

Aus dem Julius Wolff Institut für Biomechanik und
Muskuloskeletale Regeneration
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss von Homocystein auf die Knochenstruktur

Eine histomorphologische Untersuchung

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stefan Klohs

aus Wriezen

Datum der Promotion: 12.09.2014

für

Elena „Mathilda“ Wolny

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abstrakt	6
Abstract	8
1. Einleitung	10
1.1 Überblick	10
1.2 Homocystein und Homocysteinmetabolismus	10
1.3 Hyperhomocysteinämie	12
1.4 Knochenaufbau	15
1.5 Osteopenie/ Osteoporose	16
1.6 Ziel der vorliegenden Arbeit	17
1.7 Arbeitshypothese	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Studiendesign	18
2.2 Versuchstiere	19
2.3 Knochenpräparate	20
2.4 Herstellung histologischer Schnitte	24
2.5 Färbung histologischer Schnitte	27
2.6 Auswertung mittels Bildanalyse	28
2.7 Statistik	35
3. Ergebnisse	36
3.1 Distaler Femur	37
3.2 Collum femoris	42
3.3 Wirbelkörper	46

4. Diskussion	49
5. Zusammenfassung	57
6. Abbildungsverzeichnis	59
7. Tabellenverzeichnis	63
8. Abkürzungsverzeichnis	64
9. Literaturverzeichnis	66
10. Eidesstattliche Versicherung	81
11. Lebenslauf	82
12. Publikationsverzeichnis	83
13. Danksagung	84

Abstrakt

Homocystein wird als Endprodukt des Methioninstoffwechsels gebildet. Dabei kann es durch genetische Faktoren, Vitaminmangel, Medikamenteneinnahmen, den Konsum von Alkohol, Kaffee oder Zigaretten zu einer Erhöhung des Homocysteinspiegels kommen. In der Folge einer Hyperhomocysteinämie (HHCY) können Thrombosen und Embolien auftreten, es besteht ein erhöhtes Myokardinfarkt- und Schlaganfallrisiko, sowie eine Begünstigung von dementiellen Erkrankungen. In weiteren Studien wurde zudem ein Zusammenhang zwischen einer HHCY und einem erhöhten Risiko für Knochenfrakturen gezeigt. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind dabei weitestgehend unbekannt.

Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit war es, zu untersuchen ob ein durch die Nahrung erhöhter Homocysteinspiegel zu Veränderungen der Knochenstruktur führt. Dabei wurde versucht in einem Rattenmodell über 12 Wochen durch die alimentäre Zufuhr von Homocystein (1 bzw. 2 %), Methionin oder den Entzug der Vitamine Pyridoxin und Cobalamin eine HHCY herbeizuführen und mittels histomorphometrischer Ausmessung der Femura und der ersten Lumbalwirbelkörper mögliche Veränderungen im Knochen nachzuweisen.

In der Methionin-Gruppe wurde eine moderate HHCY, in den beiden Homocystein-Gruppen eine intermediäre HHCY gefunden. In der Vitaminmangelgruppe lagen die Homocysteinwerte im Normalbereich. Im distalen Femur kam es zu einer signifikanten Abnahme der Knochendichte in der Methionin-Gruppe auf $14,85\% \pm 5,7$ (Kontrollgruppe: $26,9\% \pm 1,6$) und in der Homocystein 2%-Gruppe auf $2,48\% \pm 0,7$. Auch der Umfang und die Anzahl der Knochen trabekel waren in den beiden Gruppen signifikant reduziert und die Abstände zwischen den Knochen trabekeln signifikant erhöht. Eine signifikante Reduktion der Dicke von Knochen trabekeln und Wachstumsfugen fand sich nur in der Homocystein 2%-Gruppe.

Im Collum femoris war die Knochendichte in der Methionin-Gruppe auf $44,9\% \pm 6,2$ (Kontrollgruppe $55,4\% \pm 6,53$) und in der Homocystein 2%-Gruppe auf $26,6\% \pm 10,55$ reduziert. Bei den Parametern Umfang der Knochen trabekel, Anzahl der Knochen trabekel und Abstände zwischen den Knochen trabekeln kam es nur in der Homocystein 2%-Gruppe zu einer signifikanten Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Ausmessung der Lumbalwirbelkörper zeigte bei der

Knochendichtemessung lediglich in der Homocystein 2%-Gruppe eine signifikante Reduktion auf $14,6\% \pm 5,44$ (Kontrollgruppe: $26,4\% \pm 7,07$). Auch die weiteren Messparameter waren lediglich in der Homocystein 2%-Gruppe signifikant verändert.

Da das Trabekelwerk essentiell für die biomechanische Stabilität des Knochens ist, kann die Abnahme der Knochen trabekel zu einem Anstieg der Knochenfragilität und somit zu einer gestiegenen Fraktur anfälligkeit führen. Die molekularen Mechanismen, welche der HHCY-induzierten Knochendichtereduktion zu Grunde liegen, sollen in weiterführenden Studien untersucht werden.

Abstract

Genetic disorders, vitamin deficiencies, the intake of various pharmacological drugs or an increased consumption of alcohol, coffee or cigarettes, all can lead to higher blood levels of homocysteine. It is known that homocysteine can act atherogenic and thrombogenic and has hence been implicated in cardiovascular diseases such as thrombotic episodes and embolisms, myocardial infarction, apoplexy and dementias. Recently, correlations between moderately elevated homocysteine levels and an increased risk for bone fractures have been reported. Yet, it has not been determined how hyperhomocysteinemia (HHCY) leads to changes in bone structure.

This study investigated whether an alimentary-based HHCY can induce pathological changes in bone structure in rats. To this end, it was tested whether the supply of homocysteine, methionine or the extraction of pyridoxine and cobalamine from food chow can lead to HHCY. Histomorphometric measurements of the femur and the first lumbar vertebrae were used to determine parameters of bone structure integrity.

Twelve-week of feeding led to only moderate HHCY in the methionine group, while the supplement of homocysteine (1 and 2% homocysteine, respectively) resulted in intermediary HHCY. In contrast, the lack of vitamins did not affect homocysteine levels. In animals that have either received methionine (Total Bone Density TBDn $14,85\% \pm 5,7$) or 2% homocysteine (TBDn $2,48\% \pm 0,7$) a significant reduction of bone density, compared to the control group ($26,9\% \pm 1,6$) was observed in the area of the distal femur. Similar changes in both groups were also observed in trabecular number, perimeter and separation. A reduction of trabecular thickness and the thickness of the growth plate were detected only in homocysteine 2%-animals.

Similar reductions in bone density and bone structural changes were observed in the femoral collum (TBDn methionine-group: $44,9\% \pm 6,2$; homocysteine 2%-group: $26,6\% \pm 10,55$; control: $55,4\% \pm 6,53$) and in first lumbar vertebrae (TBDn homocysteine 2%-group $14,6\% \pm 5,44$ versus control $26,4\% \pm 7,07$).

This study has demonstrated that certain diets can result in various degrees of HHCY. Alimentary-induced HHCY can in turn lead to a considerable reduction of bone density

and integrity. Since the trabecula is essential for the biomechanic stability of the bone, the reduction of the bone trabecula might give rise to an increased risk for bone fractures. Further studies will investigate the molecular mechanisms by which HHcy induces pathological changes of the bone structure.

1. Einleitung

1.1 Überblick

Homocystein ist eine nichtproteinogene Aminosäure, die als Zwischenprodukt im Methioninstoffwechsel entsteht. Sie besitzt selbst keine bisher bekannte essentiell wichtige Funktion. Verschiedene Umstände, wie genetische Ursachen, ein Vitaminmangel, diverse Medikamente, eine Niereninsuffizienz, Nikotin-, Alkohol-, oder Kaffeegenuss können zu einer Hyperhomocysteinämie führen. Die Folgen einer Homocysteinerhöhung im Serum sind vielfältig. Zu den bekannten Folgen zählen Gefäßerkrankungen (mit den Folgen der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, Myokardinfarkt und Apoplexie), neurotoxische Wirkungen (mit der Folge kognitiver Störungen oder dementieller Erkrankungen) und prothrombotische Wirkungen (mit der Folge peripherer und zentraler Thrombosen und Embolien). Darüber hinaus wird vermutet, dass eine Hyperhomocysteinämie auch einen direkten Einfluss auf die Knochendichte beziehungsweise auf Knochenstrukturen hat. Mehrere größere klinische Studien zeigten eine direkte Korrelation zwischen Homocysteinwerterhöhungen und erhöhten Frakturraten [1;2]. Ob Homocystein eine direkte Wirkung auf den Knochenaufbau hat oder die Knochenstrukturen verändert, ist bislang unbekannt und soll mit der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

1.2 Homocystein und Homocysteinmetabolismus

Homocystein (1-Amino-3-mercaptoputtersäure) ist eine nichtproteinogene, schwefelhaltige Aminosäure, die erstmals 1932 von Butz und du Vigneaud beschrieben wurde, wobei Homocystein (HCY) das Endprodukt des Methioninstoffwechsels ist. Mit der Nahrung zugeführtes Methionin wird zu S-Adenosylmethionin (SAM) transformiert, dass im weiteren Stoffwechsel als Methylgruppendonor wirksam wird [3]. Durch Demethylierung von SAM entsteht S-Adenosylhomocystein (SAH), aus dem durch hydrolytische Spaltung Adenosin und HCY entstehen.

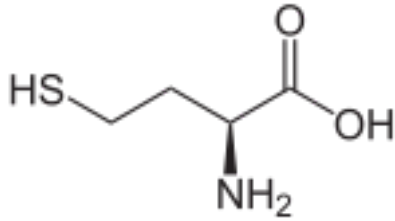


Abb. 1. Strukturformel Homocystein

HCY kann nun zum einen durch die Cobalamin (Vitamin B₁₂)-abhängige Methioninsynthase zu Methionin remethyliert werden, wobei diese Reaktion von der Methioninzufuhr abhängig ist [4;5]. Zum anderen kann HCY durch Transsulfurierung mit Serin durch die Pyridoxin (Vitamin B₆)-abhängige Cystathionin-β-Synthase (CBS) zu Cystathionin (CYS) kondensiert werden. Das ebenfalls pyridoxinabhängige Enzym Cystathionase hydrolysiert CYS zu Cystein und α-Ketobutyrat. Abbildung 2 zeigt den Homocysteinmetabolismus schematisch [6].

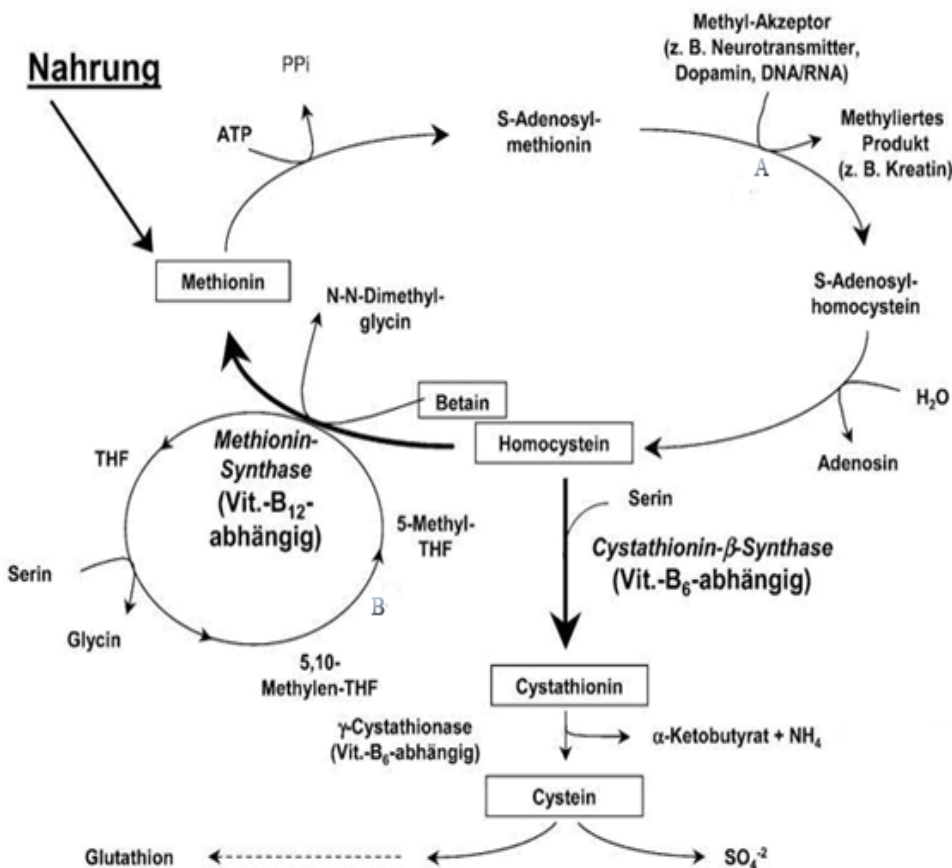


Abb. 2. Homocystein-Stoffwechsel (THF= Tetrahydrofolat, ATP= Adenosintriphosphat, A= Methyltransferase, B= 5,10-Methylen-Tetrahydrofolatreduktase)

1.3 Hyperhomocysteinämie

Definition

Als normwertig werden Serum-Homocystein-Werte zwischen 5-15 $\mu\text{mol/l}$ angesehen [7;8]. Nach den Definitionen der DACH-LIGA-Homocystein gelten Serum-Homocystein-Spiegel unter 10 $\mu\text{mol/l}$ als unbedenklich [9]. Tabelle 1 gibt die Einteilung der verschiedenen Schweregrade der Hyperhomocysteinämien nach Kang et al wieder [10].

Tab.1. Einteilung der Hyperhomocysteinämie [10].

Konzentration HCY im Serum [$\mu\text{mol/l}$]	Einteilung
<30	moderate HHCY
31-100	intermediäre HHCY
> 100	schwere HHCY

Ursachen

Die Ursachen für eine Hyperhomocysteinämie sind vielfältig. Da einige Enzyme des HCY-Stoffwechsels vitaminabhängig sind, können Defizite der Vitamine Cobalamin (Vitamin B₁₂), Pyridoxin (Vitamin B₆) und Folsäure zu einer HHCY führen.

Die Vitaminunterversorgung ist die mit Abstand häufigste Ursache für eine HHCY [9]. Menschen mit einseitigen Ernährungsgewohnheiten, ältere Menschen, Schwangere, Patienten mit Nierenerkrankungen oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder Zöliakie und Tumorpatienten zählen zu den Risikogruppen für Vitamindefizite mit klinischer Relevanz [9]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Folsäure oder die Kombination von Folsäure und Riboflavin, Pyridoxin und Cobalamin zu einer Senkung des HCY-Spiegels bei zuvor normalen [11;12] beziehungsweise erhöhten HCY-Werten führt [13-17].

Genetische Ursachen für eine HHCY betreffen einen Defekt oder Mangel der folgenden Enzyme des HCY-Stoffwechsels: die Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) [18-22], die Cystathionin- β -Synthase (CBS) [23-25], die Methioninsynthase [26] oder die Methionin-Synthase-Reduktase [27]. Die homozygote Form des CBS-Mangels entspricht der Homocystinurie mit ihren typischen klinischen Aspekten [28] und HCY-Werten von bis zu 400 $\mu\text{mol/l}$ Serum [29].

Viele Medikamente beeinflussen über eine direkte oder indirekte Antagonisierung von Kofaktoren und Enzymaktivitäten den Homocysteinstoffwechsel. Zu diesen gehören beispielsweise das Bronchospasmolytikum Theophyllin [30], das Inhalationsanalgetikum Lachgas (N₂O) [31;32], das Zytostatikum Methotrexat [33], das Sulfonamid Sulfasalazin [34], die Lipidsenker Fenofibrat [35], Benzofibrat [36] und Niacin [37], die Anionenaustauschharze Cholestipol [38] und Cholestyramin [39;40], das Antibiotikum Trimethoprim [41], das Antiparkinsonmittel L-DOPA [42;43], die Antiepileptika Phenobarbital, Carbamazepin, Primidon, Valproat und Phenytoin [44;45], der Protonenpumpenhemmer Omeprazol [46] und H₂-Rezeptor-Antagonisten wie Ranitidin [47], das Tuberkulostatikum Isoniazid [48], das Immunsuppressivum Ciclosporin A [49-51] und das Antidiabetikum Metformin [52].

Auch Geschlechtshormone haben einen bedeutsamen Einfluss auf den Homocystein-Stoffwechsel. In der Postmenopause steigt der Homocystein-Spiegel an [53]. Der postmenopausale Hormonersatz mit Östrogen oder die Kombination mit Östrogen und Progesteron führen zu einer deutlichen Senkung des Homocysteinspiegels [54-56]. Dieser Effekt wird auch bei der Therapie des Prostatakarzinoms mit Östrogenen beobachtet [57]. Eine Unterfunktion der Schilddrüse (Hypothyreose) führt zu einer Anhebung des Homocysteinspiegels [58], eine Behandlung mit L-Thyroxin zu einer Senkung in den Normalbereich [59;60].

Bei Rauchern erhöht sich der Homocysteinspiegel nahezu proportional zur Anzahl der gerauchten Zigaretten. Bei einem Konsum von 26 Zigaretten pro Tag wurde eine Homocysteinwerterhöhung von 16% beschrieben [61;62]. Alkoholkonsum führt zu einer Erhöhung des Homocysteinspiegels in Abhängigkeit von der Dauer und der Menge des Konsums [61;63]. Auch Kaffeekonsum führt zu einer dosisabhängigen Erhöhung des Homocysteinspiegels. [61;64].

Folgen

Bei der Oxidation von Homocystein werden reaktive Sauerstoffspezies (Wasserstoffperoxid, Superoxidanionen, Hydroxylradikale) freigesetzt [65;66]. Dadurch kommt es zu einer direkten toxischen Schädigung des Gefäßendothels, zu einer Inaktivierung des vasoprotektiven Stickstoffs (NO) [67] und einer Oxidation von Low density Lipoproteinen (LDL) [68]. Dies spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung der

Atherosklerose mit der Folge von Gefäßerkrankungen [65;69] und einer Häufung der Rate an Myokardinfarkten [70;71] und Schlaganfällen [72;73].

Über eine Aktivierung des Gerinnungsfaktors V, einer gesteigerten Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin [74] und der Bildung der Gewebsthrombokinasen („tissue factor“) [75] interferiert Homocystein mit dem Gerinnungssystem. Wichtige Inhibitoren des Gerinnungssystems werden gehemmt (Thrombomodulin, Antithrombin III, Protein C) [76-79], darüber hinaus beeinträchtigt HCY die Bindung des Gewebe-Plasminogen-Aktivators an Endothelzellen und verringert somit die Fibrinolyse [80]. Diese Mechanismen führen zur vermehrten Bildung von Thrombin und schaffen so eine prothrombotische Situation. Die bei der Oxidation von HCY freigesetzten radikalischen Sauerstoffspezies (ROS) stellen für das Gehirn eine besondere Gefahr dar, da es einen hohen Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren besitzt, die Aktivität detoxifizierender Enzyme (Katalase, Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase) vergleichsweise niedrig ist und abgestorbene Neuronen nicht ersetzt werden können [81]. Neben der Neurotoxizität wird Homocystein auch für Demyelinisierungsprozesse verantwortlich gemacht [82-84].

Bereits 1966 beschrieb McKusick pathologische Knochenveränderungen bei Patienten mit einer HHCY bei einer Homocysteinurie [85]. Diese Erkrankung beruht auf einer Mutation der Cystathion-Beta-Synthase [86] und geht mit einer deutlichen Homocysteinerhöhung einher. Die betroffenen Patienten zeigen ein beschleunigtes Körperwachstum und mehrere Skelettdeformitäten, z.B. Genu valgus, Kyphoskoliose, Pectus carinatum oder Wirbelkörperabflachungen [87;88]. Die zugrunde liegenden Mechanismen für die Knochenformitäten sind weitgehend unbekannt. McKusick vermutete einen Einfluss des Homocysteins auf die sauren Mukopolysaccharide der Kollagensynthese oder eine Störung der Kollagen-Quervernetzung, sogenannte Cross-Links.

Erst 2004 wurden zwei Studien veröffentlicht, die einen Zusammenhang zwischen moderat erhöhten Homocysteinwerten und einem erhöhten Risiko für osteoporotische Frakturen gezeigt haben [1;2]. VanMeurs analysierte mit den Daten der „Longitudinal Aging Study Amsterdam“ (LASA) und der „Rotterdam Study“ über 2400 Personen und konnte zeigen, dass das Gesamtrisiko für eine Fraktur mit der Zunahme der Homocysteinkonzentration um das 1,4-fache steigt [1]. Vergleichbare Ergebnisse

konnte McLean durch Auswertung von mehr als 1800 Personen in der „Framingham Study“ zeigen. Männliche Probanden mit einem Homocystein-Mittelwert von 13,4µmol/l wiesen ein multivariat adjustiertes Risiko von 2,07 für eine Fraktur auf. Bei einem Homocystein-Mittelwert von 20,8µmol/l stieg dieser Wert auf 3,84 an. Für Frauen zeigte sich dieser Zusammenhang weniger stark: bei einem Homocystein-Mittelwert von 18,6µmol/l ergab sich ein Risiko von 1,92 [2].

