	21,00	0,20	473,05
24	+4W	46,47	30,30	156,00	5,80	0,03	194,23
24	+8W	48,06	29,40	313,50	7,50	0,03	93,78
24	+12W	47,80	44,30	280,90	8,30	0,03	157,71
24	+16W	49,63	55,10	219,20	11,10	0,03	251,37
24	+20W	65,32	84,20	178,20	4,90	0,03	472,50
24	+36W	62,10	88,20	128,10	8,00	0,03	688,52

Probanden- nummer	Zeitpunkt	BALP in U/l	OC in ng/ ml	CTX-I in pg/ml	E ₂ in pg/ml	T in ng/ml	Quotient aus OC/CTX-I*1000
25	-4D	42,52	X	113,70	X	X	X
25	0D	57,18	44,40	142,90	X	X	310,71
25	+4W	38,75	28,10	109,00	X	X	257,80
25	+8W	44,06	36,30	133,30	X	X	272,32
25	+12W	55,11	32,40	96,15	X	X	336,97
25	+16W	46,05	38,90	117,00	X	X	332,48
25	+20W	47,25	51,80	72,21	X	X	717,35
25	+36W	X	X	X	X	X	X
26	-4D	29,92	21,80	149,20	26,50	0,04	146,11
26	0D	8,87	5,10	144,60	19,40	0,77	35,27
26	+4W	34,24	29,30	239,70	13,70	0,03	122,24
26	+8W	30,56	33,30	287,20	9,50	0,03	115,95
26	+12W	28,86	44,90	290,60	9,70	0,03	154,51
26	+16W	31,89	38,40	264,70	5,90	0,03	145,07
26	+20W	34,85	65,80	192,80	7,80	0,03	341,29
26	+36W	32,84	76,40	311,50	4,30	0,03	245,26
27	-4D	51,39	53,30	181,80	X	X	293,18
27	0D	55,76	6,00	59,81	X	X	100,32
27	+4W	46,48	48,20	299,70	X	X	160,83
27	+8W	49,06	42,70	342,70	X	X	124,60
27	+12W	54,42	61,00	323,40	X	X	188,62
27	+16W	X	X	231,90	X	X	X
27	+20W	X	X	X	X	X	X
27	+36W	53,15	75,70	301,60	X	X	250,99
28	-4D	54,77	50,40	177,50	X	X	283,94
28	0D	54,67	19,20	96,12	X	X	199,75
28	+4W	56,47	24,80	255,90	X	X	96,91
28	+8W	49,07	27,20	300,40	X	X	90,55
28	+12W	45,71	38,50	287,10	X	X	134,10
28	+16W	30,18	47,50	231,90	X	X	204,83
28	+20W	46,02	80,50	108,90	X	X	739,21
28	+36W	X	X	X	X	X	X
29	-4D	35,73	39,30	251,10	27,60	0,14	156,51
29	0D	37,33	29,20	226,00	22,70	0,06	129,20
29	+4W	31,92	39,80	303,10	6,20	0,03	131,31
29	+8W	40,44	30,90	387,30	12,50	0,03	79,78
29	+12W	36,40	53,80	321,00	9,60	0,03	167,60
29	+16W	33,11	45,30	280,00	11,40	0,03	161,79
29	+20W	27,64	192,30	221,50	4,40	0,03	868,17
29	+36W	34,23	60,20	313,00	4,60	0,03	192,33
30	-4D	33,17	28,10	192,70	X	X	145,82
30	0D	53,22	18,00	292,80	X	X	61,48
30	+4W	43,84	35,00	251,70	X	X	139,05
30	+8W	55,53	28,90	223,50	X	X	129,31
30	+12W	X	X	X	X	X	X
30	+16W	X	30,00	X	X	X	X
30	+20W	X	X	X	X	X	X
30	+36W	X	X	X	X	X	X
31	-4D	43,38	21,30	270,50	X	X	78,74
31	0D	45,13	33,60	147,60	X	X	227,64
31	+4W	X	31,00	X	X	X	X

