

Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie  
Des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. med. J. M. Rueger

**Eine histologische und histomorphometrische Untersuchung  
des Knochenstatus von 274 Frauen unter besonderer  
Berücksichtigung des 25 (OH) Vitamin D Serumspiegel**

Dissertation  
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg  
vorgelegt von

Till Orla Klatte  
aus Berlin

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 02.11.2009

Veröffentlicht mit der Genehmigung Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, Vorsitzender: Prof. Dr. M. Amling

2. Gutachterin: PD Dr. H. Korbmacher

3. Gutachter: PD Dr. T. Schinke

Wissenschaftliche Betreuung durch Herrn Dr.med. M. Priemel

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1 Arbeitshypothese und Fragestellung</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	
2.1 Knochenentwicklung und –aufbau	2
2.2 Knochenzellen, –mineralisation, Remodelling und BMU	4
2.3 Endokrine Regulation des Knochenstoffwechsels	6
2.4 Störungen der Knochenzellfunktionen	7
2.5 Störungen der Knochenmineralisierung	10
2.6 25(OH) Vitamin D	13
2.7 Struktur, Metabolismus und Katabolismus des 25(OH) Vitamin D	14
2.8 Regulation der Kalziumhomöostase	16
2.9 Physiologische Wirkung des Vitamin D auf den Knochen	17
2.10 Weitere physiologische Wirkungen des 25(OH) Vitamin D	18
2.11 Referenzwerte des 25(OH) Vitamin D Serumgehaltes	20
2.12 Evaluierung des Knochenstatus und der Knochenqualität	21
<b>3 Material und Methode</b>	
3.1 Patientenkollektiv	24
3.2 Probengewinnung	25
3.3 Zuschneiden der Beckenkammbiopsie	25
3.4 Konservierung der Beckenkammbiopsie	26
3.5 Verarbeitung der Acrylblöcke	27
3.6 Färbung der Beckenkammbiopsie	28
3.7 Histomorphometrische Auswertung	29
3.8 Gewinnung der Blutprobe	30
3.9 Bestimmung des 25(OH) Vitamin D Serumspiegels	31
3.10 Statistische Auswertung	31

<b>4 Ergebnisse</b>	
4.1 Charakterisierung des Kollektivs	33
4.2 Zusammenhang von Knochenvolumen und BMI	35
4.3 Knochenstrukturparameter bei Frauen abhängig vom Alter	36
4.4 Abhängigkeit der Knochenstrukturparameter zueinander	39
4.5 Ermittlung des Anteils nicht mineralisierten Knochens	41
4.6 25(OH) Vitamin D Status und dessen Auswirkung auf die Mineralisierung	44
<b>5 Diskussion</b>	49
<b>6 Zusammenfassung</b>	59
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	60
<b>8 Danksagung</b>	72
<b>9 Curriculum Vitae</b>	73
<b>10 Publikationen im Rahmen der Dissertationsarbeit</b>	74
<b>11 Eidesstattliche Versicherung</b>	75

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata (Destilliertes Wasser)
BMI	Body-Mass-Index
BMU	Basic Multicellular Unit
BV/TV	Bone volume per Tissue volume (Knochenvolumen pro Gewebevolumen)
cm	Centimeter
°C	Grad Celsius
CT	Computertomographie
g	Gramm
kg	Kilogramm
Min	Minuten
ml	Milliliter
mmol	Millimol
µm	Mikrometer
n	Anzahl
Na	Natrium
OV/BV	Osteoid volume per Bone volume (Osteoidvolumen pro Knochenvolumen)
OV/TV	Osteoid volume per Tissue volume (Osteoidvolumen pro Gewebevolumen)
OS/BS	Osteoid surface per Bone surface (Osteoidoberfläche pro Knochenoberfläche)
PTH	Parathormon
Tb. Th.	Trabecular Thickness (Trabekuläre Dicke)
Tb. N.	Trabecular Number (Trabekuläre Anzahl)
Tb. Sp.	Trabecular Separation (Trabekulärer Abstand)
Vit	Vitamin
vs	Versus(gegen)
25(OH) D	25(OH) Vitamin D

## 1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Ein gesundes Skelettsystem ist eine der Hauptvoraussetzungen für ein mobiles und schmerzfreies Leben.

Grundlage einer regelhaften Entwicklung und Aufrechterhaltung der Funktionen des Skeletts ist unter anderem die Mineralisierung des Knochens. Dabei spielt die ausreichende Versorgung des Körpers mit Kalzium und Vitamin D eine elementare Rolle. Dennoch besteht gerade bei Frauen, die aufgrund der Menopause stärker von dem möglichen Auftreten einer Osteoporose betroffen sind, keine Erkenntnis darüber, wie hoch die Prävalenz für Mineralisierungsstörungen ist.

Bereits seit einiger Zeit sieht das Behandlungsregime der Osteoporose in dem ersten Schritt die Substitution von Kalzium und 25(OH) Vitamin D vor. Die Hauptfunktion des Vitamin D besteht in der Erhöhung des zur Verfügung stehenden Kalziums und einer direkten Wirkung auf die Knochenzellen. Mehrere Studien konnten bereits nachweisen, dass weite Teile der weiblichen Bevölkerung unter einem Vitamin D Mangel leiden. Dennoch gibt es bis heute keine einheitliche Meinung über den minimalen 25(OH) Vitamin D Wert, der eine normale muskuloskelettale Funktion ermöglicht. Die angegebenen Werte für einen Grenzwert schwanken zwischen 20 und 40µg/l 25(OH) Vitamin D. Diese Werte orientieren sich an dem Serumgehalt von Parathormon, einem indirekten Parameter für die Knochengesundheit. Exakter wäre jedoch die Bestimmung des 25(OH) D Grenzwertes unter Berücksichtigung der histologisch gemessenen Knochenmineralisation.

Dementsprechend sollen mit der folgenden Arbeit vier Kernfragen anhand von 274 Beckenkammbiopsien und Vitamin D Bestimmungen beantwortet werden:

1. Wie ist der Knochenstatus bei Frauen in einer westeuropäischen Großstadt?
2. Wie häufig ist das Auftreten von Mineralisierungsstörungen in der durchschnittlichen weiblichen Bevölkerung?
3. Wie ist der 25(OH) Vitamin D Status der weiblichen Bevölkerung?
4. Welcher Zusammenhang besteht zwischen Knochenstatus, Mineralisierungsstörung und dem 25(OH) Vitamin D-Status?

## 2 Einleitung

### 2.1 Knochenentwicklung und –aufbau

Das menschliche Skelett hat vielfältige für den Körper überlebensnotwendige Funktionen. Es dient nicht nur als Stützgewebe, Bewegungsorgan und Schutz für die inneren Organe. Vielmehr ist es darüber hinaus ein Ort der Blutbildung, sowie unverzichtbares Organ des Immunsystems.

Neben diesen Funktionen stellt der Knochen auch den größten Speicher für Calcium, Phosphat und andere Ionen des menschlichen Körpers dar.

Das Skelettsystem entwickelt sich entweder direkt über die desmale Ossifikation, oder indirekt über die chondrale Ossifikation. Bei der desmalen Ossifikation, die sich insbesondere bei der Entstehung der platten Schädelknochen abspielt, entwickeln sich in umschriebenen Gebieten aus Mesenchymzellen die Osteoblasten. Diese sind verantwortlich für die Entstehung der primären Ossifikationszentren. Durch den gleichzeitig einsetzenden Umbau durch Osteoklasten entwickelt sich spongiöser Knochen.

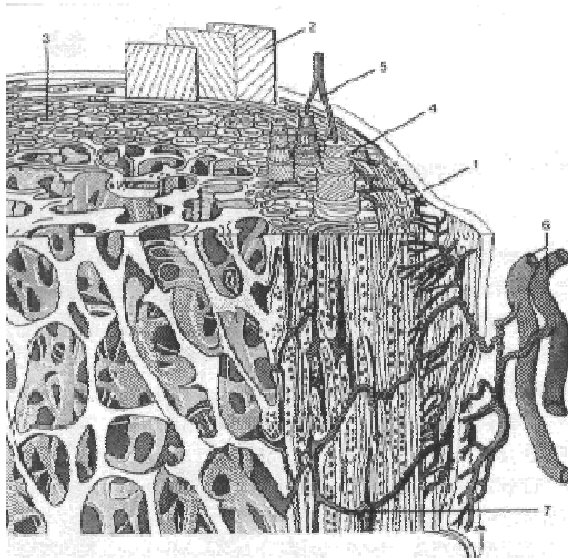
Die chondrale Ossifikation läuft als peri- oder enchondrale Ossifikation ab. Bei der perichondralen Ossifikation wandeln sich zuvor undifferenzierte Chondrozyten in Osteoblasten um. Sie beginnen auf der Oberfläche der Diaphyse des zuvor rein knorpeligen Knochens eine aus Faserknochen bestehende perichondrale Knochenmanschette zu bilden, welche bis zu den Knochenenden vorwächst. Sie wird zu Lamellenknochen umgewandelt und bildet am Ende die Kortikalis des Knochens. Die enchondrale Ossifikation verläuft innerhalb der Diaphyse und Epiphyse. Durch die außen wachsende Knochenmanschette kommt es zu einer Minderversorgung des Innenraumes und die vorherrschenden Chondrozyten gehen zugrunde. Durch das einwandern von Chondroblasten, Osteoblasten und Osteoklasten entsteht durch weitere Um-, Abbau- und vor allem Mineralisierungsprozesse die primäre Markhöhle und somit die Substantia spongiosa. Mit dem Auftreten von Stammzellen des Blut bildenden Systems spricht man von der sekundären Markhöhle.

Grundsätzlich finden sich im menschlichen Körper zwei verschiedene Arten von Knochen. Zum einen gibt es die primitive Form den Faser- oder Geflechtknochen. Er findet sich beim Erwachsenen nur noch regelhaft im Felsenbein, den Schädelnähten und Alveolarfortsätzen. Er stellt aber ferner eine wichtige Zwischenstufe bei der Reparation einer Fraktur dar. Vom Lamellenknochen unterscheidet er sich durch eine relativ lockere, ungerichtete Anordnung der Kollagenfaserbündel, einem höheren Anteil an Osteoblasten und verhältnismäßig geringerem Mineralisierungsgrad. Dies verleiht dem Geflechtknochen eine hohe Zugstabilität und Biegeelastizität.

Hauptsächlich besteht das Skelettsystem jedoch aus hoch differenzierten Lamellenknochen. Als äußerste Schicht findet sich das Periost, die Knochenhaut, welche der Substantia compacta aufliegt. Es dient mit seinen Blutgefäßen nicht nur der Versorgung des Knochens, die darin enthaltenen Nerven sorgen für die sensible Innervation und enthalten Osteoblasten-Vorläuferzellen. Das Endost trennt den Markraum von der Kortikalis.

Die Substantia compacta, oder auch Kortikalis, beschreibt dabei als dichte, mineralisierte, knöcherne Struktur die Begrenzung für den Markraum und stellt den stabilsten und härtesten Teil des Knochens dar. Sie zeichnet sich aus durch eine charakteristische Anordnung von General-, Spezial- und Schaltlamellen und ist durchzogen von den vertikal verlaufenden Havers- und horizontal liegenden Volkmann-Kanälen. Dieser spezifische Aufbau verleiht dem Lamellenknochen seine besonders hohe Festigkeit. Der von der Kortikalis begrenzte Raum ist die Substantia spongiosa, der Markraum. In ihm finden sich neben den Knochenzellen Zellen des hämatopoetischen Systems, des Immunsystems, sowie Gefäße und Fettzellen. Die Spongiosa stellt ein Geflecht von untereinander verbundenen Trabekeln, Knochenbälkchen, dar. Entsprechend der statisch wirkenden Kräfte auf den Knochen wird die Verlaufsrichtung der Trajekturen durch das Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten, Knochenauf- und -abbau, ausgerichtet, um so eine optimale Kraftverteilung innerhalb des Skelettsystems zu bewirken (Knese 1985).