Nimmt man zur Annahme, eine HHCY führe zu einer Störung des Knochenmetabolismus und zu einer Abnahme der Knochenmakroarchitektur, also zu einer Reduktion der trabekulären Knochenstrukturen, hätte dies die Ausbildung einer Osteopenie oder einer Osteoporose zur Folge und würde folglich mit einer erhöhten Frakturneigung einhergehen.

1.4 Knochenaufbau

Die Knochensubstanz gliedert sich in die äußere, feste Substantia corticalis, beziehungsweise Substantia compacta und die innere Substantia spongiosa, einem schwammartigen Gewebe mit feinen Knochenbälkchen, den Trabekeln. In den langen Röhrenknochen befindet sich das Cavum medullare, in den Zwischenräumen der Substantia spongiosa das Knochenmark (Medulla ossium), welches mit zunehmendem Alter durch Fettgewebe ersetzt wird oder in einigen Knochen (Wirbelkörper, Sternum, Costae, Beckenknochen, Hand- und Fußwurzelknochen) als rotes, blutbildendes Knochenmark sistiert. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die Architektur des Knochens. Die Knochenmatrix besteht zu etwa 70% aus anorganischen Stoffen (vor allem Hydroxylapatit), 20% organischen Stoffen (Kollagen Typ I, Osteonectin, Osteocalcin, Proteoglycane) und zu etwa 10% aus Wasser. In die Knochenmatrix eingebettet liegen die Osteozyten. Der Knochenaufbau erfolgt durch die Osteoblasten, der Knochenabbau durch die mehrkernigen Osteoklasten [89;90].

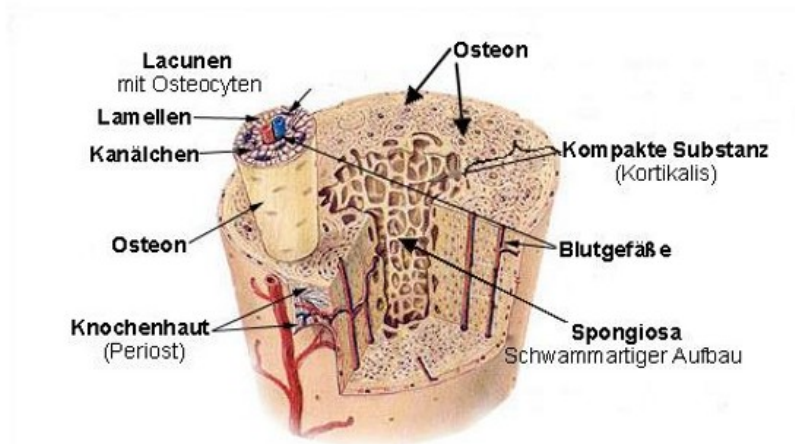


Abb. 3. Architektur des Knochens

1.5 Osteopenie/ Osteoporose

Die Osteopenie/Osteoporose ist charakterisiert durch eine Abnahme der Knochendichte aufgrund eines übermäßigen Abbaus von Knochensubstanz und eine gestörte Knochenmikroarchitektur. Dies führt zu einer Abnahme der Knochenstärke und einem erhöhten Risiko für Frakturen. Dies betrifft nach abnehmender Häufigkeit die Wirbelkörper (Sinterungsfrakturen), hüftgelenksnahe Femurfrakturen (perthrochantäre und Schenkelhalsfrakturen), distale Radiusfrakturen, subcapitale Humerusfrakturen und Beckenfrakturen [91;92]. Ab Knochendichte-Werten zwischen 1 - 2,5 Standardabweichungen unterhalb des Durchschnitts spricht man von einer Osteopenie, ab einer Knochendichte von mehr als 2,5 Standardabweichungen unterhalb des Durchschnitts spricht man von einer Osteoporose [93;94]. Eine Abnahme der Knochendichte ist einer der stärksten Prädiktoren für zukünftige Frakturen [95]. Die Osteoporose ist die häufigste Knochenerkrankung im höheren Lebensalter. Man unterscheidet die primäre Osteoporose (>90%) von der sekundären Osteoporose (<10%), welche als Folge einer anderen Erkrankung, Medikamenteneinnahme oder Immobilisation auftritt. In Deutschland sind 26 % der Bevölkerung über 50 Jahren von einer Osteoporose betroffen. Die Gesamtzahl der Erkrankten in Deutschland liegt bei etwa 7,8 Millionen Menschen (6,5 Millionen Frauen und 1,3 Millionen Männer). Von diesen Erkrankten erleiden jedes Jahr 4 bis 5% eine Fraktur. Die Krankheitskosten der Osteoporose in Deutschland werden auf insgesamt 5,4 Milliarden Euro pro Jahr

geschätzt [96;97]. Aufgrund des demografischen Wandels ist mit einer deutlichen Zunahme sowohl der Anzahl an Osteoporose-Erkrankten, als auch an Osteoporose-assoziierten Frakturen zu rechnen [96;97]. Abbildung 4 zeigt die hochauflösenden, mit einem speziellen quantitativen Computertomografieverfahren erstellten Aufnahmen eines gesunden Knochens eines 78 Jahre alten Mannes (links) und eines osteoporotischen Knochens eines 72 Jahre alten Mannes (rechts).

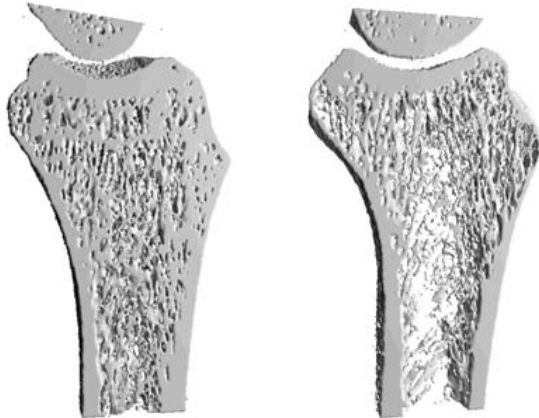


Abb.4. Vergleich eines gesunden Knochens (links) mit einem osteoporotischen Knochen

1.6 Ziel der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit war, über die alimentäre Zufuhr von HCY, Methionin oder den Entzug der Vitamine Pyridoxin und Cobalamin eine HHCY herbeizuführen und durch histomorphometrische Messungen die Knochenstruktur zu analysieren. Dadurch sollte der Zusammenhang zwischen einer HHCY und der vermuteten Entwicklung einer Osteoporose näher untersucht werden.

1.7 Arbeitshypothese

Eine HHCY führt zu einer Veränderung der Knochenstruktur mit Abnahme der Knochendichte und Veränderung weiterer histomorphometrischer Messgrößen.

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign

In der vorliegenden Arbeit wurde an einem Rattenmodell über die alimentäre Zufuhr von HCY- oder Methionin-angereicherter Nahrung, beziehungsweise über einen Vitaminentzug eine HHCY erzeugt. Nach einer Standzeit von 12 Wochen erfolgte die Tötung der Tiere und Explantation der Femura und der ersten Lumbalwirbelkörper. Die Aufzucht und Behandlung der Tiere, sowie eine zweimalige Blutentnahme zur Bestimmung von Plasma-Homocystein, Osteocalcin, Kollagen-I-C-terminal Crosslaps, Folat, Vitamin B12 und Kreatinin erfolgte durch die kooperierende Arbeitsgruppe in Homburg/Saar (Dr. Herrmann, Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum des Saarlands, heute Bozen, Italien).

Die rechten Femura wurden dem weiteren Kooperationspartner in Ulm (Prof. Claes, Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Universität Ulm) zur biomechanischen Testung zugeführt. Mit den linken Femura und den ersten Lumbalwirbelkörpern erfolgte eine histologische Aufarbeitung und histomorphometrische Auswertung. Die Blutanalysen und die biomechanische Testung sind nicht Gegenstand dieser Arbeit.

2.2 Versuchstiere

Für die Versuche wurden fünfzig 10-12 Wochen alte, 180-292 g schwere, weibliche Wistar-Ratten verwendet (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland). Es erfolgte eine Randomisierung in 5 Gruppen zu jeweils 10 Tieren mit anschließender Verblindung. Um eine Adaptation der Tiere zu gewährleisten, erfolgte zunächst eine Akklimatisierungsphase von 7 Tagen. So wurde sichergestellt, dass sich die Tiere an die neue Umgebung, das Pflegepersonal und einen Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12h gewöhnen. Die Tiere wurden bei einer Temperatur von 22° Celsius gehalten und hatten jederzeit freien Zugang zu Nahrung und Wasser. In der Kontrollgruppe wurde eine „Standard Tier-Diät“ (Altromin, Deutschland) verwendet (Tab.2). Der HCY1%-Gruppe wurden zum Futter zusätzlich 10 g Homocystein (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) pro 1000 g Futter zugefügt, der HCY2%-Gruppe 20 g HCY/1000g Futter. Die Methionin 2,4%-Gruppe erhielt 24 g Methionin pro 1000 g Futter (Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Die Vitaminmangelgruppe erhielt ein Futter ohne die Vitamine Pyridoxin und Cobalamin (Altromin, Deutschland). Nach 12-wöchiger Diät erfolgte die Tötung der Tiere und anschließend die Explantation der linken Femura und Lumbalwirbelkörper zur histologischen Analyse.

Tab. 2. Aufteilung der Tiere in die Versuchsgruppen

Gruppe	Kurzbezeichnung	Behandlung
1	KO	Kontrollgruppe
2	HCY1%	Homocystein 1% = 10g pro 1000g Futter
3	MET	Methionin 2,4% = 24g pro 1000g Futter
4	HCY2%	Homocystein 2% = 20 g pro 1000g Futter
5	VIT	Vitaminmangelgruppe

2.3 Knochenpräparate

Fixation

Material:

- Fixierlösung:- 324 ml Formaldehyd 37 %; J.T. Baker, Mallinckrodt Baker BV, Deventer, Holland
- 550 ml Ethylalkohol 100 %; Herbeta Arzneimittel Berlin, Deutschland
- 130 Na-Barbital-Puffer (0,1 molar, pH 7,3); Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- 6 g Glucose; Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- Schraubgläser mit Deckeln
- Schüttler, HS 501 digital; KIKA Labortechnik, Deutschland

Durchführung:

Um alle Stoffwechselprozesse und postmortalen Zerfallsprozesse zu unterbinden, wurden die Knochen als erster Schritt der Aufbereitung in Fixierlösung gegeben. Direkt nach der Explantation aus den Tieren wurden die Knochen mit entsprechenden Präparatnummern versehen und einzeln in verschraubbare Gläser gegeben und mit der Fixierlösung übergossen. Die Fixation erfolgte über drei Tage bei Raumtemperatur. Zur besseren Verteilung wurde ein Schüttler benutzt. Anschließend wurden die Proben für circa 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült.

Entwässerung und Entfettung

Material:

- 70%, 80%, 96%, 100% Ethylalkohol; Herbeta-Arzneimittel Berlin, Deutschland
- Xylol, J.T. Baker, Mallinckrodt Baker BV, Deventer, Holland

Durchführung

Die Entwässerung der Präparate erfolgte nach folgendem festen Zeitschema:
Je 3 Tage in 70% und 80%, 2x 3 Tage in 96% und 3x 3 Tage in 100% Ethylalkohol.
Es wurden mehrfach gleiche Konzentrationen von Ethylalkohol verwendet, um die völlige Entwässerung der Präparate zu erreichen und um eine Verwässerung des

Alkohols zu vermeiden. Im Anschluss an die Entwässerung erfolgte die Entfettung der Präparate in Xylol für einen Tag bei Raumtemperatur (25°C). Xylol diente dabei als Zwischenmedium vor der Infiltration.

Präinfiltration und Infiltration

Material:

- Polymerisationssystem Technovit® 9100 NEU (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Kulzer, Wehrheim, Deutschland)
- Schüttler HS 501 digital (KIKA Labortechnik, Deutschland)
- Schraubgläser mit Deckeln

Verarbeitung:

Technovit® 9100 NEU ist ein Polymerisationssystem auf der Basis von Methylmetacrylat und wurde speziell zur Einbettung von mineralisierten Geweben für die Histologie entwickelt. Die Herstellung der Gebrauchslösungen (Präinfiltrations-, Infiltrationslösung, Stammlösung A und B) erfolgte gemäß Herstellerangaben nach dem folgenden Schema (Tabelle 3). Die Basislösung wurde vor der Verarbeitung in einer Al₂O₃-Chromatographiesäule entstabilisiert.

Tab. 3. Verarbeitungsschema Technovit® 9100 NEU

	Basislösung	PMMA-Pulver	Härter 1	Härter 2	Regler
Material-Nr.	1	2	3	4	5
Präinfiltrationslösung	200 ml 190 g		1 g		
Infiltrationslösung	ad 250 ml 237,5 g	20 g	1 g		
Stammlösung A	ad 500 ml 475 g	80 g	3 g		
Stammlösung B	ad 50 ml 47,5 g			4 ml 4,3 g	2 ml 1,7 g
Polymerisationsgemisch	9 Volumenteile Stammlösung A + 1 Volumenanteil Stammlösung B				

Die Lösungen sind für etwa 1 Woche bei 4°C lagerbar.

Durchführung

Direkt im Anschluss an die Entfettung erfolgte die Präinfiltration in fest verschlossenen Gläsern bei Raumtemperatur für 12 Stunden. Anschließend erfolgte die Infiltration der Präparate für fünf Tage bei 4°C, ebenfalls in fest verschlossenen Gläsern. Zur besseren Durchdringung des Technovit in das Präparat wurde ein Schüttler verwendet.

Einbettung

Material:

- Technovit® 9100 NEU (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Kulzer, Wehrheim Deutschland)
- Einbettformen mit Deckel, Material: Teflon (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG Kulzer, Wehrheim, Deutschland)
- Messzylinder 100 ml
- Glasstab
- Pinzette fein
- Styroporbox mit Deckel
- Eis
- Plastikwanne circa 30x20cm
- Vakuumpumpe (Millivac Labor-Vakuumpumpe, Merck Millipore, Billeria, USA)

Durchführung:

Die Stammlösungen A und B wurden zur Bildung des Polymerisationssystems entsprechend des Verarbeitungsschemas (Tab. 3) direkt vor Gebrauch in einem Glaszylinder gemischt. Die Präparate wurden in definierter Lage zusammen mit der Präparatnummer auf dem Boden der Einbettformen positioniert und anschließend mit der Polymerisationslösung bis zum Rand der Form übergossen, luftdicht verschlossen und in einer Plastikwanne innerhalb einer mit Eis gefüllten Styroporbox für etwa 24 Stunden zur Aushärtung gebracht. Das Eis ermöglichte die Ableitung der Polymerisationswärme. Zur Vermeidung feiner Luftblasen wurden die Proben vor dem Verschließen in der Einbettform mit einer Vakuumpumpe bei etwa -0,7 bar für wenige Minuten entlüftet. Während der Auspolymerisierung wurde darauf geachtet, dass kein Wasser vom umgebenden Eis an die Proben gelangt, da dies zu einer Weißfärbung des Kunststoffes führt. Werden die Einbettformen nicht luftdicht verschlossen, so verzögert oder verhindert dies die Auspolymerisation.

Auflösung fehlerhafter Präparate

Material:

- (2-Methoxyethyl-)acetat $C_5H_{10}O_3$ (Merk Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland)
- Schraubgläser mit Deckeln
- Schüttler HS 501 digital (KIKA Labortechnik, Deutschland)

Durchführung:

Fehlerhafte Proben, zum Beispiel durch eine fehlerhafte Lage des Knochens, wurden wieder aufgelöst. Dies erfolgte durch mehrtägige Lösung in (2-Methoxyethyl-)acetat in verschlossenen Gläsern bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Anschließend konnte nach erneuter Präinfiltration und Infiltration eine nochmalige Einbettung der Proben erfolgen.

Aufblockung

Material:

- Technovit[®] 3040 Kaltpolymerisierender Kunststoff (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Kulzer, Wehrheim, Deutschland)
 - 1000 ml Methylmetacrylat, N,N-Dimethyl-p-toluidin
 - 1000 g Dibenzolperoxid
- Glasstab
- Einwegbecher aus Pappe
- Pflaster

Durchführung:

Durch die Aufblockung der Präparate auf einen stabilen Kunststoffsockel wurde eine leichtere Weiterverarbeitung, zum Beispiel beim späteren Einspannen ins Mikrotom, ermöglicht. Dies diente einer Vergrößerung der Oberfläche und damit der Stabilität der Kunststoffblöcke, so dass das Risiko des Zerbrechens der Blöcke beim Einspannen in das Hartschnittmikrotom reduziert wurde. Eine Ummantelung der ausgehärteten Präparate mit Pflasterstreifen bildete die Formvorlage für den Sockel. Direkt vor Gebrauch wurden die beiden Komponenten von Technovit[®] 3040 im Verhältnis 2 Teile Pulver zu 1 Teil Flüssigkeit vermischt und in die Formen gegossen. Die Aushärtung dauerte etwa zwanzig Minuten.

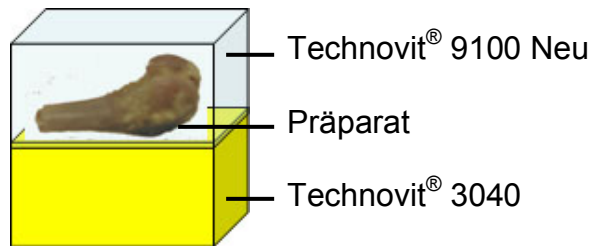


Abb. 5: fertiges Schnittpräparat

2.4 Herstellung histologischer Schnitte

Material

- Handschleifgerät (Jean Wirtz Phoenix 3000; Wirtz-Buehler, Düsseldorf, Deutschland)
- Mikrotom - Leica SM 2500 S (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland)
- Leica RM 2255 (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland)
- Wärmeschrank Heraeus Function line (Heraeus Instruments, Kendro Laboratory products, Hanau, Deutschland)
- Objektträgerpresse
- Wasserwaage, klein; BMI, Deutschland
- Schneidmesser, Hartmetall, Schliff 16 cm (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland)
- Objektträger (Superfrost, Marienfelde, Deutschland)
- Schleifmaschine (Phoenix 3000, EXAKT Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland)
- Schleifscheiben
- Schneidflüssigkeit
- Streckflüssigkeit: 30 ml Butoxyethylacetat + 70 ml Alkohol 70%
- Ethylalkohol 70% (Herbeta-Arzneimittel Berlin, Deutschland)
- Kisol-Folie: 0,025 x 95 x 95 mm, farblos (Medim Histotechnologie GmbH, Gießen, Deutschland)
- Filterpapier 58 x 58 cm
- Pinzette, fein
- Pinsel, fein

Durchführung

Um das Schneiden am Mikrotom zu erleichtern, wurden die Blöcke bis zur Schnittebene des Knochens mit einer Schleifmaschine angeschliffen. Zur Anfertigung der histologischen Schnittpräparate mit einer Dicke von 6 µm wurde ein Hartschnittmikrotom verwendet. Zum Schneiden wurden Messer und Präparat eingespannt und gegeneinander bewegt. Die Schnittebene lag dabei waagrecht.

Das Mikrotom besitzt eine untere, ansteigende und eine obere, horizontal verlaufende Schlittenbahn. Auf der horizontalen Bahn sitzt der Messerschlitten, in den das Mikrotommesser eingespannt wird. Auf der unteren Schlittenbahn läuft der Objektschlitten, der die Objekthalterung trägt. Das zu schneidende Präparat wurde so eingespannt, dass es waagrecht zum Messer liegt. Die horizontale Lage wurde mit einer Wasserwaage kontrolliert. Das Messer wurde mit einem flachen Winkel zum Präparat eingestellt. Der Hubvorschub, der Abstand, mit dem sich der Objektschlitten in jedem Durchgang dem Messer annähert, wurde auf 10-20 μm eingestellt. Während des Schneidevorgangs wurden Schnittpräparat und Messer permanent mit Schneidflüssigkeit benetzt. Nachdem die gewünschte Schnittebene erreicht war, wurden 6 μm dicke Schnitte mit Hilfe einer feinen Pinzette oder eines feinen Pinsels vorsichtig vom Messer abgenommen und auf zuvor bereitgestellte, mit 70%igem Alkohol benetzte, Objektträger gelegt und mit feinen Pinseln auseinander gezogen, um kleine Falten zu korrigieren. Abbildung 6 zeigt die Arbeit am Mikrotom. Die Schnittpräparate wurden mit Streckflüssigkeit (30 ml Butoxyethylacetat + 70 ml 70%iger Alkohol) benetzt und mit einer Kisolfolie belegt. Überschüssige Flüssigkeit auf dem Objektträger wurde mit Filterpapier entfernt. Mehrere Objektträger wurden übereinander in einer Objektträgerpresse gestapelt und bei circa 37°C in einem Wärmeschrank gepresst. Dieser Vorgang ermöglichte eine vollständige Haftung der Schnitte auf dem Objektträger.