Probanden- nummer	Zeitpunkt	BALP in U/l	OC in ng/ ml	CTX-I in pg/ml	E ₂ in pg/ml	T in ng/ml	Quotient aus OC/CTX-I*1000
31	+8W	37,49	32,40	321,20	X	X	100,87
31	+12W	X	X	X	X	X	X
31	+16W	X	X	X	X	X	X
31	+20W	X	X	X	X	X	X
31	+36W	X	X	X	X	X	X
32	-4D	48,48	52,20	X	X	0,35	X
32	0D	42,61	38,60	107,60	X	X	358,74
32	+4W	41,61	33,60	156,80	X	X	214,29
32	+8W	44,37	34,60	175,40	X	X	197,26
32	+12W	30,80	38,70	173,90	X	X	222,54
32	+16W	34,74	44,90	131,70	X	X	340,93
32	+20W	X	61,56	X	X	X	X
32	+36W	X	X	X	X	X	X
33	-4D	42,91	44,20	X	X	0,45	X
33	0D	37,72	39,30	151,80	109,00	0,32	258,89
33	+4W	36,94	37,10	307,00	8,40	0,03	120,85
33	+8W	32,68	30,40	268,00	9,20	0,03	113,43
33	+12W	20,99	34,00	272,20	7,20	0,03	124,91
33	+16W	25,17	47,00	202,10	6,30	0,03	232,56
33	+20W	25,29	58,20	204,60	5,20	0,03	284,46
33	+36W	23,88	48,30	214,00	3,00	0,03	225,70
34	-4D	40,05	45,50	X	X	1,03	X
34	0D	37,91	27,80	199,70	93,40	0,34	139,21
34	+4W	36,39	28,00	328,90	12,60	0,03	85,13
34	+8W	38,82	24,60	299,30	6,90	0,03	82,19
34	+12W	33,19	46,50	172,20	5,60	0,03	270,03
34	+16W	36,72	47,30	253,00	7,60	0,03	186,96
34	+20W	37,75	84,30	288,80	7,40	0,03	291,90
34	+36W	38,04	29,20	143,50	5,60	0,03	203,48
35	-4D	32,42	47,90	X	X	0,20	X
35	0D	31,93	28,90	70,30	77,20	0,41	411,10
35	+4W	45,54	45,30	239,30	11,30	0,03	189,30
35	+8W	44,82	48,10	189,70	4,90	0,03	253,56
35	+12W	35,42	71,60	214,50	7,50	0,03	333,80
35	+16W	39,92	72,80	267,60	7,60	0,03	272,05
35	+20W	44,98	52,00	269,40	X	0,03	193,02
35	+36W	37,17	56,10	241,40	6,40	0,03	232,39
36	-4D	35,39	44,90	X	X	0,77	X
36	0D	33,19	43,20	208,60	40,10	0,23	207,09
36	+4W	43,91	40,50	310,20	6,60	0,03	130,56
36	+8W	36,56	37,50	361,00	7,20	0,03	103,88
36	+12W	28,48	56,30	347,70	7,50	0,03	161,92
36	+16W	29,45	59,80	327,80	6,90	0,03	182,43
36	+20W	28,10	54,20	326,80	9,50	0,03	165,85
36	+36W	27,84	37,70	221,20	7,40	0,03	170,43
37	-4D	42,52	45,00	X	X	0,78	X
37	0D	35,29	29,60	143,80	X	X	205,84
37	+4W	34,18	36,90	X	X	X	X
37	+8W	56,81	39,50	262,20	X	X	150,65
37	+12W	50,90	38,20	291,30	X	X	131,14
37	+16W	39,56	47,50	335,80	X	X	141,45

Probanden- nummer	Zeitpunkt	BALP in U/l	OC in ng/ ml	CTX-I in pg/ml	E ₂ in pg/ml	T in ng/ml	Quotient aus OC/CTX-I*1000
37	+20W	98,16	58,10	272,40	X	X	213,29
37	+36W	X	X	X	X	X	X
38	-4D	28,93	36,20	X	X	0,59	X
38	0D	28,32	29,60	139,70	113,00	1,48	211,88
38	+4W	30,71	42,90	295,00	9,40	0,03	145,42
38	+8W	35,39	42,70	209,70	6,30	0,03	203,62
38	+12W	25,94	48,10	216,30	7,90	0,03	222,38
38	+16W	40,22	49,40	285,60	7,50	0,03	172,97
38	+20W	0,12	23,30	316,80	6,70	0,03	73,55
38	+36W	32,52	50,80	226,50	5,90	0,03	224,28
39	-4D	39,18	17,30	X	X	0,40	X
39	0D	36,97	13,60	241,10	67,60	0,23	56,41
39	+4W	44,69	23,50	X	8,00	0,03	X
39	+8W	54,32	31,60	388,20	5,40	0,03	81,40
39	+12W	37,19	24,90	178,00	9,40	0,03	139,89
39	+16W	44,87	28,70	233,50	7,40	0,03	122,91
39	+20W	83,55	38,40	245,00	8,80	0,03	156,73
39	+36W	76,83	23,70	220,90	5,50	0,03	107,29
40	-4D	43,23	36,30	X	X	0,71	X
40	0D	47,17	33,70	152,10	X	X	221,56
40	+4W	61,69	35,70	308,80	X	X	115,61
40	+8W	48,37	37,20	216,90	X	X	171,51
40	+12W	33,80	33,20	198,50	X	X	167,25
40	+16W	52,19	39,50	187,90	X	X	210,22
40	+20W	73,39	18,60	125,10	X	X	148,68
40	+36W	X	X	X	X	X	X