- 1: Periost
- 2: Schalllamellenverlauf
- 3: Substantia spongiosa
- 4: Osteon
- 5: Blutgefäß im  
Haverschen Kanal
- 6: peripheres Blutgefäß
- 7: Volkmannsche Kanäle

**Abb.1:** Aufbau des Lamellenknochens (modifiziert nach Benninghoff 1935)

## 2.2 Knochenzellen –mineralisation, Remodelling und BMU

Den ständigen Auf- und Abbauprozess des Skelettes beschrieb Frost erstmalig als das „Remodeling“ des Knochens, das nach Abschluss des Knochenwachstums ein Leben lang stattfinden sollte (Ralston 1997). Dieser ständige Umbauprozess dient aber nicht nur der Optimierung der Statik, er dient auch der Reparation von Mikrofrakturen und ist beteiligt an der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase. Dabei gilt das Konzept der BMU (BMU = Basic Multicellular Unit) als kleinste zelluläre Einheit des Knochens. Dabei läuft das Remodeling zeitlich in einer strengen Reihenfolge ab, dem so genannten Coupling.

In einem ersten Schritt kommt es zu einer Aktivierung der Osteoklasten und Einwanderung der beteiligten Zellen zum Ort des Umbaus. Als nächstes erfolgt die Resorption des Knochens in einem Zeitraum von ca. 10-30 Tagen durch die Osteoklasten. Es entstehen Lakunen. Mit der Freisetzung von verschiedenen Botenstoffen treten vermehrt Osteoblasten auf, die im Anschluss den resorbierten Knochen in ca. 2-3 Monaten mit Osteoid auffüllen. Die Mineralisation des Osteoids stellt dann den Abschluss des Remodelings da. Der gesamte Prozess spielt sich in einem Zeitraum von ca. 3-4 Monaten ab.

Die Resorption von Knochen erfolgt durch die Osteoklasten. In ihrem Aufbau stellen die Osteoklasten als multinukleäre Riesenzellen eine Besonderheit dar. Sie sind die einzigen Zellen des menschlichen Körpers, die in der Lage sind, Knochen zu resorbieren. Die Osteoklasten liegen in den so genannten Howship-Lakunen, die Resorptionslakunen. Die zum Knochen hin gerichtete Oberfläche der Zellen ist stark gefaltet und verfügt so über eine deutlich vergrößerte Resorptionsoberfläche (Rahn et al. 1994). Sie wird als „ruffled border“ bezeichnet. Um diese herum liegt wie ein Ring die „sealing zone“, sie stellt mit ihren Aktinfilamenten eine undurchlässige Verankerung des Osteoklasten mit dem Knochen dar. Auf verschiedene mechanische und hormonelle Reize hin beginnen die Osteoklasten mit der Resorption. Mit Hilfe von saurer Phosphatase, saurer Hydrolase und Wasserstoffionen senken sie den lokalen pH-Wert. Das so entstandene saure Milieu ermöglicht den optimalen Abbau der Knochenmatrix, da die Löslichkeit des Kalziums erhöht wird.

Für den Aufbau von Knochen sind die Osteoblasten notwendig. Sie sind epithelartig in Schichten auf der Knochenoberfläche angeordnet. Auf verschiedene Reize, wie Zug- und Druckkräfte und auch endokrine, autokrine und parakrine Reize hin, beginnen sie die organische Knochenmatrix (Osteoid) und alkalische Phosphatase zu produzieren. Osteoid besteht zu über 90% aus Kollagen I sowie aus verschiedenen Proteinen wie Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin, „bone sialoprotein“ und weiteren Proteoglykanen und Glykoproteinen, an die sich im Anschluss Hydroxylapatitkristalle und andere Mineralien wie Magnesium anlagern (Mundy 1996; Schinke et al. 1999). Hydroxylapatitkristalle bestehen in erster Linie aus Kalziumphosphatverbindungen sowie zu einem geringen Anteil an Kalziumkarbonat. Für den Vorgang der Mineralisierung ist sowohl eine ausreichend hohe Konzentration an Kalzium und Phosphat im Serum als auch alkalische Phosphatase erforderlich. Die alkalische Phosphatase verändert den pH-Wert im Bereich des Osteoids und fördert so die Ausfällung der Kristalle und damit die Mineralisierung des Osteoids. Erst nach Abschluss dieses Vorgangs ist der Knochen mineralisiert und damit belastungsstabil (Harada et al 2003).

Im Rahmen der Mineralisierung werden einzelne Osteoblasten von mineralisiertem Knochen eingemauert und wandeln sich anschließend in Osteozyten um. Während ihrer Differenzierung zu Osteozyten degeneriert ein großer Teil der Zellorganellen, so dass die Syntheseleistung der Osteozyten sehr gering ist (Gartland et al. 2005). Über Zellfortsätze in Knochenkanälchen befinden sich die Osteozyten untereinander und mit Osteoblasten in Kontakt. Die aktuelle Forschung konnte Hinweise aufzeigen, dass sie mechanorezeptive Eigenschaften besitzen und somit wahrscheinlich weiterhin am Knochenumbau beteiligt sind (Aarden et al. 1994; Aguirre et al. 2006; Yin et al. 2006).

### **2.3 Endokrine Regulation des Knochenstoffwechsels**

Die Steuerung des Knochenauf- und -abbaus unterliegt einem äußerst komplexen Regulationsmechanismus. Neben der mechanorezeptiven Induktion der Knochenzellen spielen auch eine Reihe von parakrinen Vorgängen eine entscheidende Rolle (Turner et al 1995). Hier soll auf die endokrine Kontrolle des Knochenstoffwechsels eingegangen werden.

Die wichtigsten Hormone in dieser Hinsicht sind das Parathormon, Östrogen, Glukokortikoid, Leptin und Calcitonin. Die Bedeutung von Vitamin D wird im weiteren Verlauf erörtert.

Parathormon wird von den Nebenschilddrüsen ins Blut sezerniert. Die Nebenschilddrüsen verfügen über spezifische Kalziumrezeptoren und sind in der Lage, schnell auf Veränderungen des Kalziumspiegels mit einer vermehrten oder verminderten Sezernierung von Parathormon (PTH) zu reagieren. Dabei führt PTH zu einer Aktivierung der Osteoklasten und so über den vermehrten Abbau von Knochen zu einer erhöhten Freisetzung von Kalzium. In der Niere kommt es zu einer gesteigerten Kalzium- und verminderten Phosphatreabsorption (Rizzoli et al. 1992). Gleichfalls reguliert PTH einen Schritt der Vitamin D-Synthese.

Eine direkt hemmende Wirkung auf die Osteoklasten vermittelt das Calcitonin (Friedman et al 1993). Bei hohen Kalziumserumspiegeln wird es von den C-Zellen der Schilddrüse ausgeschüttet und senkt so den

Kalziumgehalt des Blutes. Neuere Erkenntnisse konnten an Mäusen zeigen, dass Calcitonin gleichfalls die Knochenresorption fördert (Huebner et al. 2006).

Die Steroidhormone, insbesondere Östrogen und Glukokortikoide, besitzen ebenfalls Einfluss auf den Knochenmetabolismus. Östrogen übt über Kernrezeptoren, welche sowohl in der Osteoblasten- als auch Osteoklasten-Linie exprimiert werden, einen regulatorischen Effekt auf das Knochenwachstum und den Knochenumbau aus. So führt z.B. der Verlust der Ovarien zum Knochenverlust (Lindsay et al. 1978; Kalu 1991). Dies bietet eine Erklärung für die Entstehung der postmenopausalen Osteoporose der Frau mit verringertem Östrogenspiegel. Der osteoanabole Effekt des Östrogens führt zu dem früheren Epiphysenverschluss bei jungen Frauen und somit zu einem geringeren Längenwachstum als bei Männern.

Das von den Nebennieren unter Einfluss von ACTH der Hypophyse gebildete Glukokortikoid besitzt sowohl osteoanabole als auch osteokatabole Eigenschaften. In hohen Dosen hemmt Glukokortikoid die Osteoblasten und stimuliert die Osteoklasten. In physiologischer Menge ist es jedoch in der Lage, durch indirekte Stimulation über andere Hormone den Knochenaufbau zu fördern (Rodan et al. 1984; Wong et al. 1990).

Ducy et al. konnten 2000 anhand von Leptin- und Leptinrezeptor-defizienten Mäusen zeigen, dass Leptin, ein von den Adipocyten produziertes Hormon, einen osteokatabolen Effekt hat. Dies bewies erstmalig eine direkte zentralnervöse Regulierung des Knochenstoffwechsels (Ducy et al. 2000).

## **2.4 Störungen der Knochenzellfunktionen**

Eine Unter- oder Überfunktion der Osteoblasten oder Osteoklasten führt zwangsläufig zu einer gestörten Balance innerhalb des sensibel abgestimmten Remodelings.

Zwei Beispiele einer solchen Störung des Auf- und Abbaus sind zum einen die Osteopetrose und zum anderen die Osteoporose (Raisz 1999).

Die sehr seltene Osteopetrose entsteht durch eine Unterfunktion der Osteoklasten bei gleichzeitig vermehrter Osteoblastenfunktion. Die ständig

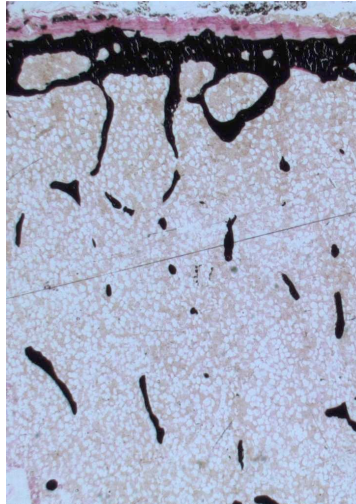
zunehmende Knochenmasse führt zu gesundheitlichen Problemen. Es kommt zu einer frühzeitigen Verknöcherung der Wachstumsfugen, des Markraums und insbesondere zu einer Verengung von Ein- und Austrittsöffnungen am Schädel. Das ausgeprägte klinische Bild ist bestimmt von den Folgen der Knochenmarksverdrängung, wie Anämie und erhöhter Infektanfälligkeit, Kleinwuchs und neurologischen Störungen. Insbesondere kommt es aber durch eine zunehmende Steifigkeit des Knochens zu einer erhöhten Frakturneigung (Cook et al. 1992).

Bei der Osteoporose kommt es charakteristischerweise zu einer erhöhten Frakturneigung. Hierbei kommt es infolge eines vermehrten Abbaus oder verminderten Aufbaus von Knochen. Histologisch zeigt sich eine zunehmende Verminderung der Knochenstruktur durch Abnahme der trabekulären Dicke und Vernetzung der Spongiosa. Bei Fortschreiten der Erkrankung kommt es ebenso zunehmend zu einer Ausdünnung der Kortikalis.

Es wird in eine primäre und sekundäre Form der Osteoporose unterschieden. Die häufigste primäre Form der Osteoporose bei den Frauen ist die postmenopausale Osteoporose. Zu den primären Formen gehören auch die senile und die idiopathische Osteoporose des jungen Menschen. Für die postmenopausale Form wird vor allem der Östrogenabfall und die damit verbundene erhöhte Osteoklasten- und verminderte Osteoblastenaktivität verantwortlich gemacht.

Die sekundäre Osteoporose wird ausgelöst durch endokrine Erkrankungen wie dem Hyperkortisolismus, Malabsorptionssyndromen oder Nierenerkrankungen.

Weiter kann in einen „high turnover“ oder „low turnover“ Typ unterschieden werden. High turnover bedeutet einen gesteigerten Umbau des Knochens mit überwiegender Aktivität der Osteoklasten. Er ist typisch für die frühe postmenopausale Osteoporose. Eine vor allem verminderte Aktivität der Osteoblasten bei gleich bleibender osteoklastärer Funktion findet sich insbesondere bei der späten postmenopausalen Osteoporose (>10 Jahre postmenopausal) und charakterisiert den low turnover Typ.



**Abb. 2:** Beckenkammbiopsie, 25x, Gieson/ von Kossa: typisches Bild einer Osteoporose mit Ausdünnung und Rarefizierung der Trabekel.

Aber auch beim Mann tritt die primäre Form der Osteoporose auf. So ist jeder 5. Mann über 50 Jahren (Allolio et al. 2000) von der Osteoporose betroffen. Die Osteoporose ist eine der häufigsten Krankheiten. In der OPUS Studie mit über 1000 Frauen im Alter von 55-79 Jahren ergab sich ein altersassoziierter Anstieg der Prävalenz von 7 auf 19% (Glüer et al.). In der durchschnittlichen Bevölkerung ist bei einem über 60 Jahre alten Menschen das Risiko für eine Wirbelkörperfraktur 20fach erhöht und eine Schenkelhalsfraktur zu erleiden über 50fach erhöht.