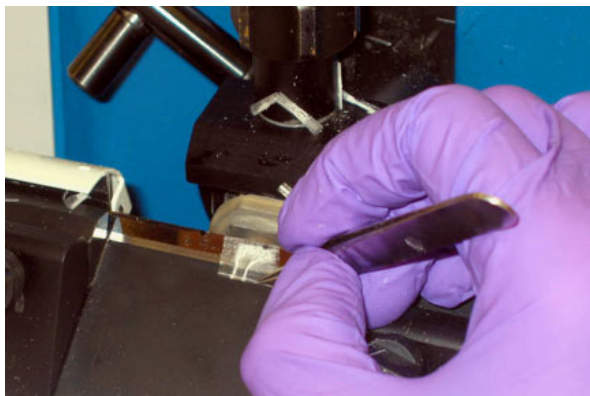


Abb. 6. Entnahme eines 6 μm -Schnittes aus dem Mikrotom

Schnittebenen

Um bei der späteren Auswertung der Knochen alle Präparate miteinander vergleichen zu können, wurde eine Zielebene festgelegt, die anhand bestimmter anatomischer Strukturen definiert wurde.

Der distale Femurknochen wurde in frontaler Ebene geschnitten. Als Leitstruktur für die Zielebene diente die Epiphysenfuge, welche beim Anschnitt wellenförmig erschien, bei weiteren Schnitten von anterior nach posterior geradlinig wurde und bei weiteren Schnitten nach posterior wieder wellenförmig imponierte. Die Schnittebene wurde im Bereich einer möglichst geradlinig verlaufenden Epiphysenfuge festgelegt.

Im Bereich des proximalen Femurknochens erfolgten die Schnitte in frontaler Ebene zur genauen Darstellung des Collum femoris. Als Zielstruktur wurde der Bereich im Oberschenkelhals mit dem größten Querdurchmesser der Substantia spongiosa festgelegt. Auch die Lumbalwirbelkörper wurden in frontaler Ebene geschnitten. Als Zielebene wurde ein Bereich definiert, in dem von anterior nach posterior links- und rechtsseitig erstmalig der Processus transversus (auf gleicher Höhe) mit angeschnitten wurde. Abbildung 7 zeigt die Schnittebenen der drei Knochen.



distaler Femur



Collum femoris



Wirbelkörper

Abb. 7. Zielschnittebenen der jeweiligen Knochenpräparate

(Vergrößerung 5-fach, Färbung nach van Kossa)

2.5 Färbung histologischer Schnitte

Versilberung nach van Kossa

Material:

- (2-Methoxyethyl-)acetat (Merk Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland)
- 70%-, 80%-, 96%-, 100%iger Alkohol (Herbeta-Arzneimittel Berlin, Deutschland)
- Aqua dest. (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- 5% Natriumthiosulfat entsprechend 50 g Natriumthiosulfat in 1000 ml Aqua dest. (Merk 6516, Merck KgaA Darmstadt, Deutschland)
- 3% wäßrige Silbernitratlösung entsprechend 30 g Silbernitrat in 1000 ml Aqua dest. (Merk 1512, Merck KgaA Darmstadt, Deutschland)
- 0,5% Pyrogallollösung entsprechend 0,5 g 1,2,3-Trihydroxybenzol in 1000 ml Aqua dest (Merck 612, Merck KgaA Darmstadt, Deutschland)
- Xylol (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker BV, Deventer, Holland)
- Leitungswasser
- Deckgläser
- Küvetten
- Objektträgerhalter

Durchführung:

Die Versilberung nach van Kossa dient der Darstellung von mineralisiertem Knorpel- und Knochengewebe. Hierbei werden Kalziumionen gegen Silberionen ausgetauscht und anschließend zu metallischem Silber reduziert. Mineralisierter Knochen kommt dabei schwarz zur Darstellung, Knorpelgewebe schwarz-braun und die Mineralisationsfronten schwarzgranuliert

Zu Beginn wurden die Schnitte dreimal je 30 Minuten in (2-Methoxyethyl-)acetat entplastet und anschließend für 5-10 Minuten unter Leitungswasser gespült. Die Kisolfolie ließ sich am Anfang des Entplastens leicht und ohne Beschädigung des Schnittes entfernen. Nun wurden die Proben für eine Minute in die Silbernitratlösung gegeben und anschließend 3x1 Minute mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die Proben für eine Minute in die Pyrogallollösung gegeben, wobei das gebundene Silber zu schwarzem, elementarem Silber reduziert wurde.

Nach erneutem Spülen á 3x1 Minute in Aqua dest. wurden die Proben für drei Minuten in Dinatriumthiosulfatlösung gegeben, wobei nicht reduziertes Silber entfernt wurde. Nach erneuter Spülung in Aqua dest. erfolgte eine Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (siehe Kapitel „Entwässerung und Entfettung“) und die anschließende Entfettung in Xylol.

2.6 Auswertung mittels Bildanalyse

Material

- Durchlichtmikroskop (Leica DMRB, Leica Instruments GmbH, Bensheim, Deutschland)
- Digitalkamera (Zeiss AxioCam MRC, Zeiss GmbH, Deutschland)
- Modulare Bildanalysesoftware (Zeiss KS 400 Version 3.0, Carl Zeiss Vision GmbH, Deutschland)
- Axio Vision Rel. 4.4 (Carl Zeiss Vision GmbH, Deutschland)

Durchführung

Das Bildanalyse-System umfasste ein Lichtmikroskop mit motorisiertem Kreuztisch, welches mit einer Digitalkamera versehen und an ein Datenverarbeitungsprogramm angeschlossen ist. Mit Hilfe der Bildanalysesoftware (Zeiss KS 400) konnten die gefärbten Schnitte histomorphometrisch ausgewertet werden. Die durch die van Kossa-Färbung eingefärbten Gewebe wurden aufgrund von Farbwert- und Dichteunterschieden, sowie anhand charakteristischer Größen und Formen erkannt und verschiedene Messgrößen konnten digital berechnet werden. So konnten strukturelle Parameter wie die Knochendichte, die Trabekeldicke, die Ausrichtung, sowie die Anzahl der Knotenpunkte bestimmt werden. Zusätzlich konnten Flächen oder Strukturen manuell umfahren und somit sequenziert werden. Das Programm erfasste im Falle der van Kossa-Färbung die schwarz gefärbten Anteile des Knochens als mineralisiertes Gewebe. Die verwendeten Messparameter entsprachen den Empfehlungen der American Society of Bone and Mineral Research [98].

Unter Verwendung der zuvor beschriebenen, genau definierten Schnittebenen wurde eine Messebene innerhalb der Schnittebene definiert, die so genannte „Region of interest“ („ROI“). Die Präparate konnten so nach einer festgelegten Vorgehensweise einheitlich ausgewertet und untereinander verglichen werden.

Bildung der Messbereiche (Regions of Interest)

Bildung des Messbereichs (ROI) an den Schnittbildern der Wirbelkörper:

Unterhalb der kranialen und oberhalb der kaudalen Epiphysenfuge der Lumbalwirbelkörper wurde eine gerade Linie gezogen (a^1, a^2). Durch die Hälfte der durchschnittlichen Längen der beiden Linien wurde die Breite der ROI definiert (A). Die Hälfte des Abstands zwischen den Linien a^1 und a^2 (b) definierte die Höhe der ROI (B). Genau in der Mitte zwischen beiden Linien wurde ebenfalls eine Linie eingefügt (c), damit wurde die ROI passend im Messobjekt zentriert. Alle Linien lagen streng im spongiösen Knochenanteil. Abbildung 8 zeigt die Bildung der ROI an den Schnittbildern der Wirbelkörper.

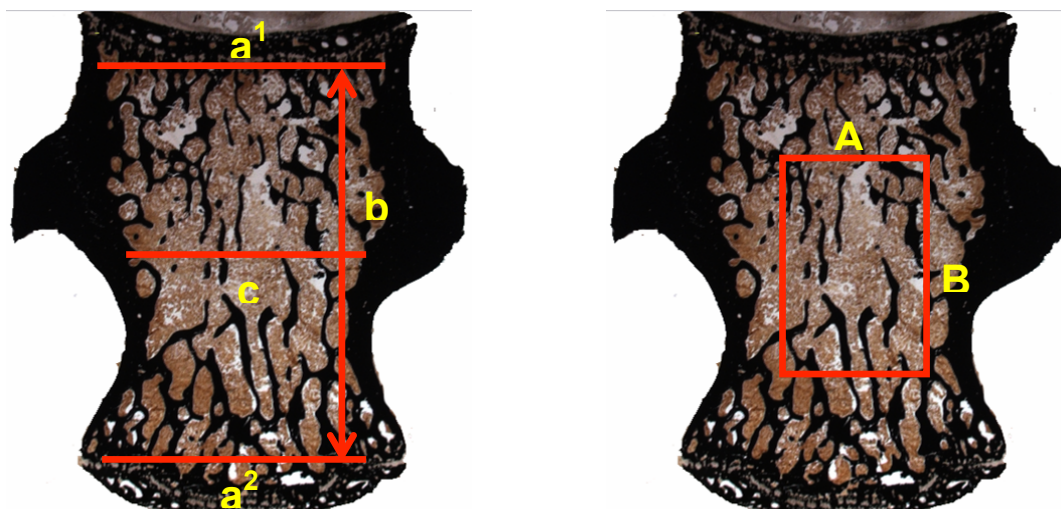


Abb. 8.

Ausrichtung Messbereich Wirbel

Region of Interest (ROI) Wirbel

Bildung des Messbereichs (ROI) an den Schnittbildern des distalen Femurs:

Im Bereich des distalen Femurknochens wurde unterhalb der distalen (kaudalen) Epiphysenfuge eine Linie eingefügt (a). Da bei diesem Knochenareal ein weiterer markanter anatomischer Orientierungspunkt fehlt, wurden durch diese Linie die Höhe und die Breite der ROI definiert. Die Höhe (B) entsprach dabei $2/3$, die Breite (A) entsprach der Hälfte der Länge der Linie a . Eine senkrecht zur Linie a verlaufende Linie

(b) definierte die Zentrierung der ROI. Abbildung 9 zeigt die Bildung der ROI an den Schnittbildern des distalen Femurs. Die Messung der Dicke der Wachstumsfuge im Bereich des distalen Femurs erfolgte außerhalb der ROI. Die Wachstumsfuge wurde dabei in dem jeweiligen Präparat von Hand farblich markiert. Abbildung 17 (Seite 30) zeigt die Markierung der Wachstumsfuge.

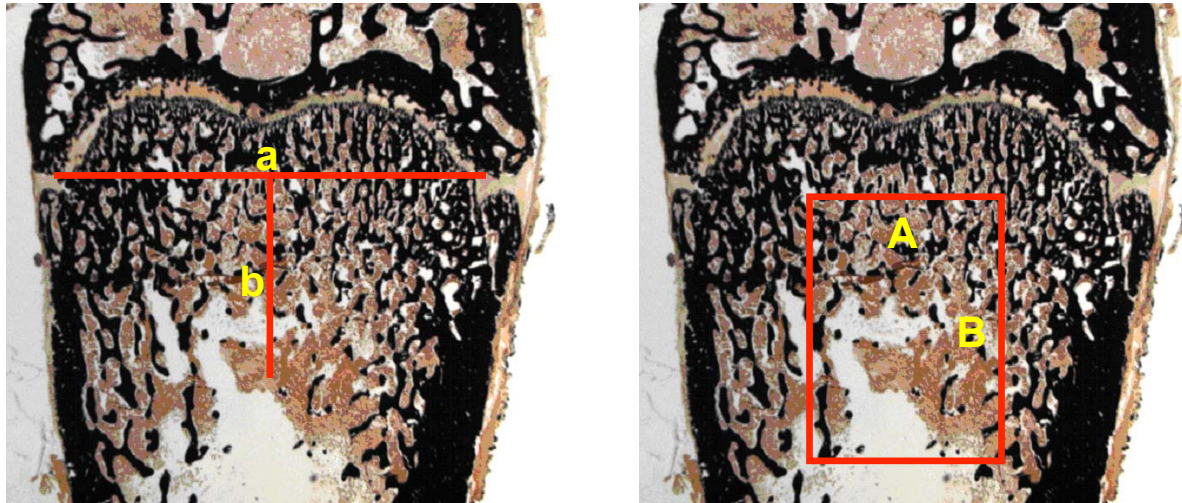


Abb. 9.

Ausrichtung Messbereich distaler Femur

Region of Interest (ROI) distaler Femur

Bildung des Messbereichs (ROI) an den Schnittbildern des Collum Femoris:

Im Bereich des proximalen Femurknochens wurde eine Linie unterhalb der Epiphysenfuge des Caput femoris gezogen (a). Diese bildete die obere Begrenzung. Die untere Begrenzung wurde von einer Linie gebildet, welche waagrecht auf Höhe der Fossa trochanterica verläuft (b). Die Begrenzung zu den Seiten bildete die jeweilige Kortikalis. Innerhalb dieser vier Begrenzungen wurde die ROI eingefügt. Abbildung 10 zeigt die Bildung der ROI an den Schnittbildern des Collum femoris.

Die nachfolgenden Messungen erfolgten ausschließlich innerhalb der jeweiligen Regions of Interest, ausgenommen die Messung der Dicke der Wachstumsfuge im Bereich des distalen Femurs.

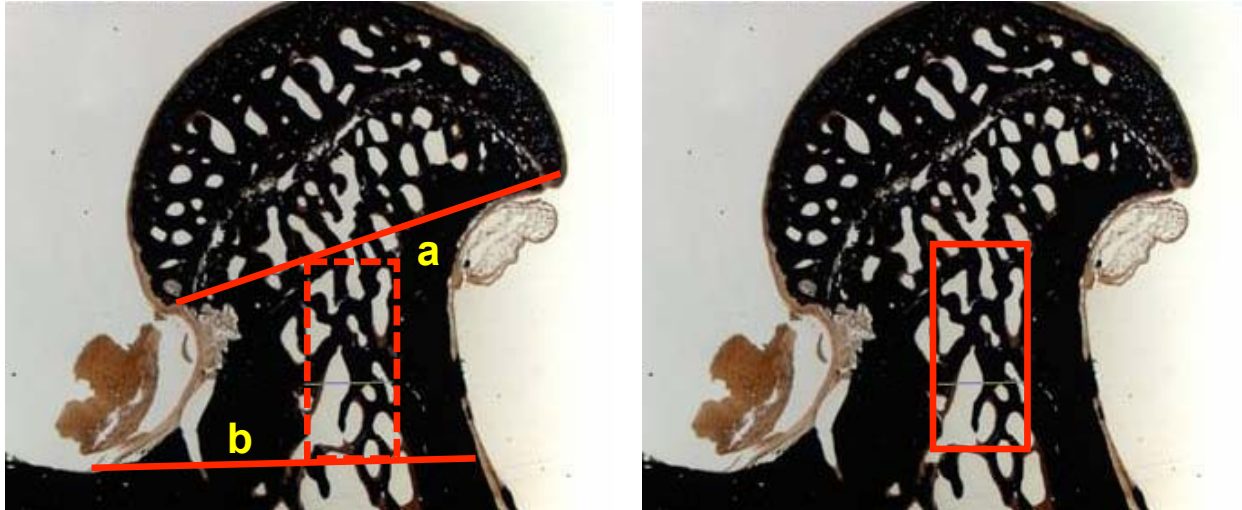


Abb. 10.

Ausrichtung Messbereich Collum femoris

Region of Interest (ROI) Collum femoris

Messparameter

Folgende Parameter wurden für die Knochensegmente distaler Femur, Collum femoris und Lumbalwirbelkörper errechnet oder ausgezählt, entsprechend den Empfehlungen der American Society of Bone and Mineral Research [98]:

1. Knochendichte = Gesamtknochenanteil in % an der Gesamtpräparatfläche
2. Umfang der Knochen trabekel
3. Knochen trabekeldicke
4. Anzahl der Knochen trabekel
5. Abstand der Knochen trabekel
6. Anzahl der Trabekel mit > 3 Verzweigungspunkten
7. Dicke der Wachstumsfuge

Im Bereich Collum femoris und Lumbalwirbelkörper erfolgte keine Messung der Parameter 6 und 7.

Knochendichte (Total Bone Density TBDn[%])

Die Total Bone Density (TBDn) gibt den Gesamtknochenanteil in % an der Gesamtpräparatefläche an, dies entspricht der Knochendichte. In der nachfolgenden Abbildung 11 ist die Gesamtpräparatefläche (TAr) als rotes Quadrat dargestellt (ROI). Die schwarze Fläche innerhalb des Quadrats zeigt den Gesamtknochenanteil (TBAr).

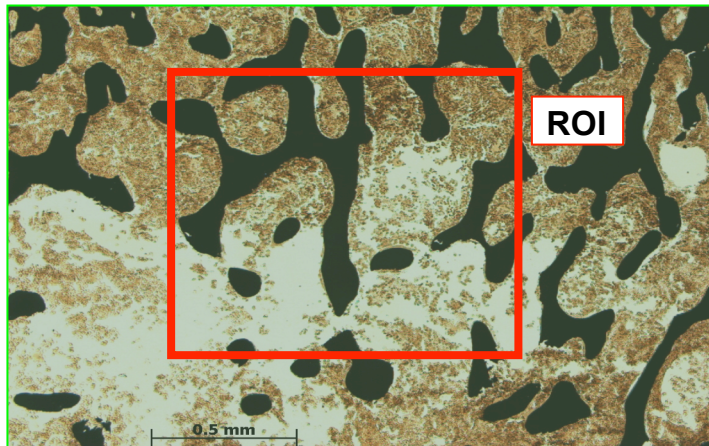


Abb. 11. Knochenanteil an der Gesamtpräparatefläche innerhalb der Region of Interest (ROI)

Umfang der Kochentrabekel (TbPerimeter)

Die nachfolgende Abbildung 12 zeigt den Umfang der Kochentrabekel innerhalb der „Region of Interest“ (ROI) grün markiert (Tb Perimeter).

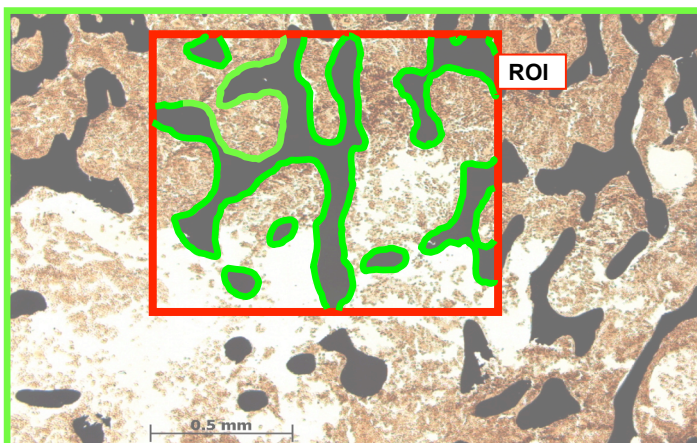


Abb.12. Messung Tb Perimeter innerhalb der Region of Interest (ROI)

Knochen trabekeldicke (Tb Thickness)

Zur Bestimmung der durchschnittlichen Knochen trabekeldicke wurden innerhalb einer ROI in kurzen Abständen die Querdurchmesser der Knochen trabekel gemessen (im Bild grün markierte Linien). Die durchschnittliche Länge dieser Linien ergab die Knochen trabekeldicke. Abbildung 13 zeigt die Messung der Trabekeldicke.