10 Danksagung

Bedanken möchte ich mich zuerst bei den Helfern und Unterstützern der Analytik und der Probenentnahme: Dr. Benoit Remy analysierte die Proben auf ihren OC-Gehalt. Dr. Etienne Cavalier bestimmte den T- und CTX-I-Gehalt der Proben, deren Logistik aus Liege Frau Prof. A. Gabriel übernommen hatte. Ein Dank geht auch an die Firma Biocontrol unter Leitung Herrn Dr. Leidingers, der die Proben auf ihren E₂-Gehalt untersuchte. Auch möchte ich mich bei dem Labor der Klinik für Klauentiere der FU Berlin bedanken, die einen Teil der Proben auf ihren Gehalt an Crea und γ -GT untersuchten. Die Hämatologie-Untersuchungen und Fibrinogenanalyse führten dankenswerter Weise die Tierärztin Dr. Katrin Haberkamp und Dr. Susanne Schönert durch. Katrin Haberkamp war auch mit Frau Prof. Dr. Carstanjen bei der ersten Blutentnahme in Schwaiganger zugegen, um die Blutentnahme zu realisieren. Für den Transport und die Lagerung eines Teils der Proben möchte ich ihr ebenfalls danken.

Besonders möchte ich mich auch für die hervorragende Zusammenarbeit mit dem Landgestüt Sachsen-Anhalt und dem Landgestüt Bayern bedanken: Hier waren mir Herr Enrico Kurze des Landgestüts Sachsen-Anhalt und Ivonne Schmidt aus der Tierarztpraxis Fischer stets durch ihre unkomplizierte und unterstützende Arbeit eine große Hilfe. Ohne ihr Mitwirken wären die Probennahmen und deren Aufbreitung vor Ort nicht möglich gewesen. Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Hintzsche, dem Gestütsleiter in Sachsen-Anhalt für die Erlaubnis zur Beprobung der Pferde. Herrn Dr. Remler und Herrn Dr. Senckenberg des Landgestüts Bayerns danke ich ebenfalls für die schnelle und oft spontane Hilfestellung und Bereitstellung von Hilfspersonen zum Fangen der Probanden aus den Gruppen.

Für die Betreuung der Laborarbeit möchte ich mich besonders bei Frau Dr. Bondzio, bei Frau Scholz und Frau Schulze bedanken. Ohne ihre Hilfestellung wären die Messungen nicht so schnell durchzuführen gewesen.

Dem Fachbereich der Veterinärbiometrie der FU Berlin, insbesondere Herrn Lotz, und Herrn Prof. Dr. Wottawa (RU Bochum) möchte ich für die kompetente und unkomplizierte Hilfe bei der statistischen Auswertung der Messergebnisse danken.

Für ein Auto sorgte insbesondere Marianne Reen, die auch in zahlreichen Korrekturstunden ihre Freizeit opferte. Auch hier zeigten sich Kathy Pfeiffer und Bärbel Pienitz in der Fehlersuche unermüdlich.

Für die Betreuung des Dissertationsvorhabens möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Bianca Carstanjen bedanken. Neben dem Promotionsbüro mit Frau Gaede gilt auch ein besonderer Dank meiner Familie, die stets hinter mir gestanden hat und somit maßgeblich zur Vollendung dieser Dissertation beigetragen hat.

11 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 25.05.2020

Martin Thunig