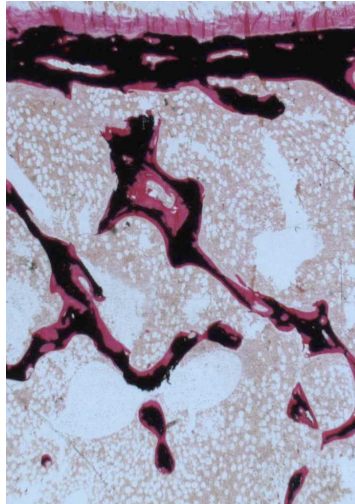
Zu Beginn verhält sich die Erkrankung klinisch inapparent. Mit zunehmendem Alter allerdings findet unbehandelt eine stetige Abnahme der Knochendichte statt. Bei gleichzeitiger Schwächung der Muskulatur und höherer Fallneigung, nicht zuletzt auch infolge eines Vitamin D-Mangels, (Bischoff-Ferrari et al. 2004), ist eine drastische Erhöhung des Frakturrisikos die Folge. Am häufigsten von Frakturen betroffen sind die Wirbelkörper und der Schenkelhals. Allein infolge einer osteoporotisch bedingten Schenkelhalsfraktur versterben in Deutschland innerhalb eines Jahres 25% der operativ versorgten Patienten an Komorbiditäten wie Pneumonie und Lungenembolie. Die alleinigen Behandlungskosten hierfür belaufen sich auf über 3 Milliarden Euro jedes Jahr (Bartl et al. 2003).

## 2.5 Störungen der Knochenmineralisierung

Eine gestörte Mineralisierung des Knochens äußert sich in Form einer Osteoidose. Letztere wird beim Erwachsenen als Osteomalazie bezeichnet und beim Kind als Rachitis.

Histologisch zeigt sich in der unentkalkten Biopsie das Bild einer Volumen- und/oder Oberflächenosteoidose, das heißt einem Zuviel an Osteoid, der organischen Grundsubstanz des Knochens. Im Jahre 1975 setzte Prof. Delling den Grenzwert für eine Volumenosteoidose bei 1,2% OV/BV (Delling 1975).

Von einer Oberflächenosteoidose wird ab Werten über 20% OS/BS gesprochen. Osteoid wird von den Osteoblasten an den Stellen des Knochens gebildet, an denen zuvor entweder defekte Trabekel resorbiert wurden oder aufgrund vermehrter Belastung eine erhöhte Stabilität von Nöten ist. Eine fehlende Mineralisierung des Osteoids führt zu einer erhöhten Frakturneigung und weist nur eine unzureichende mechanische Stabilität auf. Die Mineralisierungsstörung entsteht zumeist aufgrund eines Mangels an Vitamin D und/oder gleichzeitigem Mangel an Kalzium. Infolge des Vitamin D- Mangels kommt es zu einer Verringerung der Aufnahme von Kalzium. Ein Mangel an Kalzium führt im nächsten Schritt zu einem sekundären Hyperparathyreoidismus. Die Folge ist ein Ansteigen des Parathormons, das zum einen den Abbau von Knochen anregt und eine Hypophosphatämie hervorruft, zum anderen zu einer verringerten Bereitstellung von Kalzium führt.



**Abb. 3:** Beckenkammbiopsie, 25x, Gieson/ von Kossa: Bild der Osteoidose mit vermehrtem Anteil an Osteoid, rot gefärbt.

Die häufigste Ursache einer Osteomalazie ist ein 25(OH) Vitamin D Mangel infolge mangelnder Aufnahme, erhöhtem Verlust oder verringerter Synthese. Der generelle Mangel kommt zumeist aufgrund geringer Sonneneinstrahlung der Haut, sowie einer insuffizienten Versorgung oder der gestörten Aufnahme des 25 (OH)D über die Nahrung zu stande. Für einen erhöhten Verlust können Störungen im enterohepatischen Kreislauf, beispielsweise Zöliakie oder verschiedene Medikamente wie Antiepileptika, die den Metabolismus von Calciferol verstärken, verantwortlich sein. Die verringerte Syntheseleistung ist meist die Folge von geringer Einwirkung von UV-Licht auf die Haut, aber auch von allen, die Leber in ihrer Funktion einschränkenden Erkrankungen. Die Phenytoin und die Vitamin D abhängige Rachitis Typ II, eine Vitamin D Rezeptor Mutation, führen zu einer Resistenz der Zielorgane auf Calciferol. Eine weitere Ursache für eine Osteomalazie ist die Hypophosphatämie, ausgelöst durch Krebserkrankungen, Antazida und die X-linked und autosomale hypophosphatämische Rachitis. Ebenfalls Auslöser sind renale Tubulopathien, hier sei die renal tubuläre Azidose genannt, die zu einer Hypophosphatämie führt und auch als Fanconi-Syndrom bekannt ist, sowie primäre Mineralisationsdefekte, vor allem ausgelöst durch Medikamente.

Wird die Erkrankung erkannt, ist sie in den meisten Fällen mit günstigen Mitteln und durch eine gezielte Supplementation von Vitamin D und Kalzium zu heilen.



Die Rachitis, eine heute seltene Erkrankung, manifestiert sich zumeist im 2. - 3. Lebensmonat und beginnt vor allem mit vermehrter Unruhe und Schwitzen. Im weiteren Verlauf entwickelt sich eine Muskelhypotonie, ein eingefallener Bauch (sog. Froschbauch), sowie der Kraniotabes, eine abnorme Weichheit des gesamten Schädels. Erst im späteren Verlauf kommt es im Rahmen der Spätmanifestation zu weiteren schmerzhaften Skelettveränderungen. Hierbei kommt es durch Störung des Knorpelabbaus und Anlagerung von Osteoid und Auftreibungen der metaphysären Röhrenknochen zu verschiedenen Fehlbildungen des Skelettsystems. Die Verformung diverser Knochen, der rachitische Rosenkranz an den Rippen und Perlschnurfinger, sind nur einige der schmerzhaften Erscheinungsformen der Rachitis in ihrer vollen Ausprägung (Benson et al. 1963; Arnstein et al. 1967; Pitt 1991).

Hingegen manifestiert sich die Osteomalazie erst im höheren Lebensalter. Sie präsentiert sich oft mit generalisierten oder lokalisierten Schmerzen des Skelettsystems. Bevorzugt sind hierbei die Wirbelkörper, der Thorax, das Becken und der Schultergürtel betroffen. Oft ist die Osteomalazie ebenfalls assoziiert mit Polyarthralgie und Schwäche der proximalen Muskulatur (Smith und Stern 1967; Schott und Wills 1976; Pitt 1991). Nicht zuletzt führt aber die mangelhafte Mineralisierung und somit geminderte Knochendichte vor allem zu einer erhöhten Frakturneigung.

Ihre zumeist unspezifischen radiologischen Zeichen und ebenso unspezifischen biochemischen Veränderung des Blutbildes, als ein Marker ist hier die alkalische Phosphatase zu nennen, macht die Diagnosestellung ausgesprochen schwierig (Bingham und Fitzpatrick 1993). Es gibt eine Reihe von Differentialdiagnosen bei muskuloskeletalen Manifestationsformen der Osteomalazie. Zu nennen sei hier die Fibromyalgie, Polymyalgia rheumatica, Polymyositis, rheumatoide Arthritis, ankylosierende Spondylitis und vor allem aber die Osteoporose.

Eines der spezifischeren Zeichen ist das Auftreten der Pseudofrakturen oder auch von Looser-Umbauzonen. Sie sind aber lediglich bei 5-10% der Betroffenen zu finden. Histologisch handelt es sich hierbei um unvollständig durchbaute Frakturen oder Fissuren. Im Röntgenbild sind sie als band- oder streifenförmige Aufhellungen zu sehen. Mit progredienter Erkrankungsdauer

kommt es wie bei der Osteoporose infolge der zunehmenden Instabilität zum konkaven Einsinken der Grund- und Deckplatten, der so genannten „cod-fish-Wirbel“. Das Auftreten des „Milkman-Syndroms“ bezeichnet die Kombination von multiplen bilateralen symmetrischen Pseudofrakturen.

Der sichere diagnostische Nachweis einer Osteomalazie erfolgt anhand einer Knochenbiopsie. So kann man bei Erkrankten einen geringeren Umsatz der Mineralisations- und Knochenbildungsrate, sowie eine kleinere mineralisierte Oberfläche nachweisen (Frost 1969; Frame und Parfitt 1978; Schober et al. 1998).

Trotz vieler aktueller Studien, welche die Prävalenz der Osteoporose und des 25(OH) Vitamin D Mangels bei Frauen beschreiben, gibt es keine Studie, die eine Aussage über die Prävalenz der Osteoidose und somit potentiell mögliche Osteomalazie beschreibt.

## **2.6 25(OH) Vitamin D**

Mit der Entdeckung des Lebertrans als Heilmittel im Jahre 1918 (Mellanby 1918) und der heilenden Wirkung von UV-Licht (Huldschinsky 1919) gegen die weit verbreitete Rachitis kam es 1921 durch McCollum zur erstmaligen Beschreibung des Vitamins D (McCollum et al. 1995). Mit der besonders bei Kindern durchgeführten Supplementation von Vitamin D in Form des Lebertrans kam es mit der Zeit zum Verschwinden des ehemals häufigen Bildes der Rachitis (Park 1940). Die heutigen Lebensverhältnisse in der westlichen Welt scheinen dem Körper genügend 25(OH) D zur Verfügung zu stellen, so dass sich kaum ausgeprägte Fälle in der westlichen Welt finden lassen. Mit Verdrängung der Rachitis kam es aber auch zu einem zunehmenden Verlust des Bewusstseins für die Wichtigkeit einer guten und ausreichenden Versorgung der Bevölkerung mit 25(OH) Vitamin D. So konnte Hintzpeter et al in einer großen Deutschlandweiten Studie zeigen, dass über 69% der Bevölkerung einen 25(OH) D Mangel aufweisen (Hintzpeter et al. 2008).

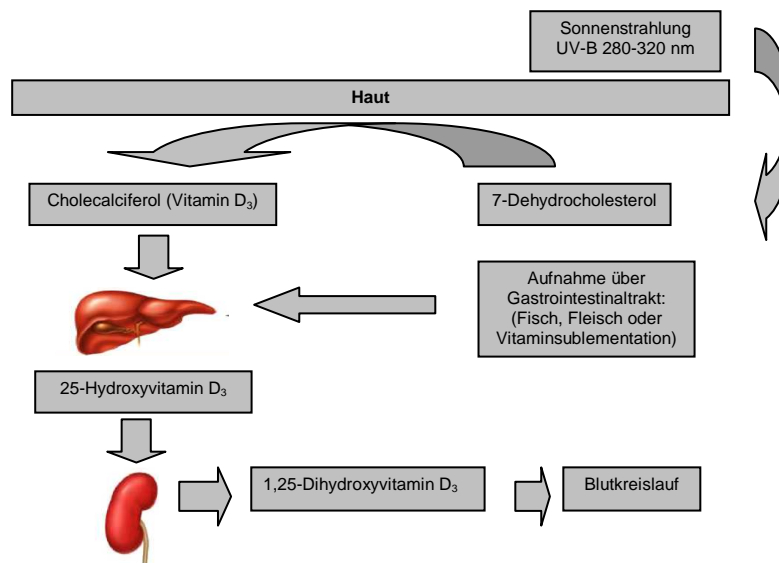
## 2.7 Struktur, Metabolismus und Katabolismus des 25(OH) Vitamin D

Bei Vitamin D handelt es sich der Definition nach nicht um ein Vitamin, da der Körper in der Lage ist, es selbst zu synthetisieren. Vielmehr ist es aufgrund seiner Struktur und der Fähigkeit des Körpers, es selbst zu produzieren, den Steroiden zuzurechnen und damit ein Hormon.