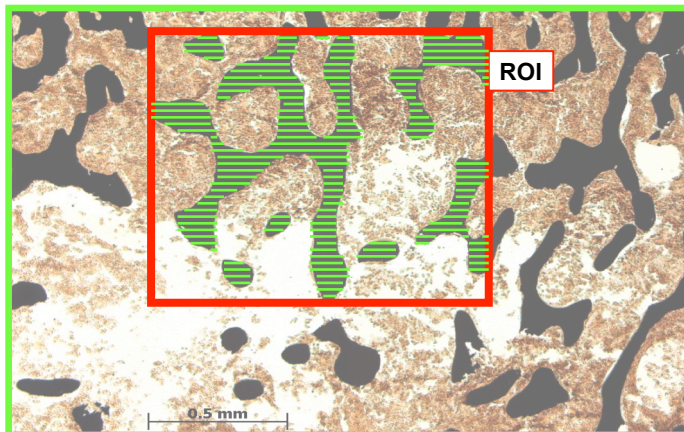


Abb. 13. Messung Tb Thickness innerhalb der Region of Interest (ROI)

Anzahl der Knochen trabekel (Tb Number)

Die Anzahl der Knochen trabekel wurde innerhalb einer ROI ausgezählt.

In Abbildung 14 liegt ein großer Knochen trabekel innerhalb der ROI, weitere Trabekel wurden angeschnitten.

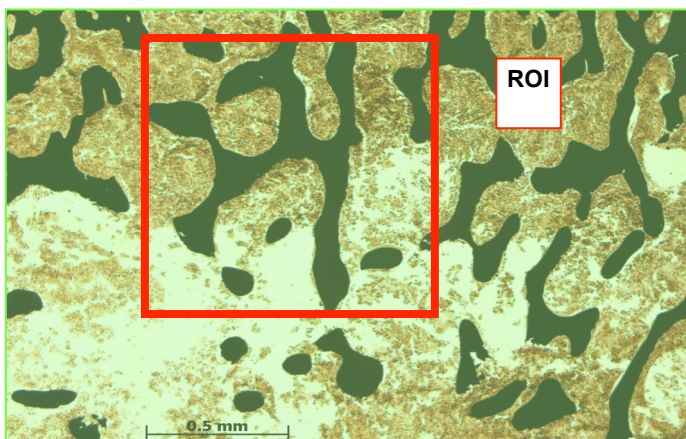


Abb. 14. Messung Tb Number innerhalb der Region of Interest (ROI)

Abstand zwischen den Knochentrabekeln (Tb Separation)

Zur Bestimmung der durchschnittlichen Abstände zwischen den Knochentrabekeln wurden innerhalb einer ROI in kurzen Abständen die Bereiche zwischen den Knochentrabekeln gemessen (in Abbildung 15 grün markierte Linien). Daraus wurde jeweils der Durchschnittswert errechnet.

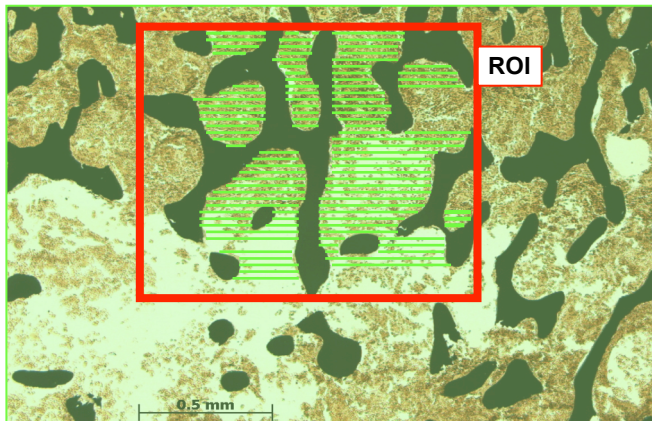


Abb. 15. Messung Tb Separation innerhalb der Region of Interest (ROI)

Anzahl der Knochentrabekel mit > 3 Verzweigungspunkten

Innerhalb einer ROI wurden alle Knochentrabekel, welche mindestens 3 oder mehr Verzweigungspunkte aufwiesen markiert (in Abbildung 16 durch grüne Punkte markiert).

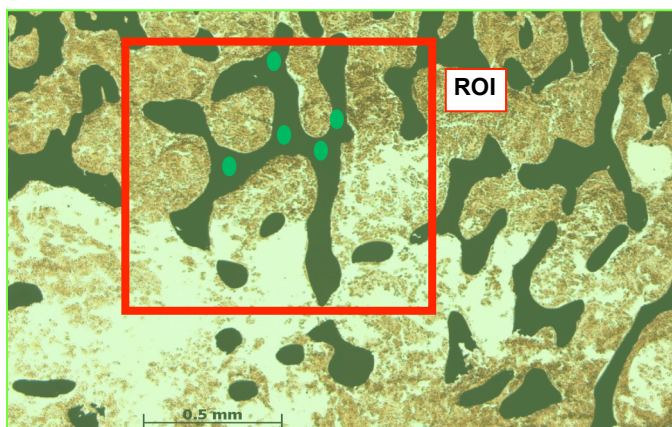


Abb. 16. Auszählung der Knochentrabekel mit >3 Verzweigungspunkten innerhalb der Region of Interest (ROI)

Dicke der Wachstumsfuge

Die Wachstumsfuge wurde markiert und die Dicke in gesamter Länge vermessen, anschließend wurde ein Mittelwert der Dickenmessung errechnet. In Abbildung 17 ist die Wachstumsfuge grün markiert.

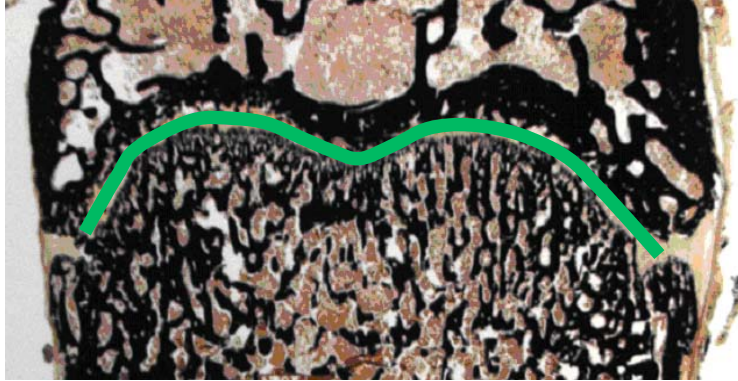


Abb. 17. Markierung der Wachstumsfuge distaler Femur (Vergrößerung 5-fach, van Kossa-Färbung)

2.7 Statistik

Material:

- SPSS 11.0 software package (SPSS Inc., Chicago, USA)

Durchführung:

Alle Variablen, ausgenommen der „Abstand der Knochentrabekel“, waren nach Durchführung des Kolmogorov-Smirnov-Tests normalverteilt. Die Ergebnisse der deskriptiven Statistik wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

Die Gruppenvergleiche mit normalverteilten Variablen wurden mittels one-way-ANOVA mit LSD post-hoc-Test durchgeführt. Die Vergleiche der Variablen „Abstand der Knochentrabekel“ erfolgten mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-Test.

Die Werte der Versuchsgruppen wurden immer zu denen der Kontrolle verglichen.

3. Ergebnisse

Am Anfang der Untersuchung lag das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere bei 233 ± 27 g und die Serum-Homocystein-Konzentrationen bei $4,3 \pm 1,8$ $\mu\text{mol/L}$. Während der Untersuchung nahmen alle Tiere in gleichem Umfang an Gewicht zu. Das durchschnittliche Körpergewicht nach der Behandlung lag bei 300 ± 19 g. Nach zwölfwöchiger alimentärer Behandlung zeigte sich in der Methionin-Gruppe und in den beiden Homocysteingruppen eine Hyperhomocysteinämie.

Die Einteilung der Hyperhomocysteinämie (HHCY) beim Menschen erfolgt in moderat (Serumhomocysteinspiegel 12-30 $\mu\text{mol/L}$), intermediär (30-100 $\mu\text{mol/L}$) und schwer (>100 $\mu\text{mol/L}$) [10]. Anhand dieser Einteilung erreichte die Methioningruppe eine moderate HHCY (mittlerer Homocysteinwert: 27,28 $\mu\text{mol/L}$), die Homocystein 1%-Gruppe eine intermediäre HHCY (mittlerer Homocysteinwert: 40,6 $\mu\text{mol/L}$) und die Homocystein 2%-Gruppe ebenfalls eine intermediäre HHCY (mittlerer Homocysteinwert: 54,0 $\mu\text{mol/L}$). In der Vitaminmangelgruppe erreichten die Tiere durchschnittliche Homocysteinwerte von 8,5 $\mu\text{mol/L}$ und zeigten damit zwar eine Erhöhung im Vergleich zu den Ausgangswerten vor der Behandlung und im Vergleich zur Kontrollgruppe, lagen mit diesem Wert aber im Homocysteinnormalbereich. Das Serum-Kreatinin lag für alle Tiere am Ende der Behandlung im Normbereich ($46,5 \pm 11,2$ $\mu\text{mol/L}$), womit eine Nierenfunktionseinschränkung als mögliche Ursache der Homocysteinwerterhöhung ausgeschlossen werden konnte.

3 Tiere aus der Kontrollgruppe zeigten spontan erhöhte Homocysteinblutwerte (Plasma-HCY: 11-13 $\mu\text{mol/l}$). Zudem fanden sich in der HCY2%-Gruppe 2 Non-Responder-Tiere mit normalen Homocysteinblutwerten. Die 3 Tiere aus der Kontrollgruppe und die 2 Tiere aus der HCY2%-Gruppe wurden von der Analyse ausgeschlossen.

3.1 Distaler Femur

Die Untersuchung am distalen Femur zeigte bereits eine makroskopisch sichtbare Reduktion der trabekulären Knochenstrukturen in den Gruppen MET und HCY2%. Die Aufnahmen der MET-Gruppe zeigten histologisch eine deutliche Ausdünnung der Knochen trabekel und damit eine deutliche Abnahme der Knochendichte im Vergleich zur Kontrollgruppe. In den Aufnahmen der HCY2%-Gruppe war der spongiöse Knochenanteil nur noch im distalen, gelenknahen Anteil zu sehen und auch hier massiv ausgedünnt. Im proximalen Knochenanteil waren nur vereinzelt oder keine trabekulären Knochenstrukturen mehr sichtbar. Abbildung 18 zeigt die bereits makroskopisch sichtbare Reduktion im Bereich des distalen Femurs für die Gruppen MET und HCY2% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Aufnahmen der Gruppen HCY1% und VIT zeigten keinen Unterschied zur Kontrollgruppe und sind daher nicht gesondert abgebildet.



Abb. 18. Übersicht Schnittbilder distaler Femur. KO= Kontrollgruppe, MET= Methionin-Gruppe, HCY2%= Homocystein 2%- Gruppe. Vergrößerung 5fach, van Kossa-Färbung

Die histomorphometrische Untersuchung zeigte eine signifikante Abnahme der Knochendichte im Bereich des distalen Femurs für die Gruppen MET ($p < 0,001$) und HCY2% ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Knochendichte der Kontrollgruppe lag bei durchschnittlich $26,9\% \pm 1,6$. Im Vergleich dazu war die Knochendichte in der MET-Gruppe auf $14,85\% \pm 5,7$ reduziert, in der HCY2%-Gruppe sogar auf $2,48\% \pm 0,7$. Für die HCY1%-Gruppe ($30,47\% \pm 3,0$) und die VIT-Gruppe ($20,53\% \pm 4,5$) war die Abnahme der Knochendichte statistisch nicht signifikant.

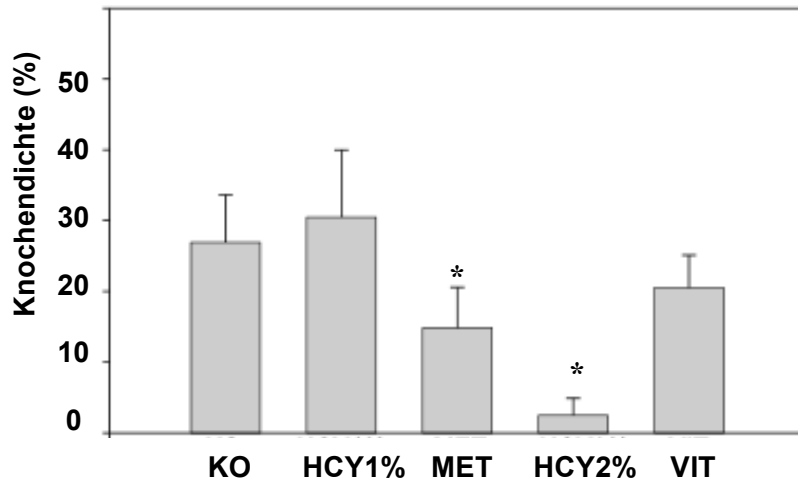


Abb. 19. Ergebnisse Knochendichte distaler Femur

KO= Kontrollgruppe, HCY1%= Homocystein1%, MET= Methionin, HCY2%= Homocystein 2%, VIT= Vitaminmangelgruppe, * p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle

Die Trabekelumfänge im Bereich des distalen Femurs zeigten eine signifikante Abnahme bei den Gruppen Methionin (p<0,001) und Homocystein 2% (p<0,001). Der Mittelwert der Trabekelumfänge lag in der Kontrollgruppe bei 48,8 $\mu\text{m} \pm 2,6$ und war in der MET-Gruppe auf 26,6 $\mu\text{m} \pm 4,0$ und in der Homocysteingruppe auf 4,5 $\mu\text{m} \pm 1,4$ erniedrigt. Die Gruppen HCY1% (48,9 $\mu\text{m} \pm 4,5$) und VIT (41,8 $\mu\text{m} \pm 2,8$) unterschieden sich nicht von der Kontrollgruppe.

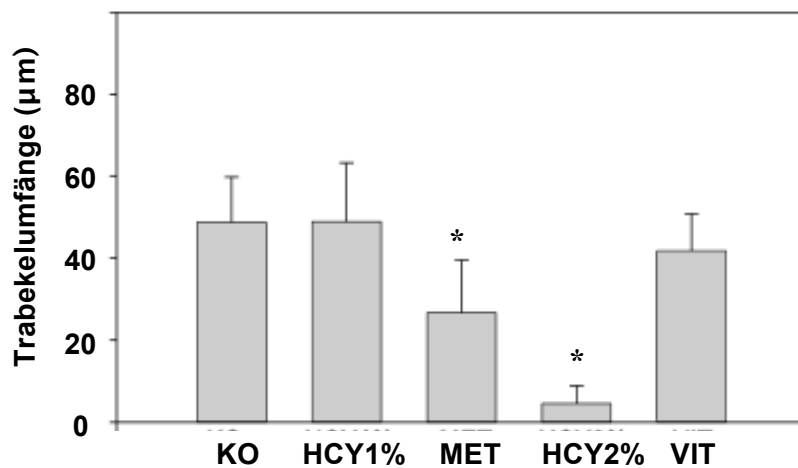


Abb. 20. Ergebnisse Umfang der Knochen trabekel distaler Femur

KO= Kontrollgruppe, HCY1%= Homocystein 1%, MET= Methionin, HCY2%= Homocystein 2%, VIT= Vitaminmangelgruppe, * p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle

Die Knochen trabekeldicke war einzig in der HCY2%-Gruppe signifikant reduziert ($p < 0,05$). Die mittlere Trabekeldicke lag in der HCY2%-Gruppe bei $0,07 \mu\text{m} \pm 0,03$, in der Kontrollgruppe bei $0,11 \mu\text{m} \pm 0,01$. In den Gruppen HCY1%, MET und VIT konnte kein Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden werden.

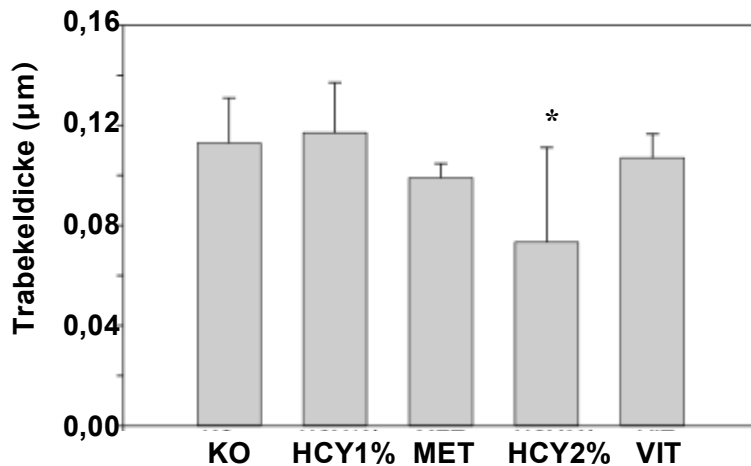


Abb. 21. Ergebnisse Knochen trabekeldicke distaler Femur

KO= Kontrollgruppe, HCY1%= Homocystein 1%, MET= Methionin, HCY2%= Homocystein 2%, VIT= Vitaminmangelgruppe, * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle

Die Messung der mittleren Anzahl der Knochen trabekel innerhalb der ROI ergab für die Kontrollgruppe einen Wert von $2,35 \pm 0,39$. In der MET-Gruppe war der Wert auf $1,51 \pm 0,60$ ($p < 0,001$) und in der HCY2%-Gruppe auf $0,26 \pm 0,24$ ($p < 0,001$) erniedrigt. In den Gruppen HCY1% ($2,57 \pm 0,46$) und VIT ($1,9 \pm 0,33$) ergab sich auch hier keine signifikante Änderung.

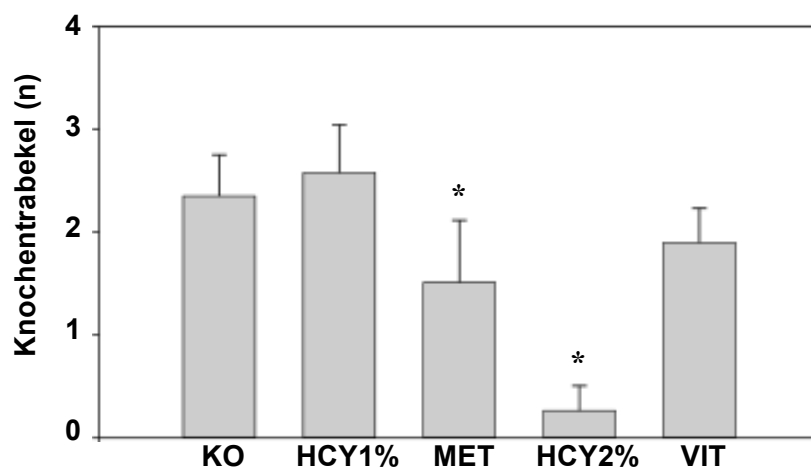


Abb. 22. Ergebnisse Anzahl der Knochen trabekel distaler Femur

KO= Kontrollgruppe, HCY1%= Homocystein 1%, MET= Methionin, HCY2%= Homocystein 2%, VIT= Vitaminmangelgruppe, * $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle

Die Abstände zwischen den Knochentrabekeln lagen in der Kontrollgruppe bei einem Wert von $0,32 \mu\text{m} \pm 0,09$. In der MET-Gruppe waren die Trabekelabstände auf $0,67 \mu\text{m} \pm 0,35$ verdoppelt ($p < 0,05$), in der HCY2%-Gruppe lag der Wert bei durchschnittlich $8,1 \mu\text{m} \pm 13,25$ ($p < 0,001$). Für die anderen Gruppen ergab sich keine Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

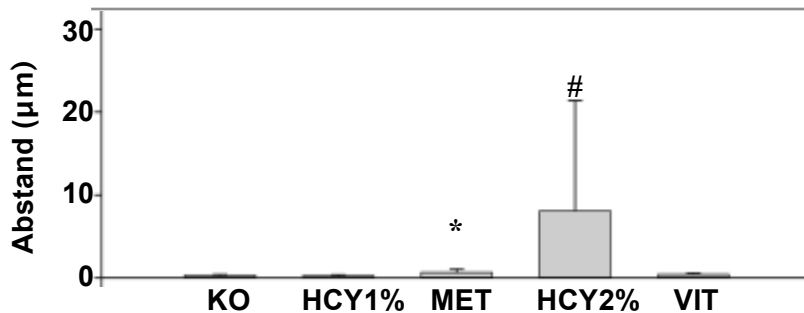


Abb. 23. Ergebnisse Abstand der Knochentrabekel distaler Femur

KO= Kontrollgruppe, HCY1%= Homocystein 1%, MET= Methionin, HCY2%=

Homocystein 2%, VIT= Vitaminmangelgruppe, * $p < 0,05$ # $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle

Bei der Auszählung der Anzahl jener Trabekel, welche mindestens 3 oder mehr Verzweigungspunkte hatten, ergab sich eine signifikante Abnahme bei den Gruppen MET ($p < 0,001$), HCY2% ($p < 0,001$) und VIT ($p < 0,006$). In der Kontrollgruppe lag der Mittelwert bei $17,4 \pm 5,95$. In der MET war er auf $8,20 \pm 5,53$, in der VIT auf $9,90 \pm 2,96$ und in der HCY2%-Gruppe auf $0,33 \pm 0,70$ verringert. In der HCY1%-Gruppe ($19,6 \pm 6,86$) konnte kein Unterschied gefunden werden.