Der noch inaktive Vitamin D<sub>3</sub> Metabolit (Cholecalciferol) kann entweder über die Nahrung (am meisten in Fisch enthalten) im Dünndarm resorbiert werden oder aber auch eigenständig synthetisiert werden. Der Weg der Eigensynthese beginnt mit dem Cholesterol, welches in der Leber mittels der Cholesteroldehydrogenase zu 7-Dehydrocholesterol umgebaut wird (Esvelt, et al. 1979). An Transportproteine gebunden gelangt es über die Blutbahn in die Keratinozyten der Haut. Hier wird es mit Hilfe von UV-Licht in einem Wellenlängenbereich von 295 bis 300 nanometer (MacLaughlin et al. 1982) aktiviert. Jedoch muss, um eine ausreichende Vitamin D<sub>3</sub> Synthese zu gewährleisten, die Ganzkörperexposition über 18 mJ/cm<sup>2</sup> liegen. Dieses ist nur innerhalb des 40ten südlichen und nördlichen Breitengrades gewährleistet. Hamburg befindet sich auf dem 52. nördlichen Breitengrad, was eine Mangelversorgung wahrscheinlich macht (Matsuoka et al. 1989). Vitamin D entsteht zunächst über eine Isomerisierung des rotationsinstabilen Prävitamin D. Im Rahmen einer weiteren Isomerisierung durch UV-B Strahlung entsteht dann das stabile Vitamin D. Dieser letzte Schritt in der Haut wird nun so lange fortgesetzt, wie auch stabiles Vitamin D aus der Zelle ausgeschleust wird, also im Sinne einer Gleichgewichtsreaktion (Velluz und Amiard 1949). Zu diesem Zeitpunkt besitzt das Vitamin D über keinerlei biologische Aktivität. Im Blut wird das stabile Vitamin D an freie spezifische Transportproteine gebunden und gelangt über den Blutkreislauf in die Leber. Dies ist der Ort, an dem der erste Schritt der Aktivierung stattfindet. Mittels Hydroxylierung wird in den Hepatozyten an Position 25 das stabile Vitamin D zu 25-Hydroxycholecalciferol (25(OH)D<sub>3</sub>) umgewandelt. Eine Regulation der Hydroxylierung und somit Aktivierung des Vitamin D gibt es in der Leber nur in Form eines Produkthemmungsmechanismus. Der letzte Schritt bis zur vollständigen Aktivierung und auch Ort der Regulation der Neusynthese ist die Niere. Das 25-Hydroxycholecalciferol wird hier infolge einer 1-alpha-

Hydroxylierung zu 1,25-Dihydroxycholecalciferol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder Calcitriol) der aktivsten Form des Vitamin D umgewandelt.

Die beiden Hydroxylierungsschritte bewirken unter anderem eine geringere Löslichkeit in Fett und eine gesteigerte in Wasser. Die C1-Hydroxylase in der Niere ist das Schlüsselenzym für die Regulation durch Parathormon, Calcium und Phosphor im Serum. Ein Anstieg des Parathormons, infolge eines gesunkenen Kalziumspiegels, führt zu einer vermehrten Aktivierung des Enzyms. Gleichzeitig wird die C1-Hydroxylase zusätzlich auch durch niedrige Spiegel von Kalzium und Phosphor im Serum stimuliert. Ein letzter wichtiger Regulationsschritt ist nicht zuletzt die, infolge der negativen Rückkopplung, stattfindende Verringerung der Synthese von C1-Hydroxylase bei zu hohem Calcitriolanteil. Das biologisch aktive Calcitriol wird ebenfalls an ein Transportprotein gebunden, nur ein kleiner Teil liegt im Serum frei vor (Nussey 2001).



**Abb. 4:** Schema der Vitamin 25(OH) D Synthese

Für die Inaktivierung des biologisch hoch aktiven Calcitriols ist vor allem die Vitamin D-24-Hydroxylase, aber auch ein weiteres mitochondriales Cytochrom P-450 verantwortlich. Beide inaktivieren  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  über mehrere Oxidationschritte (Knutson und DeLuca 1974; Burgos-Trinidad et al. 1986).

Besonders die 24-Hydroxylase ist ubiquitär in den Geweben vorhanden, die Vitamin D Rezeptoren besitzen. Auch hier ist ein Regulationsmechanismus vorhanden. Bewiesen wurde das bei Mäusen mit fehlendem Gen für die 24-Hydroxylase, ein überdurchschnittlicher Anstieg des Calcitriols ist zu verzeichnen (St-Arnaud 1999). Der inaktivierte Vitamin D Metabolit wird in der Leber konjugiert und über die Galle in den Darm sezerniert. Nur ein geringer Anteil der katabolisierten Metabolite ist wasserlöslich und kann so über die Niere ausgeschieden werden.

## 2.8 Regulation der Kalziumhomöostase

Die Wirkung von 25(OH) Vitamin D ist vielfältig und derzeit aktueller Gegenstand der Forschung.

Vermittelt wird sie über den Vitamin D Rezeptor (VDR). Dieser VDR wird in einer Vielzahl von Gewebearten exprimiert und lässt allein aufgrund seines nahezu ubiquitären Vorkommens schon erahnen, welche vielfältigen Funktionen des Körpers durch das Vitamin D reguliert werden.

Als gesicherte und wichtigste Wirkung gilt seine Funktion in der Kalziumhomöostase. Das 25(OH) D greift auf zwei Wegen in die Erhöhung des Kalziumspiegels im Serum ein. Zum einen ist es die Stimulierung der Resorption von Kalzium im Darm und zum anderen die vermehrt unter seinem Einfluss hin stattfindende Rückresorption von Kalzium aus dem Primärharn.

Vor allem im Darm erhöht sich die Kalziumresorption drastisch unter der Wirkung von 25(OH) D. Dabei spielt im Duodenum vor allem das  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsprotein (CaBP) eine limitierende Rolle. Das Kalzium wird, an die Endozyten gebunden, aktiv und passiv aufgenommen. Mittels des CaBP wird das Kalzium durch die Zellen geschleust, um anschließend via primär-aktivem ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) oder sekundär-aktivem ( $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiport) Transport ins Blutsystem sezerniert zu werden. Durch die Wirkung von Calcitriol kann hierbei sowohl die Aufnahme in die Mukosazellen als auch die Transportrate bei der Ausschleusung erhöht werden. So ist Calcitriol aber auch verantwortlich für eine vermehrte Synthese des CaBP. Folglich

hat Calcitriol eine Kurz- und Langzeitwirkung bezüglich der Erhöhung der Kalziumresorption im Darm.

In der Niere verfügt 25(OH) D über die Fähigkeit, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausscheidung über den Harn zu verringern. Hierbei ist 25(OH) Vitamin D zusammen mit dem Parathormon (PTH) in der Lage, die Reabsorption von Kalzium im distalen Tubulus zu stimulieren. Dies geschieht, in dem Calcitriol für eine vermehrte Synthese von PTH-Rezeptoren sorgt (Friedman und Gesek 1993). Parathormon wirkt im Folgenden positiv auf eine Plasmamembran-Kalziumpumpe, mit dem Resultat einer vermehrten Rückgewinnung von Kalzium. Gleichfalls gibt es auch in der Niere Proteine, die Kalzium binden und für eine vermehrt Rückresorption sorgen. Wie im Duodenum werden auch sie unter Einfluss von Vitamin D vermehrt synthetisiert (Lambers et al. 2006).

Somit kommt dem (25)OH Vitamin D neben dem Parathormon eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase zu.

## **2.9 Physiologische Wirkung des 25 (OH) Vitamin D auf den Knochen**

Ein Mangel an 25 (OH) D führt mit der Zeit zu einer Osteomalazie. Bei gleichzeitigem Abfall des Serumkalziums kommt es infolge der vermehrten Parathormonausschüttung, die nötig ist, um den Kalziumspiegel konstant zu halten, zu einem vermehrten Knochenabbau. Die Folge ist eine stark verminderte Kalziumeinlagerung in den Knochen und darüber hinaus eine vermehrt stattfindende Knochenresorption durch die stimulierten Osteoklasten.

In vielen Zellen des Körpers konnten bereits 25 (OH) Vitamin D Rezeptoren nachgewiesen werden. Die neuesten Forschungsergebnisse zeigen, dass Vitamin D eine weitaus größere physiologische Wirkung besitzt, als bisher angenommen.

Auch in Osteoblasten und Vorläuferzellen der Osteoklasten wurden Vitamin D Rezeptoren nachgewiesen. Dabei stellte man fest, dass die Gabe von Vitamin D einen proliferativen Effekt auf die Osteoblasten und ihre Aktivität hat. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Vitamin D

Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung der Knorpelzellen nimmt (Amling et al. 1999; Ornoy 1978; Schwartz 1988). Mäuse mit einer Überexpression von Vitamin D Rezeptoren in Osteoblasten zeigten einen signifikant gesteigerten Knochenaufbau (Gardiner et al. 2000).

In der Literatur wurde auch beschrieben, dass die Vitamin D Gabe in vitro zu einem Knochenverlust führe durch Aktivierung der Osteoklasten (Stern und Mavreas 1976). Hingegen konnte in Versuchen mit Knock-out Mäusen, die über keinen Vitamin D Rezeptor verfügten, aber aufgrund einer speziellen Diät normokalzämisch waren, gezeigt werden, dass keine veränderte Anzahl an Osteoklasten oder Änderung des Resorptionsverhalten auftrat (Amling et al. 1999). Diese scheinbar gegensätzlichen Ergebnisse lassen vermuten, dass der Rezeptor und das 25 (OH) D den Knochenmetabolismus regulieren, aber im Falle des Ausfalls durch andere Botenstoffe und Signaltransduktionswege ersetzt werden können.

Jedoch wurde bewiesen, dass es indirekt durch den über 25(OH) D ausreichend hohen Calciumspiegel im Blut zu einer verminderten Parathormonsekretion der Nebenschilddrüsen kommt, und somit einen knochenprotektiven Effekt ausübt (Suda, Ueno et al. 2003).

### **2.10 Weitere physiologische Wirkungen des 25(OH) Vitamin D**

Gleichfalls interessant erscheint in Hinsicht auf das Muskel- und Skelettsystem, dass 25(OH) D eine signifikante Rolle im Rahmen der neuromuskulären Funktion spielt. Es zeigte sich in zwei großen Studien, dass ein hoher 25(OH) D Spiegel bei alten Menschen signifikant sowohl das Sturzrisiko um 20 % senkt als auch die allgemeine neuromuskuläre Funktion verbessert (Bischoff-Ferrari et al. 2004). Diese Tatsache zeigt auf, welche wichtige Rolle das Calciferol in der Prävention von Knochenbrüchen, vor allem beim alten Menschen, darstellt. Die genauen Wirkmechanismen sind derzeit jedoch noch nicht weitreichend genug erforscht.

Aber auch fernab des muskuloskeletalen Systems finden sich vielfältige Gewebe und Prozesse, auf die 25 (OH) Vitamin D eine Funktion ausübt. Unter anderem wurde nachgewiesen, dass 25(OH) D vielfältige

regulatorische Funktionen innerhalb des Immunsystems besitzt. So konnte gezeigt werden, dass unter der Standardbehandlung der an Lungentuberkulose Erkrankter bei denjenigen, die zusätzlich 25(OH) D erhielten, im Vergleich zur Placebogruppe, keine Erreger im Sputum mehr nachzuweisen waren (Nursyam et al. 2006). Ein weiterer Nachweis der immunmodulatorischen Wirkung des 25(OH) D konnte anhand einer placebokontrollierten Studie hinsichtlich der Häufigkeit einer Influenzaerkrankung bei postmenopausalen Frauen erbracht werden. Es zeigte sich, dass diejenigen Frauen, die mit 25 (OH) Vitamin D substituiert wurden, deutlich weniger häufig an Influenza erkrankten (Aloia und Li-Ng 2007). Auch ein positiver Effekt auf den Blutdruck konnte bei älteren Frau nachgewiesen werden (Pfeifer et al. 2001). Darüber hinaus scheint 25(OH) Vitamin D über antiproliferative Effekte zu verfügen und ist somit besonders interessant für die Krebsforschung. So konnte eine antiproliferative Wirkung gegen unterschiedlichste Karzinomzellen nachgewiesen werden. Eine besonders effektive Wirkung ist hinsichtlich der verringerten Prävalenz von Brust-, Lungen-, Colon- und Prostatakarzinomen unter 25(OH) D Substitution zu beobachten (Garland et al. 2007; Lappe et al. 2007). Aber auch als zusätzliche Medikation in der Behandlung der genannten Karzinome ist 25(OH) D in den Fokus der Forschung gelangt. Mittlerweile konnte auch gezeigt werden, dass 25(OH)Vitamin D als Zusatzmedikation einen positiven Effekt auf den Verlauf von Karzinomerkrankungen nimmt (Niles 1995).

Die Forschung zu diesen Themen befindet sich in einem ständigen Fluss und immer wieder gibt es neue Erkenntnisse darüber, welche weiteren Eigenschaften 25(OH) Vitamin D besitzt.