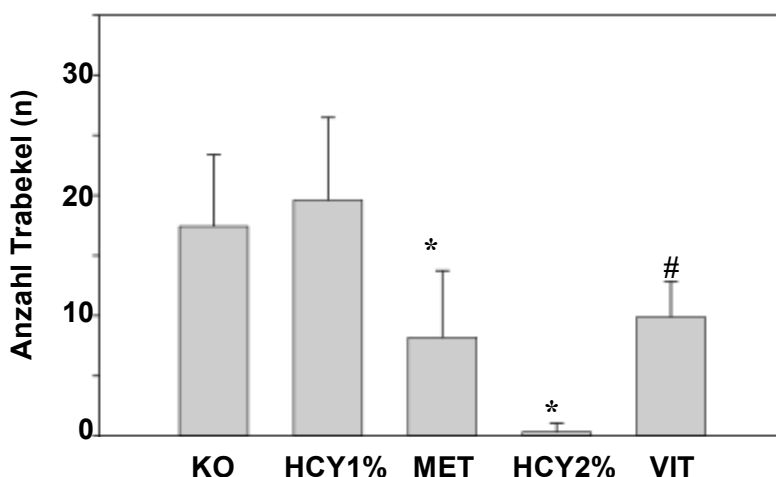


Abb. 24. Ergebnisse Trabekel mit >3 Verzweigungspunkten distaler Femur

KO= Kontrollgruppe, HCY1%= Homocystein 1%, MET= Methionin, HCY2%=

Homocystein 2%, VIT= Vitaminmangelgruppe, * $p < 0,001$, # $p = 0,006$ im Vergleich zur Kontrolle

Die Dicke der Wachstumsfuge war in der HCY2%-Gruppe signifikant vermindert ($p < 0,001$). In der Kontrollgruppe wurde eine mittlere Dicke von $0,15 \mu\text{m} \pm 0,02$ gemessen. In der HCY2%-Gruppe war die Dicke auf $0,10 \mu\text{m} \pm 0,01$ vermindert. Bei den anderen untersuchten Gruppen konnte keine Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden werden.

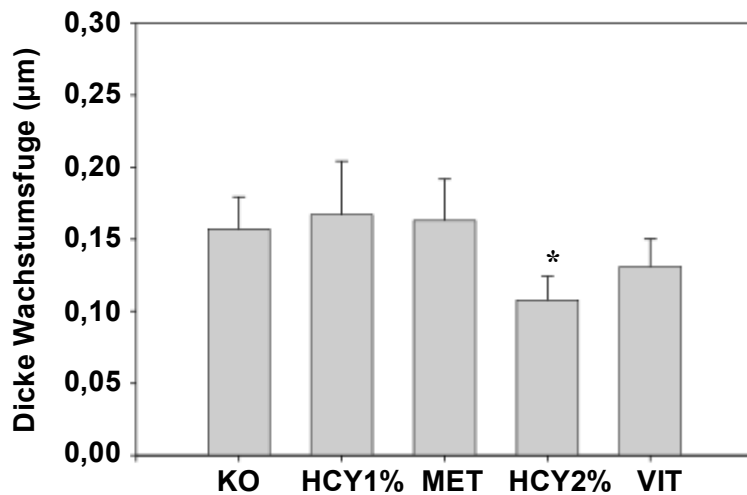


Abb. 25. Ergebnisse Dicke der Wachstumsfuge distaler Femur

KO= Kontrollgruppe, HCY1%= Homocystein 1%, MET= Methionin, HCY2%= Homocystein 2%, VIT= Vitaminmangelgruppe, * $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle

3.2 Collum femoris

Auch die Untersuchung am Collum femoris zeigte bereits eine makroskopisch sichtbare Reduktion der trabekulären Knochenstrukturen in den Gruppen MET und HCY2%.

In der MET-Gruppe war histologisch eine Ausdünnung der Knochen trabekel und damit eine Abnahme der Knochendichte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen. In der HCY2%-Gruppe war die Ausdünnung der Knochenspongiosa noch ausgeprägter zu sehen, zudem zeigte sich hier auch eine Verschmälerung der Kortikalis.

Insgesamt war die histologische Reduktion der trabekulären Knochenstrukturen nicht so stark ausgeprägt wie bei den Aufnahmen des distalen Femurs.

Abbildung 26 zeigt die bereits makroskopisch sichtbare Reduktion im Bereich des Collum femoris für die Gruppen MET und HCY2% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Aufnahmen der Gruppen HCY1% und VIT zeigten keinen Unterschied zur Kontrollgruppe und sind daher nicht gesondert abgebildet.

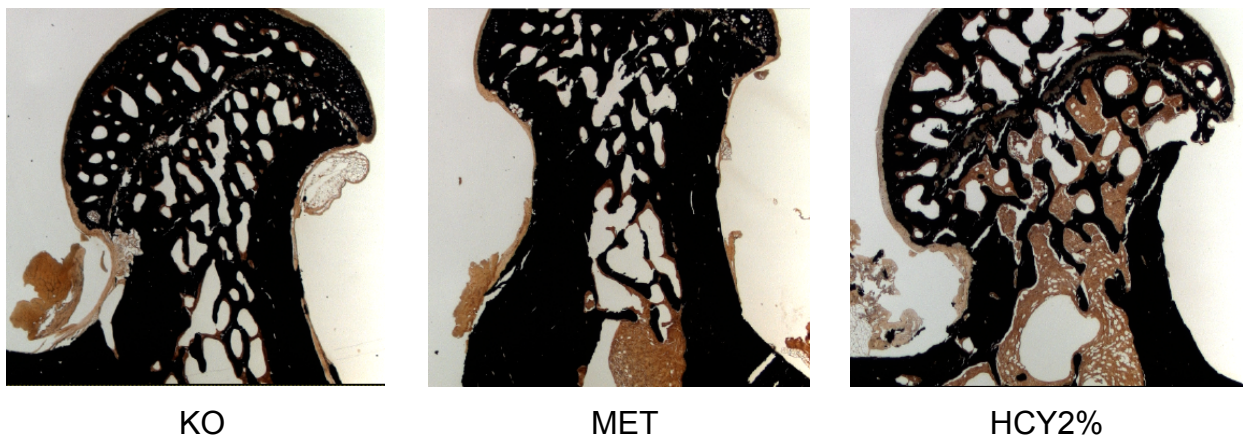


Abb. 26. Übersicht Schnittbilder Collum femoris.

KO= Kontrollgruppe, MET= Methionin-Gruppe, HCY2%= Homocystein 2%- Gruppe.

Vergrößerung 5-fach, van Kossa-Färbung

Die Messung der Knochendichte im Bereich des Collum femoris zeigte eine signifikante Abnahme der Knochendichte für die Gruppen MET ($p=0,016$) und HCY2% ($p<0,001$).

Die durchschnittliche Knochendichte lag in der KO-Gruppe bei $55,4\% \pm 6,53$, in der MET-Gruppe zeigte sich eine Verminderung auf $44,98\% \pm 6,2$, in der HCY2%-Gruppe

eine Reduktion auf $26,6\% \pm 10,55$. In der HCY1%- und in der VIT-Gruppe gab es keinen Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe.

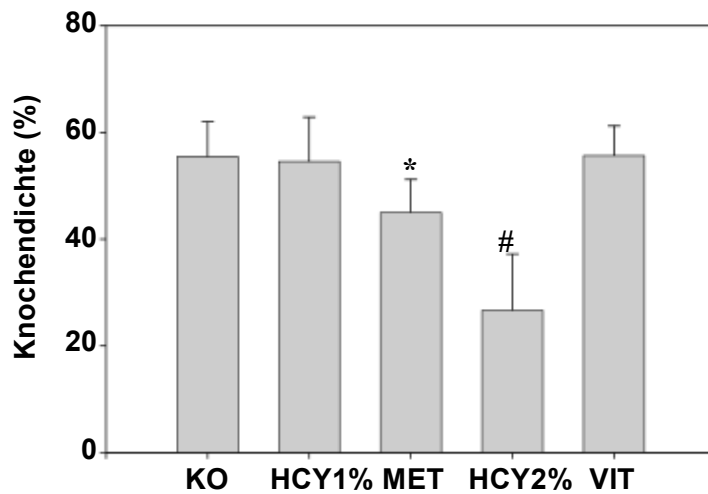


Abb. 27. Ergebnisse Knochendichte Collum femoris

KO= Kontrollgruppe, HCY1%= Homocystein 1%, MET= Methionin, HCY2%= Homocystein 2%, VIT= Vitaminmangelgruppe, * $p=0,016$, # $p<0,001$ im Vergleich zur Kontrolle

Bei der Umfangsmessung der Knochen trabekel im Bereich des Oberschenkelhalses zeigte sich lediglich für die HCY2%-Gruppe ($p=0,002$) eine signifikante Abnahme. Der Umfang wurde in der Kontrollgruppe mit durchschnittlich $14,56 \mu\text{m} \pm 2,79$ gemessen, in der HCY2%-Gruppe lag der Wert bei $9,28 \mu\text{m} \pm 3,61$. Für die anderen Gruppen konnte kein Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

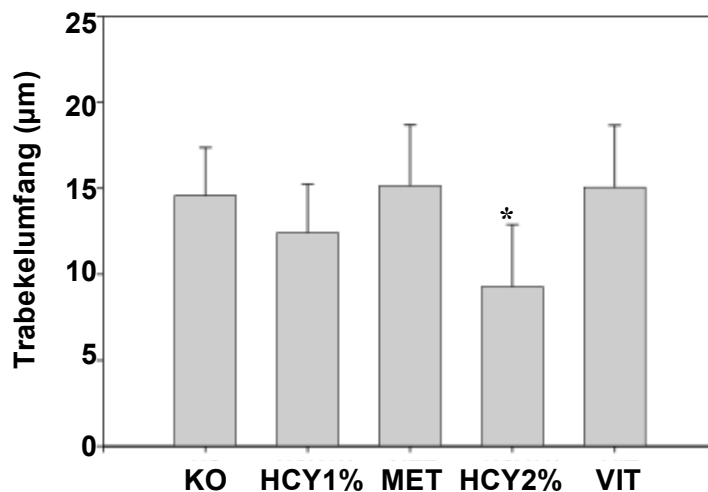


Abb. 28. Ergebnisse Umfang der Knochen trabekel Collum femoris

KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe, * $p=0,002$ im Vergleich zur Kontrolle

Die Knochen trabekeldicke war in keiner der Gruppen signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe.

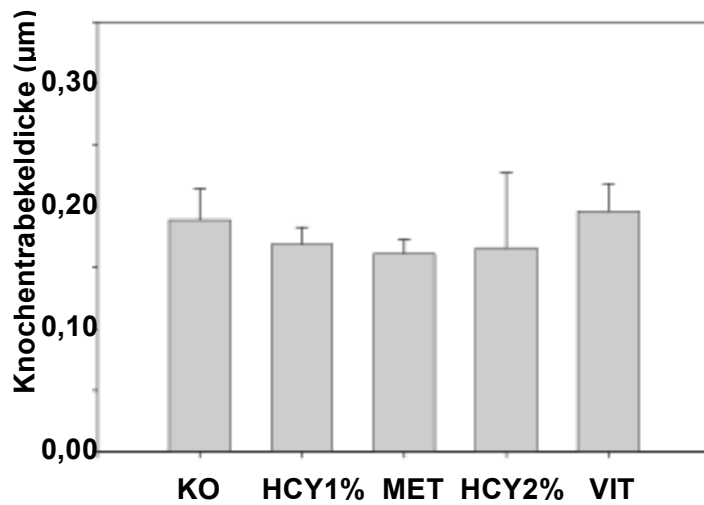


Abb. 29. Ergebnisse Knochen trabekeldicke Collum femoris

KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe

Die Anzahl der Knochen trabekel waren in der HCY2%-Gruppe signifikant reduziert (mittlere Anzahl $1,7 \pm 0,71$; $p < 0,001$). Für alle anderen Gruppen konnte kein Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ($2,96 \pm 0,22$) gefunden werden.

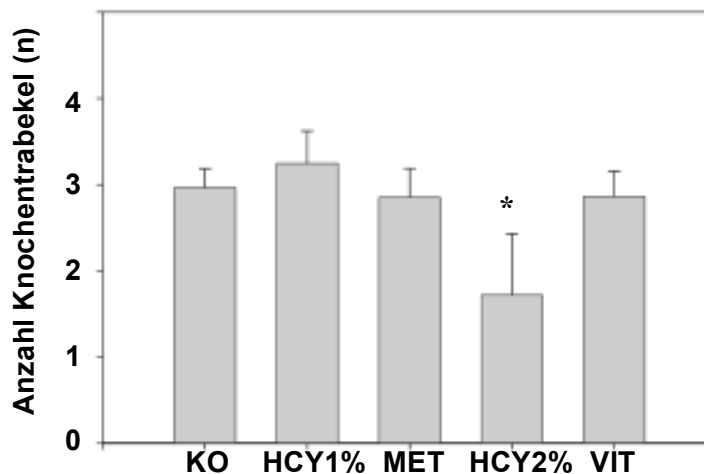


Abb. 30. Ergebnisse Anzahl der Knochen trabekel Collum femoris

KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe, * $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle

Die Abstände zwischen den Knochenstrabekeln im Bereich des Oberschenkelhalses zeigten in der HCY2%-Gruppe eine signifikante Zunahme ($p < 0,001$). In der Kontrollgruppe lag der mittlere Abstand bei $0,15 \mu\text{m} \pm 0,02$, in der HCY2%-Gruppe bei $0,54 \mu\text{m} \pm 0,33$. Bei den anderen Gruppen konnte kein Unterschied festgestellt werden.

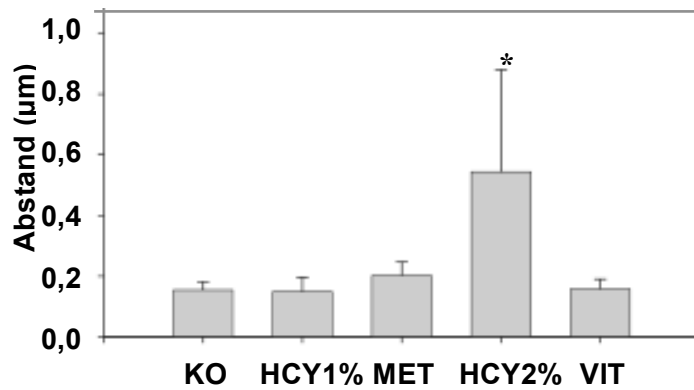


Abb. 31. Ergebnisse Abstände zwischen den Knochenstrabekeln Collum femoris

KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin,

HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe, * $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle

3.3 Wirbelkörper

Die Reduktion der trabekulären Knochenstrukturen war bei den Schnittbildern der Lumbalwirbelkörper am wenigsten stark ausgeprägt. Die folgenden histomorphometrischen Messungen zeigten lediglich in der HCY2%-Gruppe signifikante Veränderungen. Die Knochendichte im Bereich des Wirbelkörpers zeigte eine signifikante Abnahme in der HCY2%-Gruppe ($p < 0,001$). Für die anderen Gruppen konnte keine Abweichung im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden werden. Es zeigte sich eine Reduktion von $26,4\% \pm 7,07$ auf $14,6\% \pm 5,44$ in der HCY2%-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

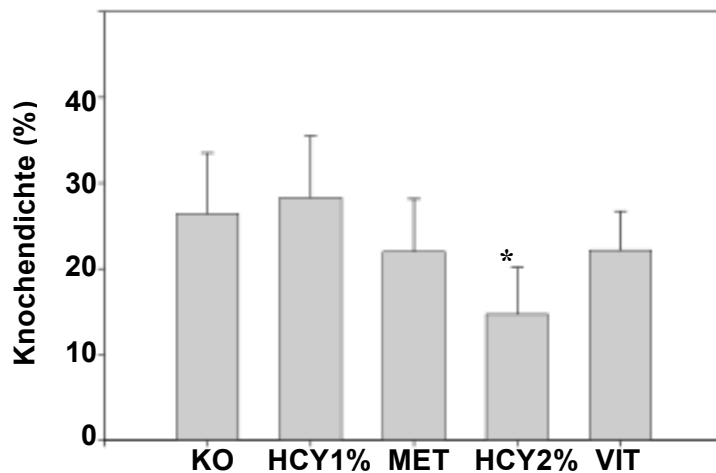


Abb. 32. Ergebnisse Knochendichte Wirbelkörper

KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe, * $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle

Auch bei der Messung des Umfangs der Knochen trabekel konnte lediglich für die HCY2%-Gruppe eine signifikante Reduktion gefunden werden ($p = 0,01$). Der durchschnittliche Umfang in der KO-Gruppe lag bei $44,08 \mu\text{m} \pm 8,61$, in der HCY2%-Gruppe war der Wert auf $31,60 \mu\text{m} \pm 12,05$ reduziert.

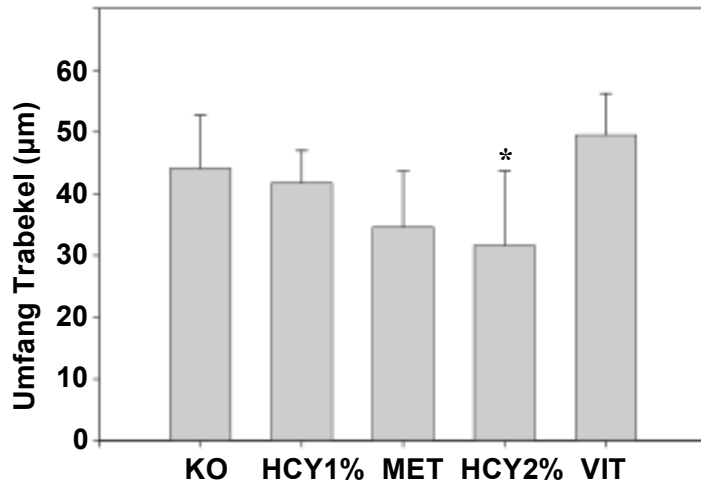


Abb. 33. Ergebnisse Umfang der Knochentrabekel Wirbelkörper

KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin,
 HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe, * p=0,01 im Vergleich zur Kontrolle

Die Knochentrabekeldicke war in keiner der Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verändert.

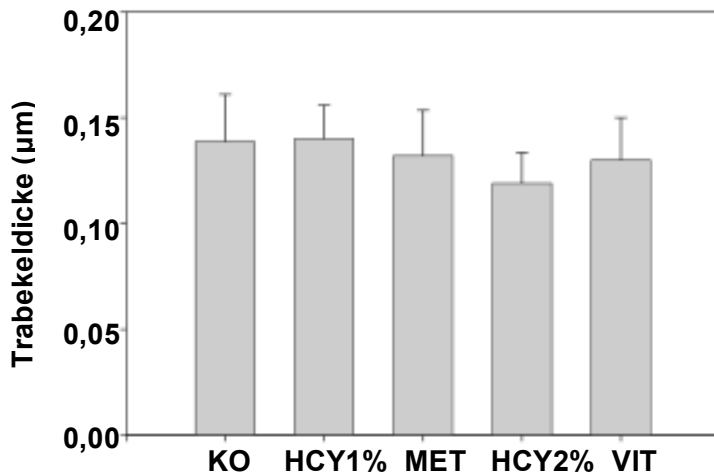


Abb. 34. Ergebnisse Knochentrabekeldicke Wirbelkörper

KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin,
 HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe

Die Anzahl der Knochentrabekel zeigte eine signifikante Abnahme in der HCY2%-Gruppe (p<0,001). Im Vergleich zur Kontrollgruppe (1,91 ± 0,27) lagen die Werte in der HCY2%-Gruppe bei 1,25 ± 0,39. Die anderen Gruppen unterschieden sich nicht von der Kontrollgruppe.