### 2.11 Referenzwerte des 25(OH) Vitamin D Serumgehaltes

Hinsichtlich der erforderlichen Grenzwerte für den Serumspiegel des 25(OH) Vitamin D herrscht Uneinigkeit. So reichen die empfohlenen Referenzwerte für die Untergrenze des 25(OH) Vitamin D im Serum von <12 bis <40µg/l. Besonders niedrige Grenzwerte für das 25(OH) D wurden in denjenigen Studien ermittelt, welche die Pathogenese der Osteomalazie untersuchten (Bouillon et al. 1987). Ähnlich niedrige Grenzwerte wurden in Studien, beispielsweise in der Euronut SENECA und SUVIMAX Studie, ermittelt, die sich vorrangig nur an den jeweils gemessenen 25(OH) D Werten einer Kohorte mit bestimmten Erkrankungen, wie beispielsweise Schenkelhalsfrakturen, orientierten (van der Wielen, Lowik et al. 1995; Chapuy et al. 1997). Die meisten Studien ziehen jedoch das Ansteigen oder Abfallen diverser klinischer Laborparameter, insbesondere Krall et al., das Parathormon für die Ermittlung des Referenzwertes heran (Krall et al. 1989). Hinzu kommt die Problematik, dass nicht alle Studien auf Deutschland zu übertragen sind. Insbesondere die unterschiedliche geografische Lage der Studienorte, welche teils deutlich unterschiedlicher Sonneneinstrahlung im Jahr unterliegen, spielt eine große Rolle. Ebenso bleibt eine möglicherweise andere Nahrungszusammensetzung der einzelnen Länder nicht ohne Auswirkung auf den 25 (OH) D Spiegel. Weltweit gibt es bis heute keine großen Studien, die eine Statuserhebung des 25(OH) D Serumspiegel innerhalb eines weiblichen Kollektivs, unter Ausschluss von bekannten osteologischen Erkrankungen und pathologischen Frakturen, erheben.

McKenna et al. versuchten durch den Vergleich verschiedener Studien, welche das Parathormon als Suregatparameter bestimmen, Referenzwerte für das 25(OH) D zu definieren. Als einen normalen Wert für 25(OH) D nahmen sie Werte über 40 ng/ml, eine Vitamin D Insuffizienz bis 20 ng/ml und einen Vitamin D Mangel bei unter 10 ng/ml an (McKenna und Freaney 1998). In den allermeisten Studien werden jedoch andere Grenzwerte festgesetzt, so dass es bis heute keinen einheitlichen Referenzwert für das 25(OH) Vitamin D gibt.

## 2.12 Evaluierung des Knochenstatus und der Knochenqualität

Im Rahmen der Diagnostik des Knochenstatus und der Knochenqualität kommen insbesondere 4 Methoden zum Tragen: Die Bestimmung spezifischer Laborparameter, das konventionelle Röntgen, die Knochendichtemessung, die Knochenhistologie und –histomorphometrie.

Laborparameter eignen sich aufgrund ihrer teilweise ausgeprägten Schwankungen nur bedingt zur vollständigen Beurteilung des Knochenmetabolismus. Ähnlich wie der Tumormarker, beispielsweise das PSA (Prostata spezifisches Antigen) im Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom, dienen sie vornehmlich der initialen Stuserhebung und Verlaufskontrolle der entsprechenden Knochenerkrankung. Zu den unspezifischen Markern des Knochenmetabolismus zählen Kalzium, Phosphat, alkalische Phosphatase, 25(OH) Vitamin D, Parathormon, Cortisol, Kreatinin, Schilddrüsenparameter und die Sexualsteroiden. Eine genaue Aussage darüber, in welchem Ausmaß eine bestimmte Veränderung der Knochenstruktur oder –qualität vorliegt, lässt sich anhand dieser Werte nicht feststellen.

Bei gezielter Fragestellung kommt in der Osteologie die Bestimmung spezifischer Marker zum Einsatz. Dabei steht im Mittelpunkt der osteokatabole Parameter Hydroxyprolin, dieser Wert weist auf einen vermehrten Kollagenabbau hin. Im Urin messbare Knochenabbauparameter sind Desoxypyridinolin und Telopeptid-Kollagen-Crosslinks, letztere entstehen beim Abbau von Kollagen und Elastin. Die Tartrat-resistente saure Phosphatase wird durch die Osteoklasten produziert und liegt vermehrt bei erhöhter Aktivität vor. Osteoanabole Marker sind die durch Osteoblasten synthetisierte knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP) und das Osteocalcin.

Das konventionelle Röntgen bietet aufgrund seiner kostengünstigen, schnellen und hohen Verfügbarkeit ein gutes diagnostisches Mittel, Pathologien des Knochens festzustellen. So kann eine vermehrte Strahlendurchlässigkeit auf eine Osteopenie hinweisen. Gleichfalls können Deformitäten des Knochens, Frakturen, Tumoren und Metastasen erkannt werden. Problematisch ist jedoch, dass sich Veränderungen im Röntgenbild

bei einigen erst bei ausgeprägtem Krankheitsbild darstellen lassen. Schnittbildverfahren können hier hilfreich sein.

Weitaus größere Bedeutung besitzt in der Diagnostik der Osteoporose die Knochendichtemessung mittels DXA (Dual-Energy X-Ray Absorptiometry) und QCT (Quantitative Computertomography). Wie Dalen zeigen konnte, besteht ein enger Zusammenhang zwischen Knochendichte und Knochenfestigkeit (Dalen et al. 1976). Bei der DXA handelt es sich um eine planare Messtechnik. Hierbei werden zumeist verschiedene definierte Skelettanteile vermessen. Man macht sich dabei den Effekt der Knochendichte entsprechender zunehmenden oder abnehmenden Absorption der Röntgenstrahlen einer definierten Fläche zunutze. Die Absorptionswerte werden in  $\text{g}/\text{cm}^2$  gemessen. Die ermittelten Werte werden dann in Bezug zu dem t-score oder z-score gesetzt. Der t-score stellt die Standardabweichung der bei einem 30 jährigen Kollektiv ermittelten Knochendichte da. Der z-score zieht die Werte eines Kollektivs des jeweiligen Alters heran. Dies ermöglicht eine einfache und von der WHO ebenfalls verwendeten Einteilung der ermittelten Werte in normaler Knochen, Osteopenie und Osteoporose.

Das QCT zählt zu den volumetrischen Messverfahren. Hierbei wird ein dreidimensionales Messfeld, zumeist dass eines Lendenwirbelkörpers, ermittelt und in Gramm pro Kubikcentimeter erfasst. Auch hier hat sich die Berechnung und Angabe des t- bzw. z-score durchgesetzt. Die QCT ermöglicht eine höhere Bildqualität und verfügt über die Möglichkeit der separaten Vermessung des kortikalen und spongiösen Knochens. Aufgrund ihrer geringeren Reproduzierbarkeit, erhöhter Kosten und der nicht zuletzt höheren Strahlenbelastung erlangt sie derzeit einen geringeren Stellenwert in der Diagnostik.

Die exakte Diagnose einer Knochenerkrankung wie der Osteomalazie kann jedoch weiterhin nur durch die Knochenbiopsie gestellt werden. Der Goldstandard der histologischen Untersuchung stellt die Histomorphometrie dar (Parfitt 1985). Dabei handelt es sich um ein quantitatives Verfahren.

Es lassen sich grundsätzlich vier verschiedene Parameter bestimmen: Die Strukturparameter, wie beispielsweise die Trabekeldicke (Trabecular thickness: TbTh  $\mu\text{m}$ ) oder das Knochenvolumen (Bone volume / tissue

volume: BV/TV %). Als statische Knochenformatiosparameter sind beispielsweise die Osteoidoberfläche (Osteoid surface / bone surface: OS/BS %) und Osteoblastenzahl ( Numbers of osteoblast / bone parameter NOb/BPm) zu nennen. Ein Wert für die dynamischen Knochenformatiosparameter ist die Mineralisationsoberfläche (Mineralization surface / bone surface: MS/BS %). Als viertes sind die Knochenresorptionsparameter zu nennen, der unter anderem durch die Osteoklastenoberfläche (Osteoclast surface / bone surface: OS/BS %) charakterisiert werden.

Damit lässt sich anhand der Knochenhistomorphometrie ein differenzierteres Bild über Struktur und Qualität des Knochens gewinnen, als es derzeit mit einem anderem der o.g. Verfahren bisher möglich ist (Compston 1997).

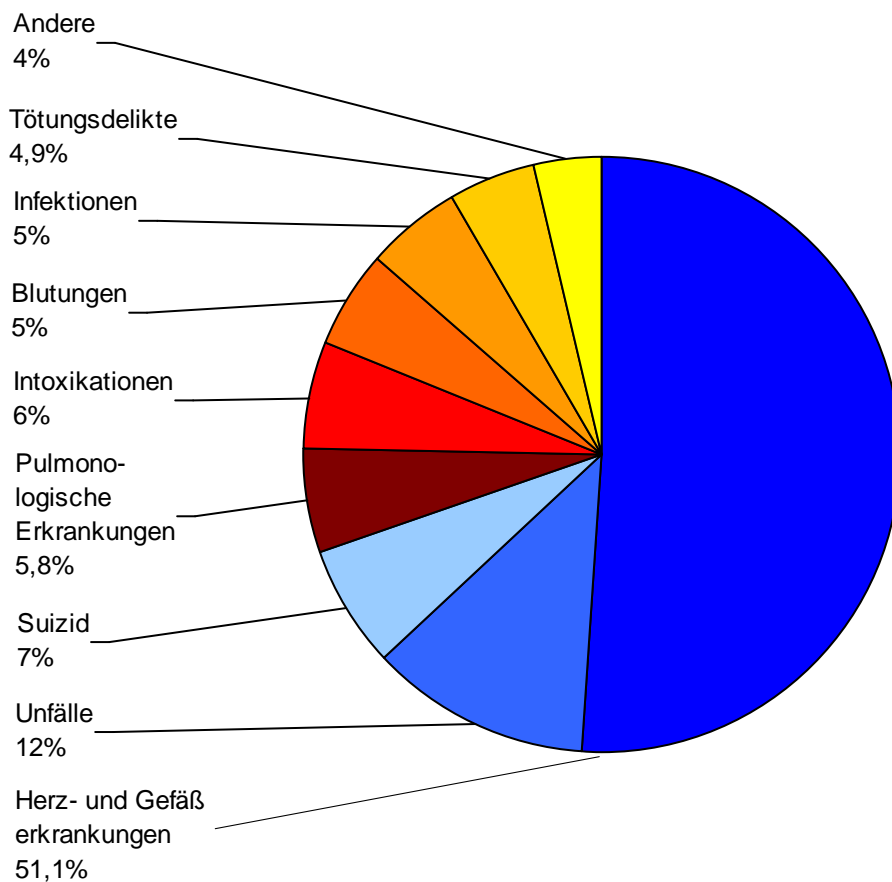
Mit Standardverfahren können zahlreiche Knochenerkrankungen diagnostiziert werden.

Die Histologie und Histomorphometrie kann im Einzelfall, vor allem bei dem Verdacht einer Mineralisierungsstörung, sinnvoll sein.

### 3 Material und Methode

#### 3.1 Patientenkollektiv

Zwischen 2006 und 2007 wurden im Rahmen der routinemäßigen Sektion im Institut für Rechtsmedizin in Hamburg bei 274 Frauen Beckenkammbiopsien und Serumproben zur Vitamin D Bestimmung entnommen. Es lag ein Kollektiv vor in dem alle Altersklassen, ausgenommen die unter 1 jährigen, vertreten waren. Aus der Studie ausgeschlossen wurden Personen, die nicht über ein Jahr alt waren oder Erkrankungen, wie beispielsweise Niereninsuffizienz und Malignome, die sekundäre Osteopathien verursachen. Ebenso war ein vollständiger Autopsiebericht erforderlich, welcher Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht und Todesursache beinhaltet. Wie die grafische Darstellung der Todesursachen zeigt, sind die Haupttodesursachen mit 51,1% bei den untersuchten Frauen Herz- und Gefäßerkrankungen, gefolgt von tödlichen Unfällen mit 11,9%.



**Abb. 5:** Prozentuale Verteilung der Todesursachen

Auf diese Weise wurde ein Kollektiv mit über 274 Probandinnen ermittelt. Die Biopsien wurden spätestens 48 Stunden nach Eintreten des Todes entnommen, bei konstanter Temperatur von 4°C gelagert und spätestens 12 Stunden nach Entnahme der weiteren Aufbereitung zugeführt. Alle gewonnenen Datensätze wurden anonymisiert und digital archiviert.

### **3.2 Probengewinnung**

Im Institut für Rechtsmedizin in Hamburg wurde durch das dortige Personal, entsprechend der Lokalisation, nach Bordier eine transiliakale Beckenkammbiopsie entnommen. Mit einem Schnitt 2 cm dorsal der Spina iliaca anterior superior und einer 2 cm inferior der Crista iliaca (Bordier et al. 1964).

10 ml des Blutes der Frauen wurde aus der Arteria femoralis entnommen. Anschließend wurde sowohl die Beckenkammbiopsie als auch das Blut maximal 6 Stunden in einem Kühlraum bei konstant 4°C gelagert.

### **3.3 Zuschneiden der Beckenkammbiopsie**

Zur weiteren Aufbereitung wurde innerhalb von 12 Stunden mittels einer Diamantbandsäge (Typ.No. 36/137, Exakt Gerätebau, Norderstedt, Deutschland) aus den Biopsien ein 1x1 cm großes Präparat heraus geschnitten. Hierbei wurde die Schnitfführung direkt unterhalb des Abschlusses der Crista iliaca angesetzt. Die Diamantbandsäge basiert auf dem Prinzip eines Trennschleifsystems. Die Säge wird mit einem Diamantsägeblatt betrieben. Sie verfügt über eine Präzisionsparallelführung, manuellem Vorschub und einem Wasserkühlsystem. Dies ermöglichte äußerst präzises und artefakt freies Schneiden und aufgrund der Wasserkühlung das Arbeiten mit sehr festen Materialien. Der Präparatvorschub wurde manuell gesteuert.

### 3.4 Konservierung der Beckenkammbiopsie

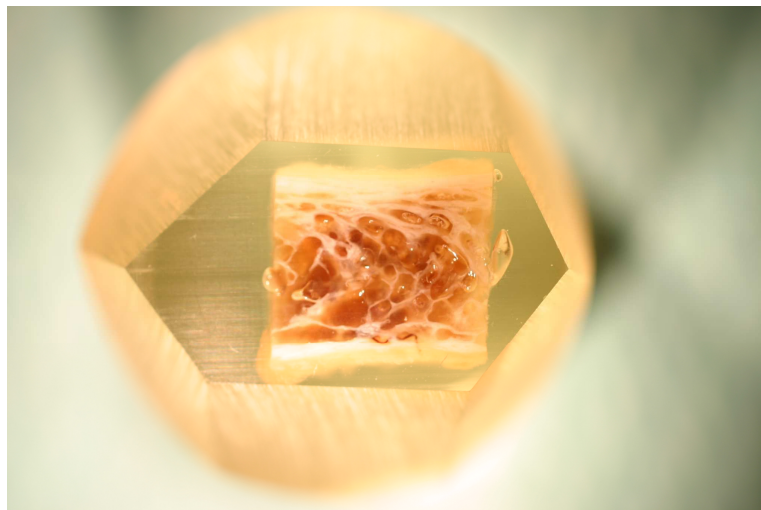
Zur Fixation wurden die Präparate bei 20°C für 3 Tage in mit PBS-gepuffertem 3,7%igen Formalin gegeben. Im Anschluss erfolgte die Dehydrierung der Biopsien mittels eines Entwässerungsautomaten (Modell Nr. 2050/1.5, BAVIMED, Birkenau, Deutschland). Die Präparate wurden hierzu in ein zylinderförmiges Sieb gegeben, welches in die Halterung des Karussells eingespannt wird. Mittels Zeitschaltuhr erfolgte dann über 24 Stunden die gleichmäßige Dehydrierung, bei 70%igem Alkohol beginnend, steigend in Fünferschritten bis zu 100%igem Alkohol (Apotheke UKE).

Hierauf folgte über 2 Tage, bei konstant 4°C, eine jeweils 24-stündige Einlage in eine Infiltrationslösung, bestehend aus 1000ml Methylmethacrylat (Merck 800590), 100ml Nonylphenyl-polyethylenglycolacetat (Fluka-Biochemika 74432) und 3,3g Benzoylperoxid (Merck 801641). Die Infiltration diente der Verhinderung der vorzeitigen Polymerisation im nächsten Arbeitsschritt.

Zur endgültigen Konservierung und Verbesserung der Schnittfähigkeit des Materials wurden die Präparate in Rollrandschnappgläser eingebracht und in 10-15ml Methylmethacrylat (Amling, Priemel et al. 1999) eingebettet. Hierzu wurden 1000ml Methylmetacrylat (Merck 800590), Nonylphenyl-polyethylenglycolacetat (Fluka-Biochemika 74432) und 6,6g Benzoylperoxid (Merck 801641) benutzt. Als Katalysator für die Polymerisationsreaktion wird in einem Verhältnis von 200:1 gut vermengt und N,N Dimethyl-p-Toluidin (Merck 822040) dazu gegeben. Die Einbettgefäße wurden luftdicht verschlossen und zur Vermeidung einer überschießenden Polymerbildung in einem Wasserbad über mindestens 12 Stunden bei 4°C aufbewahrt. Nach vollständiger Polymerisation wurden die Blöcke aus den Glasbehältern herausgeschlagen.

### 3.5 Verarbeitung der Acrylblöcke

Die ausgehärteten Acrylblöcke wurden mittels rotierendem Mikroschleifsystem (Phoenix Alpha; Fa. Buehler, Düsseldorf, Deutschland) plan und in Form eines Sechsecks geschliffen, so dass bereits mit den ersten Schnitten des Mikrotommessers die richtige Ebene des Knochens getroffen wurde. Auf diese Art wurde eine unnötige Abnutzung des Messers und der Verlust von Knochenmaterial verhindert. Zur Anwendung kam hier Nass-Schleifpapier P 80 Körnung (Fa. Hermes, Hamburg, Deutschland).



**Abb. 6:** In Form eines Sechsecks geschliffener Acrylblock mit Beckenkammbiopsie

Zum Herstellen der 3µm dicken mikroskopierfähigen Präparate wurden die Acrylblöcke mit einem Rotationsmikrotom (CVT 4060E, micro Tec, Walldorf, Germany) und einem Mikrotommesser aus Hartmetall geschnitten.

Die Schnittebene war hierbei als Frontalebene in Bezug auf das Becken, entlang der beiden Kortikalis, gewählt worden.

Um die Rate von Bruchartefakten möglichst gering zu halten, wurde regelmäßig die Oberfläche des Messers und der Schnittseite des Präparats mit Schneidflüssigkeit (WIV Schneidflüssigkeit, Fa. WIV Schwetzingen, Deutschland) benetzt. Auf dem so entstandenen Flüssigkeitsfilm konnten die Schnitte mit einem Haarpinsel auf den Objektträger gezogen werden (Baron 1983; Schenk 1984; Malluche et al. 1986).



Zur Haftung der Schnitte waren die Objektträger mit Chromalaungelatine beschichtet.

Eine Streckung der Schnitte erfolgte mit 96%igem Ethanol (Apotheke UKE). Durch die Auflage einer Polyethylenfolie über die Präparate bestand Schutz vor dem Haftenbleiben an Stempelkissen und anderen Objektträgern.

Mittels eines Stempelkissens wurde überschüssiges Ethanol zwischen Objektträger und Folie entfernt.

Zur endgültigen Fixierung wurden die Schnittpräparate in eine Objektträgerpresse eingespannt und für 24 Stunden bei 42°C gelagert.

### **3.6 Färbung der Beckenkammbiopsie**

Um die Struktur und Mineralisierung der Beckenkammbiopsie bestimmen zu können, wurde nach van Gieson/ von Kossa gefärbt. Hiermit ließen sich mineralisierte Knochenanteile schwarz färben. Nichtkalzifizierte Strukturen wie Knochenmark, Osteoid und andere am Umbau des Knochens beteiligte Zellen stellten sich in unterschiedlich starken Rottönen dar.

Nach dem Entfernen der Polyethylenfolie gab man die Schnitte auf den Objektträgern zur Auflösung des Methylmethacrylat 3x für 5 Minuten in 2-Methoxymethylacetat (Merck 806061), in einem weiteren Schritt über eine absteigende Äthylalkoholreihe über 2 x 100%, 96%, 80%, 70% und 50% für jeweils 2 Minuten. Anschließend wurden die Präparate kurz mit Aqua dest. gespült.

Für die Versilberung der mineralisierten Knochenanteile wurden die Schnitte 5 Minuten in 3%igem Silbernitrat gefärbt, auf die eine über 30 minütige Spülung mit Leitungswasser folgte. Der nächste Schritt stellte eine 5 Minuten lange Färbung in Sodaformol dar.

Hierauf erfolgte abermals eine Spülung mit Leitungswasser für 10 Minuten.

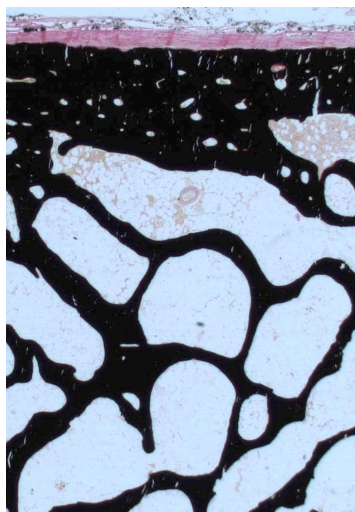
Den Abschluss der Versilberung stellte, die 5 Minuten lange Färbung mit Natriumthiosulfat und eine 10 Minuten dauernde Spülung mit Leitungswasser dar.

Zur Färbung der nichtmineralisierten Anteile des Knochens kam für 20 Minuten van Gieson-Farbe zur Anwendung.

Vor dem Entwässern erfolgte eine kurze Waschung in Leitungswasser. Die Entwässerung vollzog sich in einer bei 70% beginnenden aufsteigenden Äthylalkoholreihe über 80%, 96% und 2x 100% Äthylalkohol für ca. 2 Minuten.

Zur Entfernung von Rückständen an den Objektträgern wurden die Präparate 3mal in Xylol für je 5 Minuten gewaschen.

In einem letzten Arbeitsschritt wurden mittels Deckgläsern und DPx als Kleber die Präparate eingedeckt.



**Abb. 7:** Histologisches Bild einer regelrecht mineralisierten Beckenkammbiopsie. Färbung nach van Gieson/ von Kossa, 50x Vergrößerung.

### 3.7 Histomorphometrische Auswertung

Bei der histomorphometrischen Auswertung handelt es sich um ein quantitatives Verfahren. Damit ließen sich Aussagen über statische Vorgänge am Knochen treffen.

Zur Bestimmung wurde nach dem Standard der ASBMR für die Analyse der jeweiligen Osteoid- und mineralisierten Trabekel die beiden Bildanalysesysteme Bioquant (Bioquant Image Analysis Inc., Nashville, TN, USA) und OsteoMeasure (Osteometrics Inc., Atlanta, Georgia, USA) eingesetzt.

In den beiden verwendeten Systemen wurden aus zweidimensionaler Betrachtung heraus die Parameter Volumen, Anzahl, Oberfläche und Dicke bestimmt.

Über die Verrechnung der gemessenen Parameter ließen sich folgende Werte bestimmen.

#### Strukturparameter:

- Bone Volume per Tissue Volume (BV/TV): Knochenvolumen im Verhältnis zum Gewebevolumen, Angabe in Prozent
- Trabekeldicke (Tb.Th.): Angabe in  $\mu\text{m}$
- Trabekelanzahl (Tb.N.): Absolute Anzahl pro gemessene Fläche
- Trabekulärer Abstand (Tb.Sp.): Abstand zwischen den Knochenbalken (Tb.Sp.), Angabe in  $\mu\text{m}$

#### Statische Knochenstrukturparameter:

- Osteoidvolumen pro Gewebevolumen (OV/TV): Osteoidvolumen im Verhältnis zum Gewebevolumen, Angabe in Prozent
- Osteoidvolumen pro Knochenvolumen (OV/BV): Osteoidvolumen im Verhältnis zum Knochenvolumen, Angabe in Prozent
- Osteoidoberfläche pro Knochenoberfläche (OS/BS): Osteoidoberfläche im Verhältnis zur Knochenoberfläche, Angabe in Prozent

Bei der Auswertung mittels OsteoMeasure und Bioquant handelt es sich um semiquantitatives Verfahren zur Bestimmung der Strukturparameter und statischer Knochenformationsparameter. Dieses System wurden in Verbindung mit einem Mikroskop (Axioskop 40, Fa. Carl Zeiss Vision GmbH, Deutschland) betrieben.