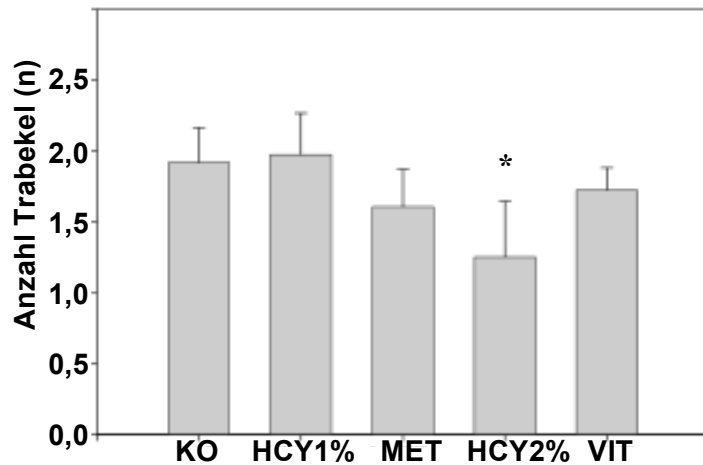


Abb. 35. Ergebnisse Anzahl der Knochentrabekel Wirbelkörper

KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe, * $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle

Auch bei der Messung der Abstände zwischen den Knochentrabekeln zeigte sich lediglich für die HCY2%-Gruppe ($0,77 \mu\text{m} \pm 0,32$; $p < 0,001$) eine signifikante Zunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe ($0,39 \mu\text{m} \pm 0,08$). Für die anderen Gruppen konnte kein Unterschied gefunden werden.

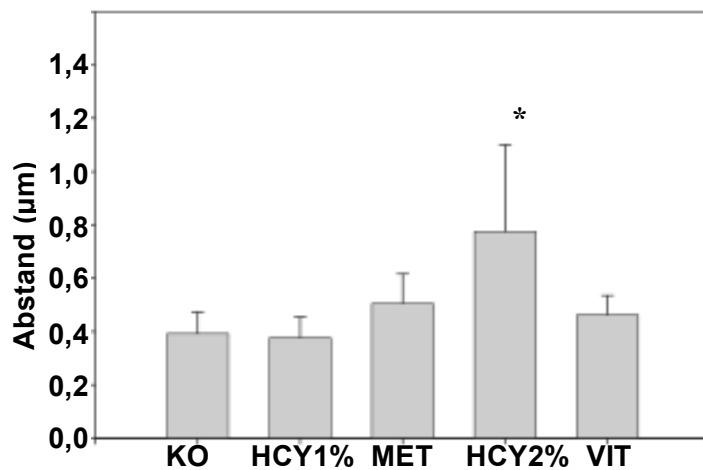


Abb. 36. Ergebnisse Abstände zwischen den Knochentrabekeln Wirbelkörper

KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe, * $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle

4. Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Homocystein auf die Knochenstruktur in einer tierexperimentellen Studie untersucht. Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass eine Hyperhomocysteinämie zu einer Abnahme der Knochendichte, sowie zu einer Reduktion der trabekulären Strukturen führt.

Es wurde ein Tiermodell etabliert und die Tiere wurden randomisiert und anschließend 12 Wochen lang durch die Zugabe von Homocystein 1 beziehungsweise 2%, die Zugabe von 2,4% Methionin oder einen kompletten Entzug der Vitamine Cobalamin und Pyridoxin behandelt. Bei allen Tieren lag der Blutkreatininwert am Ende des Behandlungszeitraums im Normalbereich, womit eine Nierenfunktionseinschränkung als mögliche Ursache einer HHCY ausgeschlossen werden konnte. Ebenso konnte eine Hypovitaminose als Confounder in den Homocystein- und Methioningruppen durch Bestimmung normwertiger Serum-Vitamin- und Folsäurespiegel ausgeschlossen werden.

Die Homocystein 1%-Gruppe entwickelte eine intermediäre HHCY (durchschnittlich 40,6 $\mu\text{mol/l}$ HCY), die Tiere der Homocystein 2%-Gruppe erreichten ebenfalls eine intermediäre HHCY (54,0 $\mu\text{mol/l}$ HCY). In anderen tierexperimentellen Arbeiten konnte eine vergleichbare HHCY durch Zufütterung von HCY induziert werden. So konnte durch eine kürzere Futterperiode von 10 Wochen und eine Zugabe von 0,9% HCY zum Futter bei Wistar-Ratten eine weniger stark ausgeprägte HHCY von 32,7 $\mu\text{mol/l}$ erreicht werden [99]. In der Methioningruppe wurde eine moderate HHCY (mittlerer Homocysteinwert: 27,28 $\mu\text{mol/L}$) gemessen. Vergleichbare Arbeiten konnten durch 12-wöchige Zufütterung von 1% Methionin eine HHCY von 16,17 $\mu\text{mol/l}$ [100] oder bereits durch 4-wöchige Zugabe von 1,7% Methionin zum Futter eine HHCY mit durchschnittlich 25,3 $\mu\text{mol/l}$ HCY auslösen [101]. Die erreichten Werte der HHCY scheinen von der Dosis und der Dauer der Zufütterung von HCY und Methionin abhängig zu sein. Die Vitaminmangelgruppe erreichte durch den Entzug der Vitamine Pyridoxin und Cobalamin durchschnittliche Homocysteinwerte von 8,5 $\mu\text{mol/L}$ und zeigte damit zwar eine Erhöhung im Vergleich zu den Ausgangswerten vor der Behandlung und im Vergleich zur Kontrollgruppe, lag mit diesem Wert aber noch im Homocysteinnormalbereich. Es ist anzunehmen, dass der gewählte Zeitraum von 12 Wochen für die Auslösung einer HHCY durch die alimentäre Hypovitaminose nicht

ausreichend lang war. In einem Mausmodell konnte durch zehnwöchigen Komplettentzug der Vitamine Cobalamin, Pyridoxin und Folsäure eine intermediäre HHCY (durchschnittlich 35,2 $\mu\text{mol/l}$ HCY) ausgelöst werden [102]. Möglicherweise bedingte hier das zusätzliche Fehlen von Folsäure den deutlicheren Anstieg der HCY-Werte. Zudem konnte bei Mausmodellen auch durch eine kürzere und weniger hoch dosierte Zufütterung von HCY eine stärkere HHCY ausgelöst werden, was für Methionin und HCY für eine stärker ausgeprägte Dosis-Wirk-Beziehung spricht [103]. 3 Tiere aus der Kontrollgruppe zeigten spontan erhöhte Homocysteinblutwerte (Plasma-HCY: 11-13 $\mu\text{mol/l}$). Bei normwertigen Blutwerten für Vitamin B12 und Folsäure könnte ein genetischer Polymorphismus oder eine leichte Nierenfunktionsstörung (mit noch normalen Serum-Kreatininwerten) ursächlich dafür sein. Zudem fanden sich in der HCY2%-Gruppe 2 Non-Responder-Tiere mit normalen Homocystein-Blutwerten. Möglicherweise lag bei diesen Tieren eine gestörte Homocystein-Aufnahme vor. Die 3 Tiere aus der Kontrollgruppe und die 2 Tiere aus der HCY2%-Gruppe wurden folglich von der Analyse ausgeschlossen. Nach der Tötung der Tiere erfolgte die Explantation der Femura und des ersten Lumbalwirbelkörpers. Die Auswahl dieser Knochen erfolgte, da auch beim Menschen die häufigsten osteoporose-assoziierten Frakturen die Lumbalwirbelkörper (vor allem Sinterungsfrakturen) und die hüftgelenksnahen Femura (vor allem petrochantäre und Schenkelhalsfrakturen) betreffen [91;92].

Bei den histologischen Untersuchungen zeigte sich eine deutliche Abnahme der Knochenstruktur bei den Tieren der Homocystein 2%-Gruppe und der Methionin-Gruppe. Diese bereits makroskopisch sichtbare Reduktion der Knochendichte zeigte sich auch in den weiteren histomorphometrischen Messergebnissen, am ausgeprägtesten in der Abnahme der Knochendichte. Die histomorphometrische Analyse zeigte vor allem für die Homocystein 2% und die Methionin-Gruppe eine massive Abnahme der Knochenspongiosa. Die deutlichste Reduktion war im Bereich des distalen Femurs messbar, aber auch im Bereich des Oberschenkelhalses und in den Lumbalwirbelkörpern zeigte sich eine signifikante Abnahme im Vergleich zur Kontrolle. In der Homocystein 1%-Gruppe konnte eine intermediäre HHCY und in der Vitaminmangelgruppe keine Homocysteinwerterhöhung erreicht werden. Bei den histomorphometrischen Messungen dieser beiden Gruppen zeigte sich keine Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine einmalige Ausnahme bestand bei

der Auszählung der Anzahl jener Trabekel, welche mindestens 3 oder mehr Verzweigungspunkte hatten. Hier ergab sich im Bereich des distalen Femurs eine Abnahme bei den Gruppen MET ($p < 0,001$), HCY2% ($p < 0,001$) und auch in der Vitaminmangelgruppe ($p < 0,006$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Da in der Vitaminmangelgruppe nur eine durchschnittliche HHCY von $8,5 \mu\text{mol/L}$ gemessen wurde, ist es nicht überraschend, dass messbare Veränderungen in der Knochenstruktur ausgeblieben sind. In einer anderen tierexperimentellen Studie wurden Ratten über 12 Wochen hinweg mit einer Folsäure- und Vitamin B12-freien Diät ernährt. Zusätzlich erhielten die Tiere Pectin und Succinylsulfathiazol, um eine unbeabsichtigte Cobalamin- und Folsäureaufnahme zu verhindern. Obwohl die Ratten eine intermediäre HHCY ausbildeten, zeigte sich keine Veränderung bei der anschließenden biomechanischen Testung, bei der histomorphometrischen Untersuchung oder bei der Messung der „Bone-Turnover-Marker“ Osteocalcin und C-terminal cross-linked telopeptides of Collagen Type I im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine Hypovitaminose führt somit trotz Ausbildung einer HHCY nicht zu einer Reduktion der Knochensubstanz [104].

Unerklärt ist die Tatsache, dass in der Homocystein 1%-Gruppe, trotz Ausbildung einer intermediären HHCY (durchschnittlich $40,6 \mu\text{mol/L}$ HCY), keine signifikante Änderung in der Knochenstruktur gemessen werden konnte. Ebenso unerklärt sind die ausgeprägten Effekte bei den Untersuchungen der MET-Gruppe im Vergleich zur HCY1%-Gruppe, in der bei keiner der Untersuchungen eine signifikante Änderung in der Knochenstruktur nachgewiesen werden konnte, obwohl in der MET-Gruppe nur eine moderate HHCY (mit durchschnittlich $27,28 \mu\text{mol/L}$ HCY) und in der HCY1%-Gruppe eine intermediäre HHCY ($40,6 \mu\text{mol/L}$ HCY) vorlagen. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte sein, dass hier keine einhundertprozentige Dosis-Wirkungs-Beziehung vorliegt, dass also schon geringere Mengen der Noxe Homocystein ausreichen um einen weitreichenderen Schaden zu verursachen. Zudem wäre ein toxischer Effekt des Methionins selbst oder eines anderen Futterbestandteils denkbar. Es ist bekannt, dass die Zufütterung größerer Mengen von Methionin toxische Effekte wie die Auslösung einer hämolytischen Anämie oder eine ausgeprägte Wachstumsretardierung, sowie eine reduzierte Futtermittelaufnahme der Tiere zur Folge haben kann [105]. Somit wäre es auch denkbar, dass Methionin additiv zu HCY zu einer Knochenschädigung führt.

Die Knochendichtereduktion in den Gruppen Methionin und HCY2% war derart ausgeprägt, dass dies bereits makroskopisch sichtbar war. Die Knochendichte beschreibt hauptsächlich die Knochen-Mineralisation und reflektiert nicht den aktuellen Status des Knochen-Metabolismus und bietet wenige Informationen über die Mikroarchitektur der organischen Knochenmatrix [100]. Die Messung der Knochendichte gilt aber als Goldstandard für die Diagnostik der Osteoporose und eine Abnahme der Knochendichte ist einer der stärksten Prädiktoren für zukünftige Frakturen [95]. Legt man die Annahme zugrunde, dass das Trabekelwerk des Knochens essentiell für die biomechanischen Eigenschaften ist [106;107], so bedeutet die Abnahme von Anzahl, Umfang und Dicke der Knochen trabekel einen Anstieg der Knochenfragilität und damit eine gesteigerte Frakturanfälligkeit.

Die deutliche Abnahme der trabekulären Knochenstrukturen in der Methionin- und in der HCY2%-Gruppe deutet auf einen HHCY-induzierten Shift des Knochenmetabolismus in Richtung Resorption hin. Verschiedene tierexperimentelle Studien stützen dies z.B. durch den Nachweis einer durch eine HHCY bedingten erhöhten Ausscheidung von Knochen-Resorptionsmarkern, wie N-terminal Collagen I-Telopeptide oder Hydroxyproline im Urin, durch eine Erniedrigung des „Knochenaufbaumarkers“ Osteocalcin im Serum oder eine Erhöhung der Ratio N-Terminal Collagen I Telopeptides/Osteocalcin [100]. Auch die Blutuntersuchungen dieser tierexperimentellen Studie zeigten eine signifikante Abnahme der Osteocalcin-Werte bei den Tieren der MET- und der HCY2%-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Messung der Collagen I C-terminal crosslaps (CTx) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen [108].

Vergleichbare Untersuchungen am Menschen zeigten eine Korrelation zwischen einer HHCY und der Ausscheidung von Desoxypyridinolin Cross Links (DPD) [109,110], Carboxyterminal Telopeptides of human Collagen-I (ICTP) [111] und Collagen-Crosslinks im Urin [109;110-112]. Keine Veränderung fand sich bei den Markern Osteocalcin, Osteoprotegrin und soluble activator of NFκ-B-Ligand (sRANKL) [100]. Die ergänzende Untersuchung dieser Marker in Serum und Urin könnte Gegenstand weiterer tierexperimenteller Arbeiten sein.

Mit den kontralateralen Femura der in dieser Studie verwendeten Ratten erfolgte eine biomechanische Testung (Prof. Claes, Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Universität Ulm). Dazu wurde auf die proximalen Femurknochen eine axiale Kompression ausgeübt. Es wurde die Kraft (F) gemessen, welche benötigt

wurde, um den Knochen im Bereich des Oberschenkelhalses zu brechen. Die Ergebnisse der biomechanischen Testung sind ebenfalls gut vergleichbar mit den Ergebnissen der Histomorphometrie. So war die aufgewendete Kraft (F) bei den Tieren der Homocystein 2%-Gruppe um 36%, bei den Tieren der Methionin-Gruppe um 18% erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle, was eine deutlich erhöhte Frakturneigung indiziert [108]. Eine Arbeit von Tomassini et al zeigte eine gute Korrelation zwischen der Knochenmorphologie und der Knochenqualität als Indikator für Stressfrakturen an menschlichen Tibiaknochen[106].

Es existieren verschiedene Erklärungsansätze, wie HCY auf die zellulären Strukturen des Knochens einwirkt. So wird vermutet, dass HCY über eine Aktivierung von Osteoklasten, die vermehrte Hemmung von Osteoblasten, eine Zunahme von oxidativem Stress, einen direkten Einfluss auf die extrazelluläre Knochenmatrix oder eine Abnahme der Knochendurchblutung zu einer Reduktion der Knochensubstanz führt [113]. HCY-Moleküle binden fest an Thiol- und Aminogruppen von Knochenmatrixproteinen. Die Knochenmatrix besteht überwiegend aus Kollagen Typ I und HCY bindet zum überwiegenden Teil an die extrazelluläre Matrix des Kollagens und führt dabei zu einer Reduktion der Festigkeit [114]. HCY inhibiert Lysyl-Oxidasen (Lox-Gene) und führt damit zu einer posttranslationalen Modifikation des Kollagens, was ebenfalls eine Reduktion der Knochenfestigkeit zur Folge hat [115].

Über eine HCY-vermittelte Methylierung von JAK-2, FLI-1 und DNMT-1 kommt es zu einer Stimulierung der Interleukin-6-Synthese in Osteoblasten und damit zu einer Beeinflussung der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten [116]. Zudem wirkt HCY direkt auf die Matrixmetalloproteinase (MMPs) von Osteoklasten und Osteoblasten ein. MMPs spielen eine wichtige Rolle beim Knochenumsatz, sowie bei Knochenreparatur und -umbauvorgängen. Entsprechend können Störungen bei den MMPs zu einer gestörten Knochenheilung führen [117]. Abbildung 37 zeigt schematisch wie HCY durch eine Bindung an den NMDA-Rezeptor zu einer vermehrten Kalzium-Aufnahme [119] und damit zu einem Calpain-1-vermittelten Anstieg von radikalen Sauerstoffspezies (ROS) und damit zu einer Aktivierung von MMPs führt. Auch die durch HCY induzierte verminderte Expression des PPAR- γ -Rezeptors vermittelt eine ROS-Zunahme durch eine Aktivierung der Superoxid-Dismutase und Katalase, sowie eine Reduktion der NAD/NADPH-Oxydase [121] und führt damit zu einer Aktivierung der MMPs und

vermehrtem oxidativen Stress [118]. Die Folge ist eine Störung der Kollagen-Quervernetzung [117], sowie eine vermehrte Knochenresorption [120].

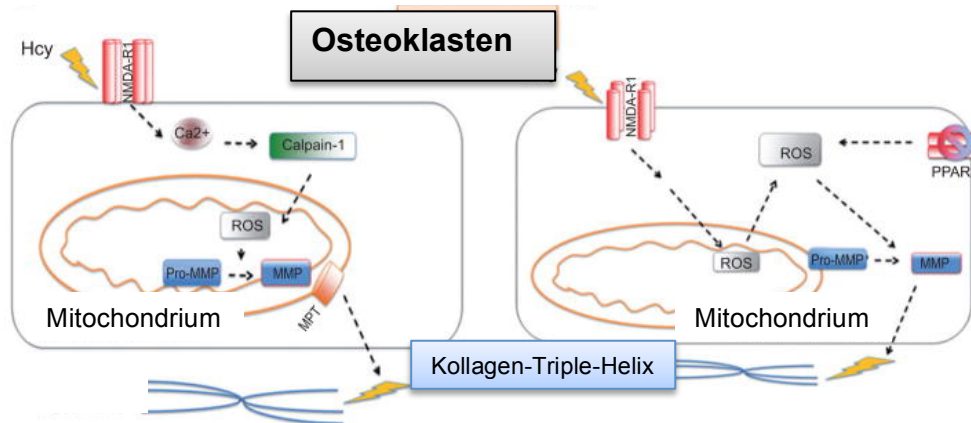


Abb. 37 Bindung von Homocystein an NMDA-R1- und PPAR-Rezeptoren [117]

HCY= Homocystein; ROS= Reaktive Sauerstoffspezies, MMP= Matrixmetalloproteinasen

Der Einfluss von HCY auf Kaspasen und mitochondriales Cytochrom C führt zu vermehrten Apoptosen von human bone Marrow Stoma Cells (hbMSC) und Osteoblasten und damit zu einem gestörten Knochenaufbau [122].

Durch ein Einwirken auf die Bioverfügbarkeit von Stickstoff (NO) in den Gefäßwänden kommt es zu einer Abnahme der Knochendurchblutung und damit zu einem Entzug wichtiger Knochennährstoffe [123,124]. In einer Untersuchung an Ratten konnte mittels Messung durch einen Laser Doppler Flow Meter ein signifikant erniedrigter Blutfluss in der Tibia bei den Tieren mit einer Hyperhomocysteinämie im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden (0,51 versus 0,78 Units) [124]. Eine HHCY hat auch einen störenden Einfluss auf die Frakturheilung. So zeigte eine Untersuchung an Mäusen mit einer HHCY (induziert durch die Zugabe von 1,5% HCY zum Futter) eine signifikante Reduktion der Biegefestigkeit des Knochenkallus 4 Wochen nach erfolgter Femurschaftfraktur. Keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden beim Kallusdurchmesser und bei der Zusammensetzung des Kallus gefunden [103]. Eine ähnliche Untersuchung an Mäusen, welche eine HHCY durch die Zugabe von 2,5% Methionin zum Futter entwickelten, zeigte keinen Unterschied bei der biomechanischen

(Biegefestigkeit) und der histomorphometrischen Untersuchung (Kallusdurchmesser und Gewebezusammensetzung) der Knochen im Vergleich zur Kontrollgruppe [126]. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich Homocystein im gesunden Knochengewebe anreichert. Die gemessenen HCY-Konzentrationen im Knochengewebe waren bis zu 20-fach erhöht und das HCY war zu 65% an Kollagen gebunden. Die HCY-Akkumulation in den Knochen der Tiere war mit einer deutlichen Abnahme der Knochendichte (gemessen mittels Histomorphometrie und Mikro-CT), einer Reduktion der Festigkeit (Biomechanik) und einer Abnahme des Osteocalcins vergesellschaftet [127].