### **3.8 Gewinnung der Blutprobe**

Bei jeder Sektion wurde zeitgleich mit der Entnahme der Beckenkammbiopsie aus der Arteria femoralis eine 10ml Blutprobe entnommen. Bis zur Zentrifugation der Proben am selben Tag lagerten sie Licht geschützt bei 4°C.

Das Plasma wurde bei 4500 U/min 7 Minuten lang abzentrifugiert.

Da alle gesammelten Plasmaproben am Ende der Studie ausgewertet wurden, lagerten sie bis zu diesem Zeitpunkt bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.9 Bestimmung des 25(OH) Vitamin D Serumspiegels**

Im Rahmen einer klinischen Untersuchung wurde Probanden Serum entnommen und die Stabilität des 25(OH) Vitamin D ex vivo gezeigt.

Die Bestimmung aller 25(OH) Vitamin D Werte wurde durch das Institut für Klinische Chemie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg durchgeführt. Zur Verwendung kam dabei ein Radioimmunoassay (Dia Sorin, Stillwater, MN).

Eine Bestimmung des Serumgehaltes an 25(OH) Vitamin D, Parathormon und Kalzium konnte aufgrund seiner Instabilität nach dem Tod nicht durchgeführt werden.

### **3.10 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Arbeit (Lineare und nicht-lineare Regression nach der Methode der kleinsten Quadrate, Pearson-Korrelationskoeffizienten und entsprechende t-Tests auf Unkorreliertheit) wurde mit Hilfe des Computerprogramms Microsoft Office Excel durchgeführt.

Zu stark abweichende Koordinatenpunkte wurden dabei an Hand der Grafiken visuell identifiziert und aus den Berechnungen ausgeschlossen, wodurch sich die Gesamtzahl der Frauen mitunter reduziert. Ergab die visuelle Inspektion Hinweise auf einen kurvenlinearen Verlauf, wurde eine geeignete Familie von Transformation gewählt, um diesen Verlauf zu modellieren. Anschließend wurden die Parameter, die diese Familie charakterisieren, nach der Methode der kleinsten Quadrate optimiert. Da ausschließlich streng monotone Transformationen verwendet wurden, beeinträchtigte dies die Interpretation der Zusammenhänge nicht.

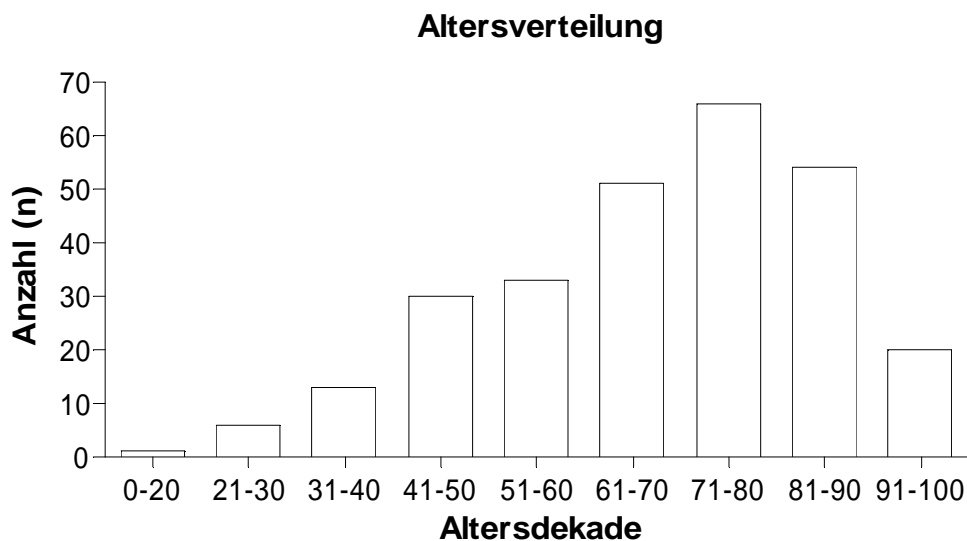
Signifikante Unterschiede zwischen Gruppen wurden mittels student t-test berechnet und mit einem Stern markiert, sobald das Signifikanzniveau bei  $p \leq 0,05$  lag.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung des Kollektivs

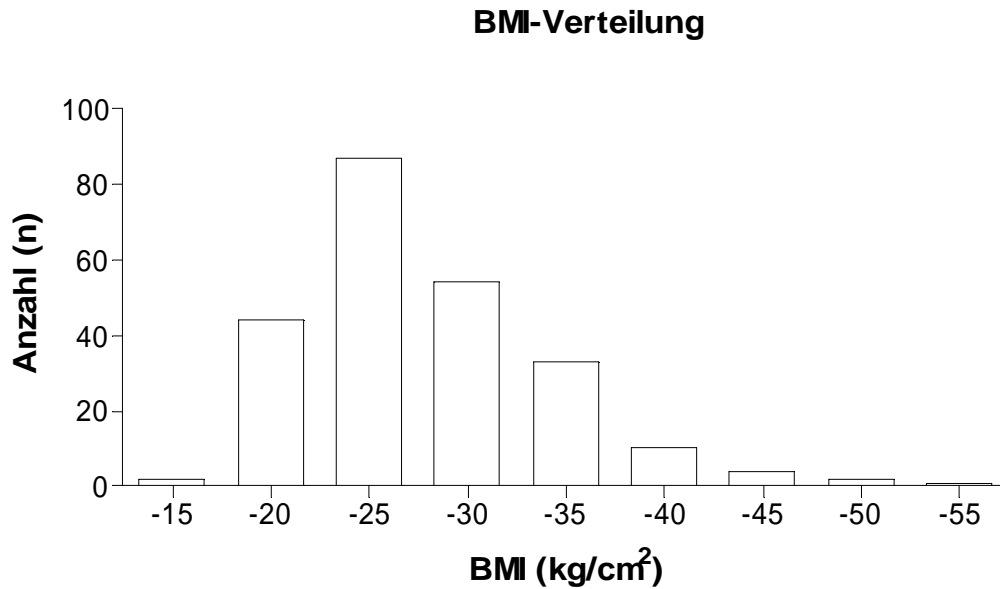
In dem allerersten Schritt der Auswertung der gewonnenen Daten ging es darum das Kollektiv zu charakterisieren. Hierzu wurden verschiedene Daten, die aus den Unterlagen der Rechtsmedizin Hamburg gewonnen wurden, verwendet. So wurde unter anderem das Alter, Body Mass Index (BMI) und die Todesursache ermittelt.

Insgesamt kamen Proben von 274 Frauen zur Auswertung. Hierbei ergab sich ein Altersdurchschnitt von 68,3 Jahren, der Median lag hierbei bei 71 Jahren.



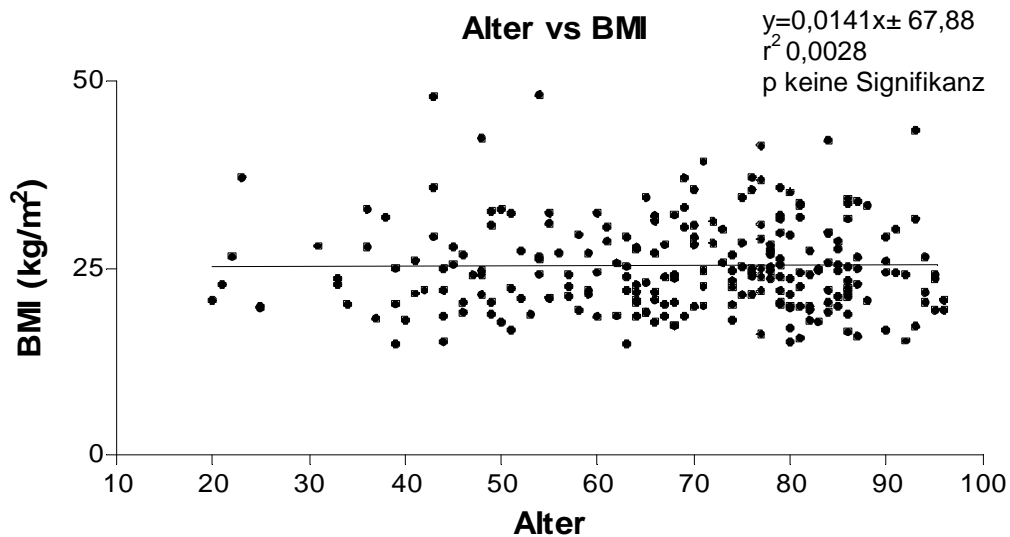
**Abb. 8:** Altersverteilung der Frauen in Jahren und absoluter Anzahl.

Die ermittelten Werte des Body Mass Index lieferten folgende Ergebnis: Der Mittelwert des BMI der 274 Frauen betrug 25,3 kg/cm<sup>2</sup>, der Median wiederum lag bei 24,2 kg/cm<sup>2</sup>.



**Abb. 9:** Absolute Verteilung der BMI-Werte.

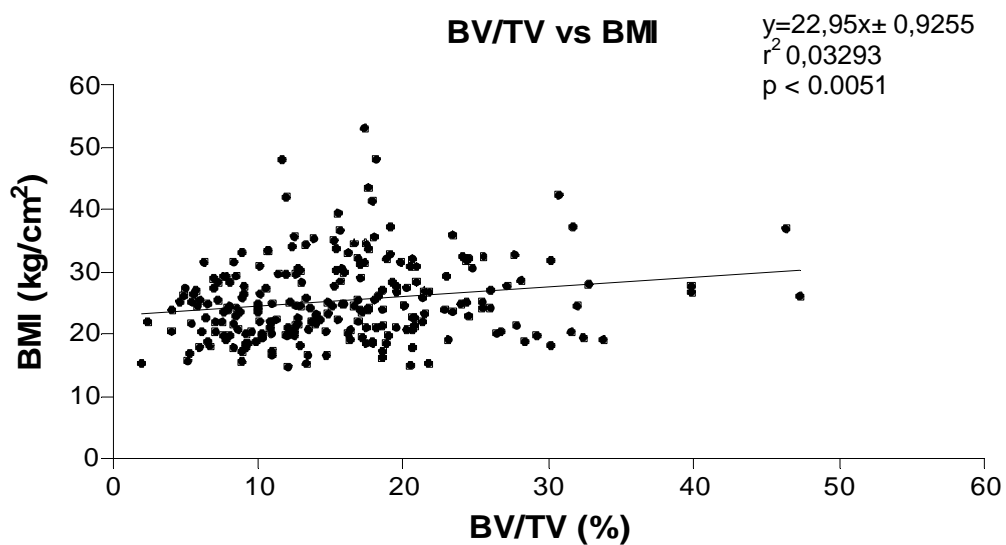
Dabei konnte mittels statistischer Berechnung kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter und BMI ermittelt werden. Nach der WHO, im Jahr 2000, ist Übergewicht ab  $25 \text{ kg/m}^2$  definiert. Demzufolge hatten 43,5 % der untersuchten Frauen Übergewicht. Rund 20 % der untersuchten Frauen litten an Adipositas ( $\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$ ). Eine Berechnung einer etwaigen Korrelation zwischen Alter und BMI wurde durchgeführt, da in weiteren Schritten untersucht wurde, ob der Body Mass Index Einfluss nimmt auf Mineralisierung und Struktur des Knochens. Durch die gleichmäßige Verteilung der Werte innerhalb des unterschiedlich alten Patientenkollektivs verringerte sich die Wahrscheinlichkeit, dass ein scheinbarer Zusammenhang zwischen BMI und einem anderem Parameter aufgrund einer Altersabhängigkeit erscheint oder existiert.



**Abb. 10:** Auftragung der BMI-Werte gegen das entsprechende Alter, die statistische Berechnung ergab keine Signifikanz.

#### 4.2 Zusammenhang von Knochenvolumen und BMI

Die statistische Untersuchung der ermittelten Werte für das BV/TV und die entsprechenden BMI Werte zeigte einen signifikanten Zusammenhang auf. Ein Pseudozusammenhang zwischen BMI und BV/TV, verursacht durch das Alter, konnte, wie die Auftragung des BMI vs Alter wie Abb. 10 zeigt, ausgeschlossen werden.