Einen Zusammenhang zwischen einer Hyperhomocysteinämie und dem Auftreten osteoporotischer Frakturen beim Menschen wurde bereits in mehreren großen epidemiologischen Studien beschrieben. So konnte in der „Longitudinal Aging Study Amsterdam“ (LASA) und der „Rotterdam Study“ an über 2400 Personen gezeigt werden, dass das Gesamtrisiko für eine Fraktur mit der Zunahme der Homocysteinkonzentration um das 1,4-fache steigt [1]. Vergleichbare Ergebnisse zeigte die Auswertung von mehr als 1800 Personen in der „Framingham Study“: Männliche Probanden mit einem Homocystein-Mittelwert von 13,4 $\mu\text{mol/l}$ wiesen ein multivariat adjustiertes Risiko von 2,07 für eine Fraktur auf. Bei einem Homocystein-Mittelwert von 20,8 $\mu\text{mol/l}$ stieg dieser Wert auf 3,84 an. Für Frauen zeigte sich dieser Zusammenhang weniger stark: bei einem Homocystein-Mittelwert von 18,6 $\mu\text{mol/l}$ ergab sich ein Risiko von 1,92 [2]. Weitere Untersuchungen an 433 Schlaganfall-Patienten zeigte, dass die altersadjustierte Inzidenz für eine Beckenfraktur pro 1000 Personenjahre von 2,89 in der niedrigsten auf 27,9 in der höchsten HCY-Quartile anstieg [128]. Kontroverse Ergebnisse erbrachte eine Untersuchung aus Frankreich an 671 Frauen mit einem durchschnittlichen Alter von $62,2 \pm 9$ Jahren und einem Follow-up von 10 Jahren. Hier wurde nach Altersadjustierung kein Zusammenhang zwischen dem HCY-Level und der Inzidenz von Frakturen und auch keine Assoziation zwischen HCY und der Messung der Knochendichte (gemessen mittels Dual X-ray-Absorptiometrie = DXA) sowie der Bestimmung des Serum-Osteocalzin und CTx gefunden [129]. Eine Untersuchung aus Schweden an 996 Frauen mit einem durchschnittlichen Alter von 75 Jahren zeigte eine Korrelation zwischen HCY und erhöhten Serumwerten von Osteocalcin und C-terminal cross-linked telopeptides of type I Collagen und einer erhöhten Urinausscheidung von Desoxypyridinolen. Zudem wurde mittels DXA eine Verminderung der Knochendichte im Bereich von Collum femoris und Trochanter

gemessen, nicht aber im Bereich der Lumbalwirbelkörper. Und es fand sich keine Korrelation zu einer erhöhten Frakturneigung [130]. Eine Untersuchung an 460 Koreanern zeigte eine signifikante Abnahme der Knochendichte (gemessen mittels DXA) lediglich bei prämenopausalen Frauen (Altersdurchschnitt 45,6 Jahre \pm 3,5) mit einer HHCY. Bei postmenopausalen Frauen (Altersdurchschnitt 55,6 Jahre \pm 6,2) konnte hingegen keine Reduktion der Knochendichte in allen HCY-Gruppen gefunden werden [131]. Diesen epidemiologischen Studien ist gemeinsam, dass sie die Ursachen nicht untersuchen können und dass sowohl die Anzahl der Studienteilnehmer, als auch die Ein- und Ausschlusskriterien das Studienergebnis beeinflussen können. Tierversuchsstudien hingegen bieten die Möglichkeit den Einfluss einzelner Variablen bei sonst Gesunden mit den gleichen Grundcharakteristiken zu untersuchen. Zudem erfolgte in den Studien eine Knochendichtemessung mittels Dual X-ray-Absorptiometrie, diese in Vivo-Messung ist sehr schwer mit der histomorphometrischen Messung an explantierten Knochen vergleichbar.

Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um den Einfluss des Homocysteins auf die Mikroarchitektur des Knochens besser zu verstehen. Denkbar wären Untersuchungen, welche den Einfluss einer HHCY auf Knochenmatrixproteine aufzeigen, wie Osteonectin, welches einen Einfluss auf die Funktion von Osteoblasten zu haben scheint [132], Osteopontin, was unter anderem in den Lakunen der Osteozyten vorkommt [132] und Kollagen Typ I [133]. Auch der Einfluss von HCY auf den Wnt-Signalweg mit β -Catenin als terminalen Effektor könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein [134]. Über diesen Signalweg werden die osteogene Differenzierung pluripotenter mesenchymaler Stammzellen, die Bildung einer mineralisierten Matrix durch reife Osteoblasten und die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten reguliert [135].

5. Zusammenfassung

Die nichtproteinogene Aminosäure Homocystein entsteht als Endprodukt des Methioninstoffwechsels. Genetische Ursachen, beispielsweise eine Dysfunktion oder ein Fehlen der Enzyme Methylen tetrahydrofolatreduktase, Cystathion- β -Synthase oder Methioninsynthase können eine schwere Hyperhomocysteinämie zur Folge haben. Ebenfalls kann ein Mangel der Vitamine Cobalamin, Pyridoxin oder Folsäure, die Einnahme verschiedenster Medikamente oder der Konsum von Kaffee, Alkohol oder Zigaretten zu einer Erhöhung des Homocysteinspiegels führen. Die Hyperhomocysteinämie wird beim Menschen in moderat ($<30 \mu\text{mol/l}$), intermediär ($31-100 \mu\text{mol/l}$) und schwer ($>100 \mu\text{mol/l}$) eingeteilt [5].

Eine Hyperhomocysteinämie wirkt atherogen mit der Folge eines gehäuftens Auftretens von Myokardinfarkten und Schlaganfällen. Über eine Aktivierung des Gerinnungssystems wirkt Homocystein thrombogen, durch demyelinisierende und direkt neurotoxische Einflüsse wird die Entstehung dementieller Erkrankungen begünstigt, beziehungsweise beschleunigt.

2004 wurden durch van Meurs und Mc Lean 2 Studien veröffentlicht, welche einen Zusammenhang zwischen moderat erhöhten Homocystein-Werten und einem erhöhten Risiko für die Entstehung osteoporotischer Frakturen zeigten [89;90].

Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit war es, durch die Zufuhr von Homocystein, Methionin oder den Entzug der Vitamine Pyridoxin und Cobalamin eine Hyperhomocysteinämie herbeizuführen und mittels histomorphometrischer Ausmessung mögliche Veränderungen im Knochen nachzuweisen.

Nach 12-wöchiger alimentärer Behandlung wurde in der Methionin-Gruppe eine moderate Hyperhomocysteinämie, in den beiden Homocystein-Gruppen (1 beziehungsweise 2 %) eine intermediäre Hyperhomocysteinämie nachgewiesen. In der Vitaminmangelgruppe lagen die Homocysteinwerte im Normalbereich. Nach Aufarbeitung der Rattenknochen (distaler Femur, Collum femoris und Lumbalwirbelkörper) erfolgte die histomorphometrische Auswertung.

Im Bereich des distalen Femurs kam es zu einer signifikanten Abnahme der Knochendichte in der Methionin-Gruppe auf 14,85% (Kontrollgruppe: 26,9%), in der Homocystein 2%-Gruppe wurde ein Wert von 2,48% erreicht. Auch der Umfang und die Anzahl der Knochen trabekel waren in den Gruppen Methionin und Homocystein 2%

signifikant reduziert und die Abstände zwischen den Knochen trabekeln in diesen Gruppen signifikant erhöht. Eine Reduktion der Anzahl an Knochen trabekeln mit mindestens 3 Verzweigungspunkten fand sich in der Methionin-, der Homocystein 2%- und der Vitaminmangelgruppe. Eine Reduktion der Dicke der Wachstumsfuge, sowie eine signifikante Abnahme der Knochen trabekeldicke zeigte sich nur in der Homocystein 2%-Gruppe.

Bei den Präparaten des Collum femoris kam es ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme der Knochendichte in der Methioningruppe auf 44,9% (Vergleich Kontrollgruppe 55,4%) und in der Homocystein 2%-Gruppe auf 26,6%. Bei den Parametern Umfang der Knochen trabekel, Anzahl der Knochen trabekel und Abstände zwischen den Knochen trabekeln kam es nur in der Homocystein 2%-Gruppe, bei der durchschnittlichen Knochen trabekeldicke in keiner der Gruppen zu einer signifikanten Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Ausmessung der Lumbalwirbelkörper zeigte bei der Knochendichtemessung lediglich in der Homocystein 2%-Gruppe eine signifikante Reduktion auf 14,4% (Vergleich Kontrollgruppe: 26,4%). Auch für die Parameter Umfang der Knochen trabekel, Anzahl der Knochen trabekel und Abstände zwischen den Knochen trabekeln gab es lediglich in der Homocystein 2%-Gruppe signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch hier kam es bei der Messung der durchschnittlichen Knochen trabekeldicke in keiner der Gruppen zu einer signifikanten Änderung.

Obwohl Ergebnisse aus Tierversuchen nicht direkt auf den Menschen übertragen werden können, zeigt die Untersuchung, dass eine Hyperhomocysteinämie zu einer deutlichen Reduktion der Knochendichte und -struktur führt. Legt man die Annahme zugrunde, dass das Trabekelwerk des Knochens essentiell für die biomechanischen Eigenschaften ist, bedeutet die Abnahme der Knochen trabekel auch einen Anstieg der Knochenfragilität und damit eine gestiegene Frakturanfälligkeit. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um gerade die zellulären Effekte einer Hyperhomocysteinämie als Ursache einer Knochendichtereduktion näher zu beleuchten. So könnte der Einfluss von Homocystein auf Osteonectin, Osteopontin oder den wnt-Signalweg Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

6. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Strukturformel Homocystein (aus Stanger O: *Homocystein: Grundlagen, Klinik, Therapie, Prävention*. Verlag Wilhelm Maudrich, Wien/München/Bern 2004)
- Abb. 2:** Homocystein-Stoffwechsel (aus Stanger O *et al.* Journal für Kardiologie 2003; 10(5):190-199 [4])
- Abb. 3:** Architektur des Knochens (nach National Cancer Institute, Seer Training Modules;https://training.seer.cancer.gov/module_anatomy/unit3_2_bone_tissue.html); Stand: 02.04.2014
- Abb. 4:** Vergleich eines gesunden Knochens mit einem osteoporotischen Knochen, Quelle: <http://www.scinexx.de/wissen-aktuell-bild-8463-2008-07-03-11101.html>; ETH-Zürich; Stand:02.02.2014
- Abb. 5:** fertiges Schnittpräparat mit den Komponenten Technovit®9100 und Technovit® 3140
- Abb. 6:** Arbeit am Mikrotom, Entnahme eines 6 µm-Schnittpräparats
- Abb. 7:** Schnittebenen distaler Femur, Collum femoris, Wirbelkörper, Ratte, Vergrößerung 5fach, Färbung nach van Kossa
- Abb. 8:** Ausrichtung der ROI Wirbelkörper, Ratte, Vergrößerung 5-fach, Färbung nach van Kossa
- Abb. 9:** Ausrichtung ROI distaler Femur, Ratte, Vergrößerung 5-fach, Färbung nach van Kossa
- Abb. 10:** Ausrichtung ROI Collum femoris, Ratte, Vergrößerung 5-fach, Färbung nach van Kossa

- Abb. 11:** Bestimmung der Knochendichte als Knochenanteil an der Gesamtpräparatefläche innerhalb der Region of Interest (ROI), Ratte, Vergrößerung 5-fach, Färbung nach van Kossa
- Abb. 12:** Bestimmung TbPerimeter = Umfang der Knochentrabekel innerhalb der Region of Interest (ROI), Ratte, Vergrößerung 5-fach, Färbung nach van Kossa
- Abb. 13:** Bestimmung TbThickness = Knochentrabekeldicke innerhalb der Region of Interest (ROI), Ratte, Vergrößerung 5-fach, Färbung nach van Kossa
- Abb. 14:** Bestimmung TbNumber = Anzahl der Knochentrabekel innerhalb der Region of Interest (ROI), Ratte, Vergrößerung 5-fach, Färbung nach van Kossa
- Abb. 15:** Bestimmung TbSeparation = Abstände zwischen den Knochentrabekeln innerhalb der Region of Interest (ROI), Ratte, Vergrößerung 5-fach, Färbung nach van Kossa
- Abb. 16:** Auszählung der Anzahl der Knochentrabekel mit mindestens 3 Verzweigungspunkten innerhalb der Region of Interest (ROI), Ratte, Vergrößerung 5-fach, Färbung nach van Kossa
- Abb. 17:** Markierung der Wachstumsfuge, Ratte, distaler Femur, Vergrößerung 5-fach, Färbung nach van Kossa
- Abb. 18:** Übersicht Schnittbilder distaler Femur, Vergrößerung 5-fach, Färbung nach van Kossa, KO = Kontrollgruppe, MET = Methionin-Gruppe, HCY2% = Homocystein 2%-Gruppe

- Abb. 19:** Ergebnisse Knochendichte distaler Femur, KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%-Gruppe, MET = Methionin-Gruppe, HCY2% = Homocystein 2%-Gruppe, VIT = Vitaminmangelgruppe
- Abb. 20:** Ergebnisse Umfang der Knochen trabekel distaler Femur, KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe
- Abb. 21:** Ergebnisse Knochen trabekeldicke distaler Femur, KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe
- Abb. 22:** Ergebnisse Anzahl der Knochen trabekel distaler Femur, KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe
- Abb. 23:** Ergebnisse Abstände zwischen den Knochen trabekeln distaler Femur, KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe
- Abb. 24:** Ergebnisse Anzahl der Knochen trabekel mit mind. 3 Verzweigungspunkten distaler Femur, KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe
- Abb. 25:** Ergebnisse Dicke der Wachstumsfuge distaler Femur, KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe
- Abb. 26:** Übersicht Schnittbilder Collum femoris, Vergrößerung 5-fach, Färbung nach van Kossa, KO = Kontrollgruppe, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%

- Abb. 27:** Ergebnisse Knochendichte Collum femoris, KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe
- Abb. 28:** Ergebnisse Umfang Knochen trabekel Collum femoris, KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe
- Abb. 29:** Ergebnisse Knochen trabekeldicke Collum femoris, KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe
- Abb. 30:** Ergebnisse Anzahl Knochen trabekel Collum femoris, KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe
- Abb. 31:** Ergebnisse Abstände zwischen den Knochen trabekeln Collum femoris, KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe
- Abb. 32:** Ergebnisse Knochendichte Wirbelkörper KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe
- Abb. 33:** Ergebnisse Umfang Knochen trabekel Wirbelkörper KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe
- Abb. 34:** Ergebnisse Knochen trabekeldicke Wirbelkörper KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe

Abb. 35: Ergebnisse Anzahl Knochen trabekel Wirbelkörper KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe

Abb. 36: Ergebnisse Abstände zwischen den Knochen trabekeln Wirbelkörper KO = Kontrollgruppe, HCY1% = Homocystein 1%, MET = Methionin, HCY2% = Homocystein 2%, VIT = Vitaminmangelgruppe

Abb. 37: Bindung von Homocystein an NMDA-R1- und PPAR-Rezeptoren
HCY= Homocystein; ROS= Reaktive Sauerstoffspezies, MMP= Matrixmetalloproteinasen [117]

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Hyperhomocysteinämien nach Homocystein-Serumkonzentrationen nach Kang *et al* [5].

Tabelle 2: Gruppenaufteilung der Tiere nach Randomisierung

Tabelle 3: Verarbeitungsschema Technovit® 9100 NEU

Quelle: Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Kulzer, Wehrheim, Deutschland

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BMD	Bone Mineral Density
CBS	Cystathionin-β-Synthase
CYS	Cystathionin
DACH	D.A.C.H.-Liga Homocystein (Deutschland-Österreich-Schweiz)
dest.	destilliert
dist.	distal
DPD	Desoxypyridinolin Crosslinks
HCY	Homocystein
HCY1%	Homocystein 1%-Gruppe
HCY2%	Homocystein 2%-Gruppe
HHCY	Hyperhomocysteinämie
ICTP	Carboxyterminal Telopeptides of Human Collagen I
KO	Kontrollgruppe
LASA	Longitudinal Aging Study Amsterdam
LDL	Low Density Lipoprotein
MET	Methionin-Gruppe
MMP	Metalloproteinasen
MTHFR	Methylentetrahydrofolatreduktase
NO	Stickstoffmonoxid
ROI	Region of Interest
ROS	Radikale Sauerstoffspezies
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
Tab.	Tabelle
TAr	Total Area
TBAr	Total Bone Area
TBDn	Total Bone Density
TBNum	Trabecular Bone Number
TBPm	Trabecular Bone Perimeter

TBSep	Trabecular Bone Separation
TBTh	Trabecular Bone Thickness
THF	Tetrahydrofolat
VIT	Vitaminmangelgruppe

9. Literaturverzeichnis

- [1] vanMeurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM et al. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med* 2004; 350:2033-41
- [2] McLean RR, Jacques PF, Selhub J et al. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Engl J Med* 2004; 350:2042-9
- [3] Chiang PK, Gordon RK, Tal J et al. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J* 1996; 10: 471-480
- [4] Selhub J. Homocysteine Metabolism. *AnRevNutr* 1999; 19:217-246
- [5] Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *EuJPed* 1998; Suppl 12: S40-44
- [6] Stanger O et al. *Journal für Kardiologie* 2003; 10(5):190-199
- [7] Still RA, McDowell IF. Clinical implications of plasma homocysteine measurement in cardiovascular disease. *JClin Pathol* 1998;51:183-88
- [8] Refsum H, Fiskerstrand T, Guttormsen AB, Ueland PM. Assessment of homocysteine status. *J Inherit Metab Dis* 1997;20:286-94
- [9] Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K et al. DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin Chem Lab Med.* 2003 Nov;41(11):1392-403.
- [10] Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *AnRevNutr* 1992;12:279-98

- [11] Ward M, McNulty H, McPartlin J, Strain JJ, Weir DG, Scott JM. Plasma homocysteine, a risk factor for cardiovascular disease, is lowered by physiological doses of folic acid. *QJM* 1997;90:519-524
- [12] Brouwer IA, Van Dusseldorp M, Thomas CMG et al. Low-dose folic acid supplementation decreases plasma homocysteine concentrations: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 1999b;69:99-104
- [13] Brattstrom L, Landgreen F, Israelsson B et al. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *Br Med J* 1998a;316:894-898
- [14] Olszewski AJ, Szostak WB, Bialkowska M, Rudnicki S, McCully KS. Reduction of plasma lipid and homocysteine levels by pyridoxine, folate, cobalamin, choline, riboflavin and troxerutin in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1989; 75:1-6
- [15] Ubbink JB, van der Merwe A, Vermaak WJ, Delport R. Hyperhomocysteinemia and the response to vitamin supplementation. *J Clin Invest* 1993;71:993-998
- [16] Ubbink JB, van der Merwe A, Delport R et al. The effect of a subnormal vitamin B₆-status on homocysteine metabolism. *J Clin Invest* 1996;98:177-184
- [17] Wald DS, Bishop L, Wald NJ et al. Randomized trial of folic acid supplementation and serum homocysteine levels. *Arch Intern Med* 2001;161:695-700
- [18] Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolat reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991;48:536-545
- [19] Frosst P, Blom HJ, Milos R et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolat reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-113

- [20] Engbersen AMT, Franken DG, Boers GHJ et al. Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolat reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet* 1995;56:142-150
- [21] Kluitmans LA, van den Heuvel LP, Boers GHJ et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: A common mutation in the Methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996;58:35-41
- [22] Blom HJ. Mutated 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and moderate hyperhomocysteinaemia. *Eur J Pediatr* 1998;157[Suppl 2]:S131-S134
- [23] Kraus JP. Molecular basis of phenotype expression in homocystinuria. *J Inherit Metb Dis* 1994;17:383-390
- [24] Mudd SH, Skovby F, Levy HL et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985;37:1-31
- [25] Mudd SH, Levy HI, Scovby F. Disorders of transsulfation In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D(eds). *The metabolic bases of inherited disease*. 7th edition. McGraw-Hill. New York pp 693-734/1279-1327
- [26] Lecler D, Campeau E, Goyette P et al. Human methionine synthase: cDNA Cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet* 1996;5:1867-74
- [27] Wilson A, Platt R, Wu Q et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B₁₂) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab* 1999;67:317-23
- [28] De Franchis R, Sperandeo MP, Sebastio G, Andria G. Clinical aspects of cystathionine β -synthase deficiency: how wide is the spectrum? *Eur J Pediatr* 1998;157[Suppl 2]:S67-S70

- [29] Durand P, Prost M, Loreau N, Lussier-Cacan S, Blache D. Impaired Homocysteine Metabolism and Atherothrombotic Disease. *Lab Invest* 2001;81(5):645-672
- [30] Ubbink JB, Delport R, Becker PJ, Bissbort S. Evidence of a Theophylline-Induced Vitamin B6-Deficiency Caused by Noncompetitive Inhibition of Pyridoxal-Kinase. *J Lab Clin Med* 1989; 113: 15-22
- [31] Christensen B, Guttormsen AB, Schneede J et al. Preoperative Methionine Loading Enhances Restoration of the Cobalamin-Dependent Enzyme Methionine Synthase After Nitrous Oxide. *Anesthesia. Anesthesiology* 1994; 80: 1046-1056
- [32] Royston BD, Nunn JF, Weinbren HK, Royston D, Cormack RS. Rate of Inactivation of Human and Rodent Hepatic Methionine Synthase by Nitrous Oxide. *Anesthesiology* 1988; 68: 213-216
- [33] Guttormsen AB, Ueland PM, Lønning PE, Mella O, Refsum H. Kinetics of Plasma Total Homocysteine in Patients Receiving High-Dose Methotrexate Therapy. *Clin Chem* 1998;44:1987-1989
- [34] Selhub J, Dhar GJ, Rosenberg IH. Inhibition of Folate Enzymes by Sulfasalazine. *J Clin Invest* 1978;61: 221-224
- [35] Bissonnette R, Treacy E, Rozen R, Boucher B, Cohn JS, Genest J Jr. Fenofibrate Raises Plasma Homocysteine Levels in the Fasted and Fed States. *Atherosclerosis* 2001;155:45-462
- [36] Jonkers IJ, de Man FH, Onkenhout W, van der Laarse A, Smelt AH. Implication of Fibrate Therapy on Homocysteine. *Lancet* 1999; 354:1208
- [37] Garg R, Malinow M, Pettinger M, Upson B, Hunninghake D. Niacin Treatment Increases Plasma Homocyst(e)ine Levels. *Am Heart J.* 1999; 138:1082-1887

- [38] Blankenhorn DH, Selzer RH, Azen SP et al. Colestipol Plus Niacin Therapy Elevates Plasma Homocyst(e)ine Levels. *Coron Art Dis.* 1991;2:357-260
- [39] Tonstad S, Refsum H, Ose L, Ueland PM. The C677T Mutation in the Methylentetrahydrofolate Reductase Gene Predisposes to Hyperhomocysteinemia in Children With Familial Hypercholesterinemia Treated With Cholestyramine. *J Pediatr* 1998; 132:365-368
- [40] Coronato A, Glass GB. Depression of the Intestinal Uptake of Radio-Vitamin B12 by Cholestyramin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973; 142: 1341-1344
- [41] Smulders YM, de Man AM, Stehouwer CD, Slaats EH. Trimethoprim and Fasting Plasma Homocysteine. *Lancet* 1998; 352: 1827-1828
- [42] Müller T, Voitalla D, Hauptmann B, Fowler B, Kuhn W. Decrease of Methionine and S-Adenosylmethionin and Increase of Homocysteine in Treated Patients with Parkinson's Disease. *Neurosci Lett.* 2001; 308: 54-56
- [43] Yasui K, Kowa H, Nakaso K, Takeshima T, Nakashima K. Plasma Homocysteine and MTHFR C677T Genotype in Levodopa-Treated Patients with Parkinson's Disease. *Neurology* 2000; 55, 437-440
- [44] Apeland T, Mansoor MA, Strandjord RE. Antiepileptic Drugs as Independent Predictors of Plasma Total Homocysteine. *Epilepsy Res.* 2001; 47: 27-35
- [45] Schwaninger M, Ringleb P, Winter R et al. Elevated Plasma Concentrations of Homocysteine in Antiepileptic Drug Treatment. *Epilepsia* 1999; 40:345-350
- [46] Schenk BE, Festen HP, Kuipers EJ, Klinkenberg-Knol EC, Meuwissen SG. Effect of Short- and Long-Term Treatment With Omeprazol on the Absorption and Serum Levels of Cobalamin. *Aliment Pharmacol Ther.* 1996; 10:541-545
- [47] Force RW, Nahata MC. Effect of Histamine H2-Rezeptor-Antagonists on Vitamin B12 Absorption. *Ann Pharmacother* 1992; 26:1283-1286

- [48] Sevigny SJ de J, White SL, Halsey ML, Johnston FA. Effect of Isoniazid on the Loss of Pyridoxal Phosphate From, and its Distribution in the Body of the Rat. *J Nutr.* 1966; 88:45-50
- [49] Arnadottir M, Hultberg B, Vladov V, Nilsson-Ehle P, Thysell H. Hyperhomocysteinemia in Cyclosporine-Treated Renal Transplant Recipients. *Transplantation* 1996; 61:509-512
- [50] Fernandez-Miranda C, Sanz M, de La Calle A et al. Determinants of Increased Plasma Homocysteine in 221 Stable Liver Transplant Patients. *Clin Chem* 2001; 47: 2037-2040
- [51] Cole DE, Ross HJ, Evrovski J et al. Correlation Between Total Homocysteine and Cyclosporine Concentrations in Cardiac Transplant Recipients. *Clin Chem* 1998 ;44 :2307-2312
- [52] Carlsen SM, Følling I, Grill V, Bjerve KS, Schneede J, Refsum H. Metformin increases Total Serum Homocysteine Levels in Non-Diabetic Male Patients With Coronary Heart Disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57: 521-527
- [53] Boers GH, Smals AG, Trijbels FJ, Leermakers AI, Kloppenborg PW. Unique Efficiency of Methionine Metabolism in Premenopausal Woman May Protect Against Vascular Disease in the Reproductive Years. *J Clin Invest.* 1983; 72: 1971-1976
- [54] van der Mooren MJ, Wouters MG, Blom HJ, Schellekens LA, Eskes TK, Rolland R. Hormone Replacement Therapy May Reduce High Serum Homocysteine in Postmenopausal Woman. *Eur J Clin Invest* 1994; 24:733-736
- [55] Lien EA, Anker G, Lønning PE, Refsum H, Ueland PM. Effects of Hormones on the Plasma Levels of the Atherogenic Amino Acid Homocysteine. *Biochem Soc Trans* 1997; 25:33-35

- [56] Hak AE, Bak AA, Lindemans J et al. The Effect of Hormone Replacement Therapy on Serum Homocysteine Levels in Perimenopausal Woman: A Randomized Controlled Trail. *Atherosclerosis* 2001; 158:437-443
- [57] Brattström L, Israelsson B, Olsson A, Andersson A, Hultberg B. Plasma Homocysteine in Woman on Oral Oestrogen-Containing Contraceptives and in Men with Oestrogen-Treated Prostatic Carcinoma. *Scand J Clin Lab Invest.* 1992; 52:283-287
- [58] Nedrebø BG, Ericsson UB, Nygård O et al. Plasma Total Homocysteine Levels in Hyperthyroid and Hypothyroid Patients. *Metabolism* 1998; 47:89-93
- [59] Hussein WI, Green R, Jacobsen DW, Faiman C. Normalization of Hyperhomocysteinemia With L-Thyroxine in Hypothyroidism. *Ann Intern Med* 1999; 131:348-351
- [60] Catargi B, Parrot-Roulaud F, Cochet C, Ducassou D, Roger P, Tabarin A. Homocysteine, Hypothyroidism and Effect of Thyroid Hormone Replacement. *Thyroid* 1999; 9: 1163-1166
- [61] Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of Plasma Homocysteine Concentrations in the Framingham Offspring Cohort. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:613-621
- [62] Nygård O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Major Lifestyle Determinants of Plasma Total Homocysteine Distribution: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr.*1998;67:263-270
- [63] Hultberg B, Berglund M, Andersson A, Frank A. Elevated Plasma Homocysteine in Alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17:687-689
- [64] Nygård O, Refsum H, Ueland PM et al. Coffee Consumption and Plasma Total Homocysteine: The Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 136-143

- [65] McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-128
- [66] Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. *Thromb Res* 1980; 18: 113-121
- [67] Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996;98: 5-7
- [68] Heinecke JW, Kawamura M, Suzuki L, Chait A. Oxidation of low density lipoprotein by thiols: superoxide-dependent and -independent mechanisms. *J Lipid Res* 1993; 34: 2051-2061
- [69] Graham IM, Daly LE, Refsum HM et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA*. 1997 Jun 11;277(22):1775-81.
- [70] Schroeksnadel K, Frick B, Fuchs D. Homocysteine is an independent risk factor for myocardial infarction, in particular fatal myocardial infarction in middle-aged women. *Circulation*. 2004 Jul 27;110(4):e37-8
- [71] Woo KS, Qiao M, Chook P et al. Homocysteine, endothelial Dysfunction, and coronary artery disease: emerging strategy for secondary Prevention. *J Card Surg*. 2002 Sep-Oct;17(5):432-5.
- [72] Coull BM, Malinow MR, Beamer N et al. Elevated plasma homocyst(e)ine concentration as a possible independent risk factor for stroke. *Stroke*. 1990 Apr;21(4):572-6.
- [73] Perry IJ, Refsum H, Morris RW et al. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet*. 1995 Nov 25;346(8987):1395-8.

- [74] Rodgers GM, Kane WH. Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest* 1986; 77: 1909-1916
- [75] Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 1327-1333
- [76] Giannini MJ, Coleman M, Innerfield I. Letter: Antithrombin activity in homocystinuria. *Lancet* 1975; 1: 1094
- [77] Hayashi T, Honda G, Suzuki K. An atherogenic stimulus homocysteine inhibits cofactor activity of thrombomodulin and enhances thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells. *Blood* 1992; 79: 2930-2936
- [78] Lentz SR, Sadler JE. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* 1991; 88: 1906-1914
- [79] Rodgers GM, Conn MT. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood* 1990; 75: 895-901
- [80] Hajjar KA. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest* 1993; 91: 2873-2879
- [81] Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4912-4916
- [82] Hyland K, Smith I, Bottiglieri T et al. Demyelination and decreased S-adenosylmethionine in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Neurology* 1988; 38: 459-462

- [83] Scott JM, Dinn JJ, Wilson P, Weir DG. Pathogenesis of subacute combined degeneration: a result of methyl group deficiency. *Lancet* 1981; 2: 334-337
- [84] Surtees R, Leonard J, Austin S. Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid S-adenosylmethionine in inborn errors of methyl-transfer pathway. *Lancet* 1991; 338: 1550-1554
- [85] McKusick VA. Heritable disorders of connective tissue. 3 ed. Louis: C.V.Mosby, 1966:155 ff.
- [86] Kraus JP, Janosik M, Kozich V et al. Cystathione beta-synthase mutations in homocystinuria. *Hum Mutat* 1999; 13:362-75
- [87] Schedewie H, Willich E, Grobe H, Schmidt H, Muller KM. Skeletal findings in homocystinuria: a collaborative study. *Pediatr Radiol* 1973; 1:12-23
- [88] Brenton DP. Skeletal abnormalities in homocystinuria. *Postgrad Med J* 1977; 53:488-96
- [89] Jerosch J, Bader A, Uhr G. Knochen: Curasan Taschenatlas spezial. Georg Thieme Verlag 2002
- [90] Moll KJ, Moll M: Anatomie: Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog 1. Elsevier, Urban&Fischer Verlag, 18. Auflage, 2005
- [91] Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002;359:1761–7.
- [92] Melton LJ III. Adverse outcomes of osteoporotic fractures in the general population. *J Bone Miner Res* 2003; 18:1139–41.
- [93] Kanis JA, Jonsson B. Economic evaluation of interventions for osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2002 Oct;13(10):765-7

- [94] Kanis JA, Melton LJ III, Christiansen C, Johnston CC, Khaltsev N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994;9:1137-1141
- [95] Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1994;843:1–129.
- [96] Walker-Bone K. Recent developments in the epidemiology of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 2002;14:411–5.
- [97] Kuratorium Knochengesundheit, <http://www.osteoporose.org>. Stand 02.02.2014
- [98] Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 1987;2:595-610.
- [99] Joseph J, Joseph L, Shekawat N et al. Hyperhomocysteinemia leads to pathophysiological ventricular hypertrophy in normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285:H679-686
- [100] Ozdem S, Samanci N, Tasatargil A et al. Experimental hyperhomocysteinemia disturbs bone metabolism in rats. *Scand J Clin Lab Invest* 2007; 67:748-756
- [101] Woo CW, Siouw YL, Karmin O. Homocysteine activates cAMP-response element binding protein in HepG2 through cAMP/PKA signaling pathway. *Arterioscler Thromb vasc Biol* 2006;26:1043-50
- [102] Troen A, Shea-Budgell M, Shukitt-Hale B, Smith D, Selhub J, Rosenberg I. B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. *PNAS*. 2008; 105/34:12474-12479

- [103] Claes L, Schmalenbach J, Herrmann M et al. Hyperhomocysteinemia is associated with impaired Fracture Healing in Mice. *Calcif Tissue Int* 2009;85:17-21
- [104] Herrmann M, Wildemann B, Wagner A et al. Experimental folate and vitamin B12 deficiency does not alter bone quality in rats. *J Bone Miner Res.* 2009 Apr;24(4):589-96
- [105] Toue S, Kodama R, Amao M, Kawamata Y, Kimura T, Sakai R. Screening of toxicity biomarkers for methionine excess in rats. *J Nutr* 2006;136.1716S-21S
- [106] Tommasini SM, Nasser P, Schaffler MB, Jepsen KJ. Relationship between bone morphology and bone quality in male tibias: implications for stress fracture risk. *J Bone Miner Res* 2005;20:1372-80
- [107] van der Meulen MC, Jepsen KJ, Mikic B. Understanding bone strength: size isn't everything. *Bone* 2001;29:101-4
- [108] Herrmann M, Wildemann B, Claes L et al. Experimental Hyperhomocysteinemia Reduces Bone Quality in Rats. *Clin Chem* 2007;53:8;1455-1461
- [109] Herrmann M, Kraenzlin M, Pape G, Sand-Hill M, Herrmann W. Relation between homocysteine and biochemical bone turnover markers and bone mineral density in peri- and postmenopausal women. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:1118-23
- [110] Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, de Groot LC, Lips P, Smit JH, van Staveren WA. Homocysteine and vitamin B12 status relate to bone turnover markers, broadband ultrasound attenuation, and fractures in healthy elderly people. *J Bone Miner Res.* 2005 Jun;20(6):921-9

- [111] Bode MK, Laitinen P, Risteli J, Uusimaa P, Juvonen T. Atherosclerosis, type I collagen cross-linking and homocysteine. *Atherosclerosis* 2000; 52:531-2
- [112] Miyao M, Morita H, Hosoi T et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism with bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Calcif Tissue Int.* 2000 Mar;66(3):190-4.
- [113] Herrmann M, Widmann T, Herrmann W. Homocysteine-a newly recognised risk factor for osteoporosis. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(10):1111-7.
- [114] Herrmann M, Tami A, Wildemann B et al. Hyperhomocysteinemia induces a tissue specific accumulation of homocysteine in bone by collagen binding and adversely affects bone. *Bone.* 2009 Mar;44(3):467-75.
- [115] Liu G, Nellaiappan K, Kagan HM. Irreversible inhibition of lysyl oxidase by homocysteine thiolactone and its selenium and oxygen analogues. Implications for homocystinuria. *J Biol Chem.* 1997 Dec 19;272(51):32370-7.
- [116] Thaler R, Agsten M, Spitzer et al. Homocysteine suppresses the expression of the collagen cross-linker lysyl oxidase involving IL-6, Fli1, and epigenetic DNA methylation. *J Biol Chem.* 2011 Feb 18;286(7):5578-88.
- [117] Vacek TP, Kalani A, Voor MJ, Tyagi SC, Tyagi N. The role of homocysteine in bone remodeling. *Clin Chem Lab Med.* 2013 Mar 1;51(3):579-90.
- [118] Koh JM, Lee YS, Kim YS et al. Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intracellular ROS generation. *J Bone Miner Res.* 2006 Jul;21(7):1003-11.
- [119] Itzstein C, Cheynel H, Burt-Pichat B et al. Molecular identification of NMDA glutamate receptors expressed in bone cells. *J Cell Biochem.* 2001 Apr 27;82(1):134-44.

- [120] Stunes AK, Westbroek I, Gustafsson BI et al. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha agonist fenofibrate maintains bone mass, while the PPAR gamma agonist pioglitazone exaggerates bone loss, in ovariectomized rats. *BMC Endocr Disord*. 2011 May 26;11:11.
- [121] Poynter ME, Daynes RA. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem*. 1998 Dec 4;273(49):32833-41.
- [122] Kim DJ, Koh JM, Lee O et al. Homocysteine enhances apoptosis in human bone marrow stromal cells. *Bone*. 2006 Sep;39(3):582-90.
- [123] Banfi G, Iorio EL, Corsi MM. Oxidative stress, free radicals and bone remodeling. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(11):1550-5.
- [124] Tyagi N, Vacek TP, Fleming JT, Vacek JC, Tyagi SC. Hyperhomocysteinemia decreases bone blood flow. *Vasc Health Risk Manag*. 2011 Jan 25;7:31-5.
- [126] Holstein JH, Schmalenbach J, Herrmann M et al. Excess dietary methionine does not affect fracture healing in mice. *Med Sci Monit*. 2012 Dec;18(12):BR469-74.
- [127] Herrmann M, Tami A, Wildemann B et al. Hyperhomocysteinemia induces a tissue specific accumulation of homocysteine in bone by collagen binding and adversely affects bone. *Bone*. 2009 Mar;44(3):467-75.
- [128] Sato Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in elderly women with Parkinson's disease. *Am J Med* 2005; 118:1250-5
- [129] Périer MA, Gineyts E, Munoz F, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Homocysteine and fracture risk in postmenopausal women: the OFELY study. *Osteoporos Int*. 2007 Oct;18(10):1329-36.

- [130] Gerdhem P, Ivaska KK, Isaksson A et al. Associations between homocysteine, bone turnover, BMD, mortality, and fracture risk in elderly women. *J Bone Miner Res.* 2007 Jan;22(1):127-34.
- [131] Kim BJ, Koh JM, Ahn SH et al. High serum total homocysteine levels accelerate hip bone loss in healthy premenopausal women and men. *Bone.* 2013 Jan;52(1):56-62.
- [132] Derkx P, Nigg AL, Bosman FT et al. Immunolocalization and quantification of noncollagenous bone matrix proteins in methylmethacrylate-embedded adult human bone in combination with histomorphometry. *Bone.* 1998 Apr;22(4):367-73.
- [133] Yang R, Davies CM, Archer CW, Richards RG. Immunohistochemistry of matrix markers in Technovit 9100 New-embedded undecalcified bone sections. *Eur Cell Mater.* 2003 Dec 31;6:57-71;
- [134] Kramer I, Halleux C, Keller H et al. Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Mol Cell Biol.* 2010 Jun;30(12):3071-85.
- [135] Peterlik M. Wnt-Signalwege im Knochenstoffwechsel
Osteologie 2011 20 3: 197-202

10. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Stefan Klohs, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:“ Der Einfluss von Homocystein auf die Knochenstruktur – Eine histomorphometrische Untersuchung“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum 23.03.2014

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Stefan Klohs hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Herrmann M, Wildemann B, Claes L, Klohs S, Ohnmacht M, Taban-Shomal O. Experimental hyperhomocysteinemia reduces bone quality in rats. Clin Chem 2007 Aug; 53(8): 1455-61

Beitrag im Einzelnen: histomorphometrische Analysen

23.03.2014 Unterschrift und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

11. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12. Publikationsverzeichnis

08/2007 Herrmann M, Wildemann B, Claes L, Klohs S, Ohnmacht M, Taban-Shomal O. Experimental hyperhomocysteinemia reduces bone quality in rats. Clin Chem 2007 Aug; 53(8): 1455-61

13. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann für die Überlassung des interessanten Themas, die umfassende Betreuung, die Bereitstellung aller erdenklichen Arbeitsmöglichkeiten, das entgegengebrachte Vertrauen, die Geduld, die Anregungen, Kritiken und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Ebenfalls danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, Kolleginnen- und Kollegen, Doktorandinnen und Doktoranden des Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie Berlin (CMSC).

Ganz besonderer Dank gilt meinem Kollegen und Freund Herrn Dr. rer. medic. Martin Wolny für die Anleitung in die verschiedenen Verfahrensweisen des Instituts, die Fähigkeit zu Programmieren, die Flexibilität und allzeitige Bereitschaft, sowie die konstruktiven Gespräche, Ideen und Anregungen vom Beginn bis zum Ende der Dissertation. Ebenfalls gedankt sei seiner Frau Dr. med. Yvonne Wolny und meinem Bruder Dr. Jan Klohs-Füchtemeier für die konstruktive und überaus hilfreiche Kritik an meiner Arbeit.

Großer Dank gilt meiner Mutter, deren uneingeschränkter Unterstützung ich mir schon mein ganzes Leben lang sicher sein kann. Außerdem bedanke ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei Familie Thieleke und bei meinen Freunden für den Rückhalt und die Geduld.