**Abb. 11:** BV/TV vs BMI. Signifikanter Anstieg des BV/TV bei zunehmendem BMI.

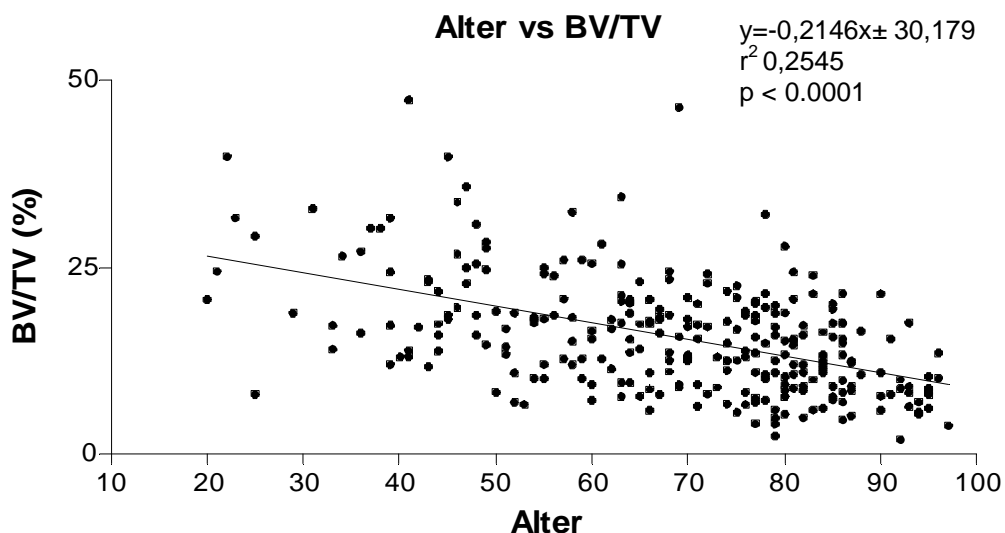


### 4.3 Knochenstrukturparameter bei Frauen abhängig vom Alter

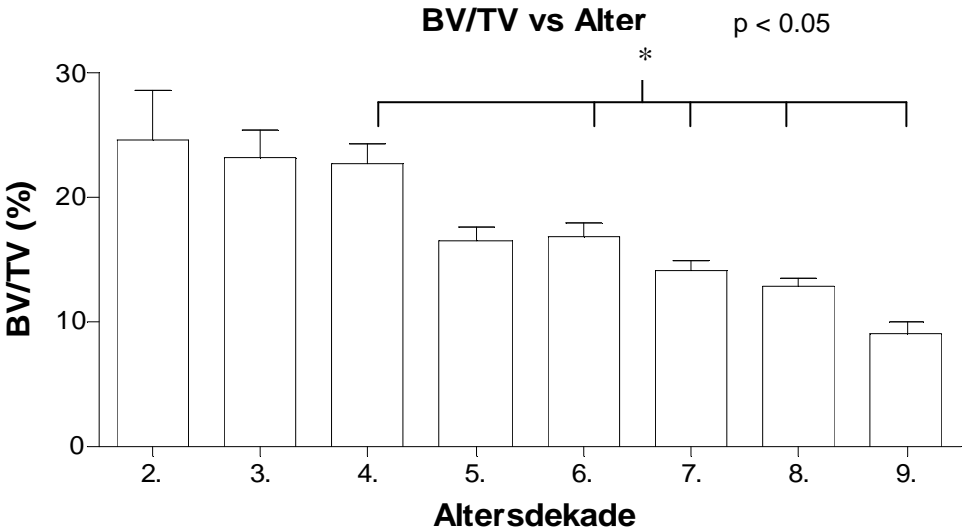
Bereits die tabellarische Auftragung der Strukturparameter ließ einen Zusammenhang zwischen dem Alter und der Knochenstruktur vermuten. So war zu erkennen, wie in der 20. Dekade der Mittelwert des BV/TV noch bei 24,63% lag, in der 50. Dekade aber bereits auf 16,47% absank und diese Verringerung mit höherem Lebensalter der Patientinnen weiter zunahm.

Diese Tatsache sollte anhand eines Punktwolkendiagramms genauer ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde das Knochenvolumen (BV/TV) mit dem jeweiligen Alter der Frau ins Verhältnis gesetzt.

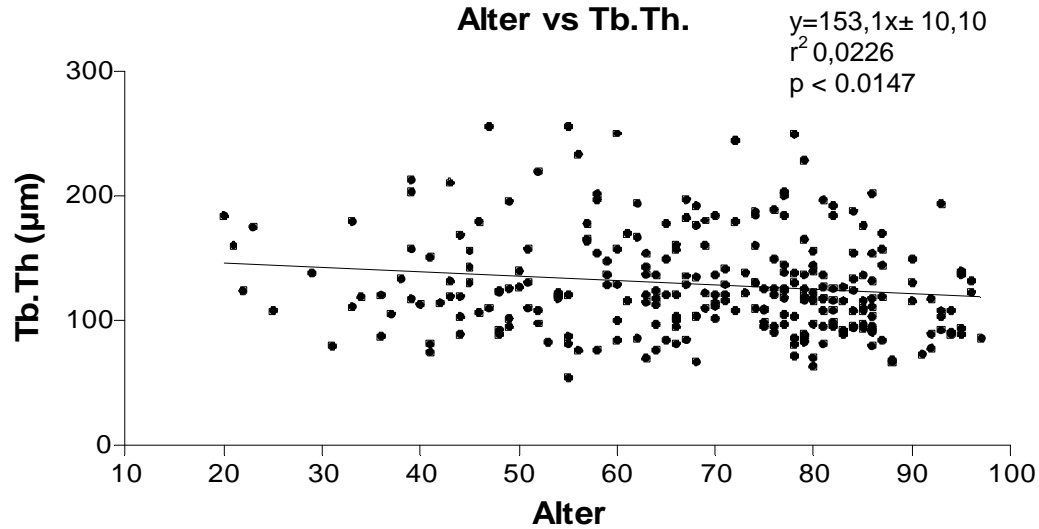
Hierbei zeigte sich, dass die Knochendichte in signifikantem Maß mit zunehmendem Alter hin abnahm. Ein signifikanter Abfall zeigte sich bei Betrachtung der Mittelwerte in der Gruppe der Altersdekade von 51 bis 60 Jahren im Vergleich zu jüngeren Frauen. Die Auftragung der Knochenparameter Tb.Th. und Tb.N. gegen das Alter zeigten jeweils einen signifikanten Abfall. Die Auftragung Tb.Sp. gegen das Alter ergab eine signifikante Zunahme des trabekulären Abstandes mit höherem Alter.



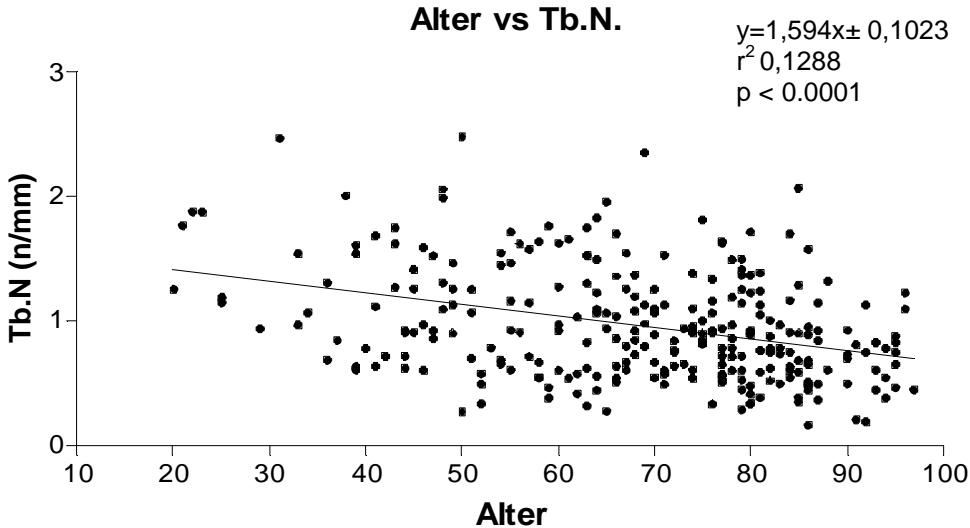
**Abb.12:** Auftragung des Knochenvolumens gegen das jeweilige Alter der Frauen. Zu beobachten war eine signifikante Abnahme des Knochenvolumens mit zunehmendem Alter.



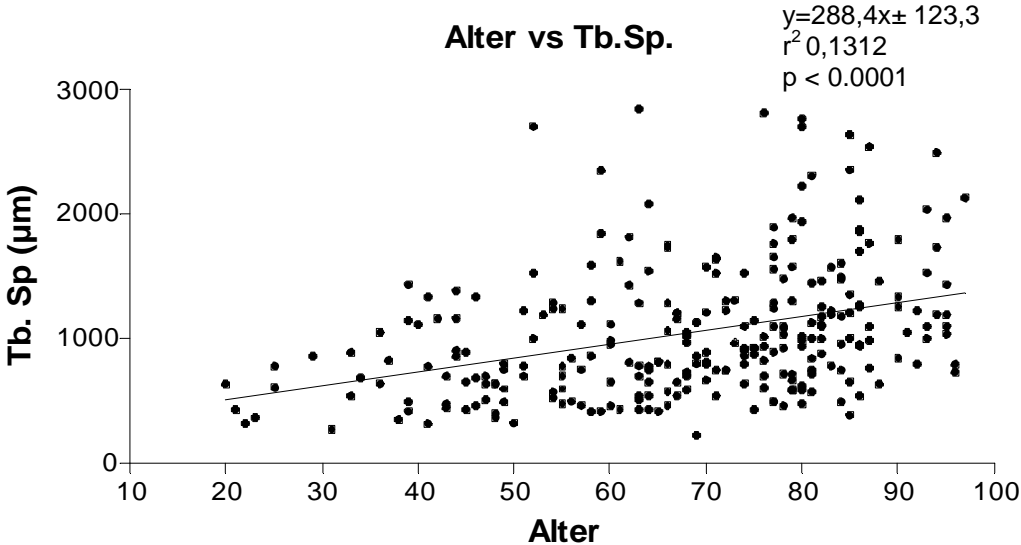
**Abb. 13:** Verteilung des Knochenvolumens gegen das Alter. Signifikanter Abfall des Knochenvolumens in der Altersgruppe der über 50 Jahre zu den 40 Jahre alten Frauen.



**Abb. 14:** Auftragung der trabekulären Dicke gegen das Alter. Es zeigt sich ein signifikanter Abfall der Trabekeldicke mit zunehmendem Alter.



**Abb. 15:** Verteilung der trabekulären Anzahl gegen das Alter mit signifikantem Abfall der Anzahl der Trabekel mit zunehmendem Alter.



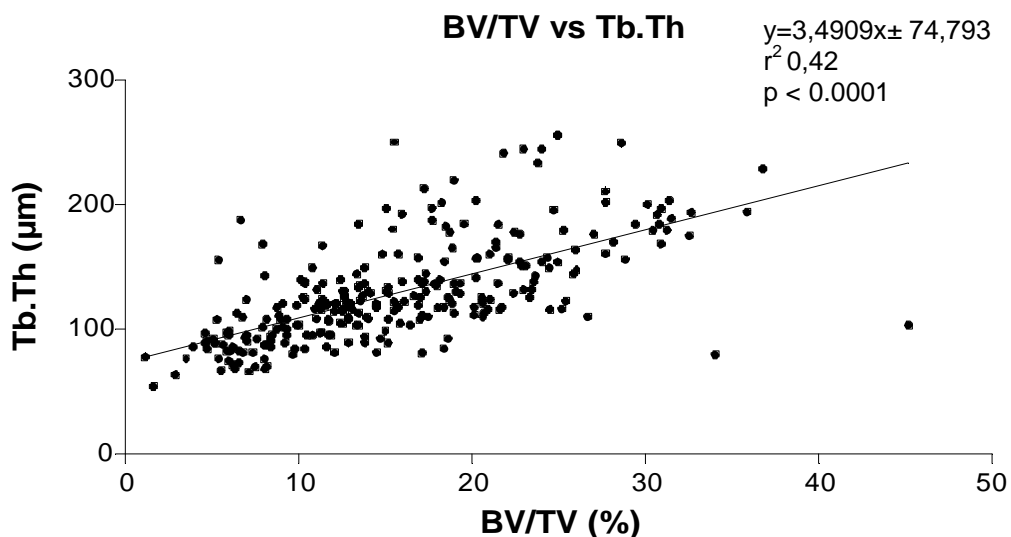
**Abb. 16:** Signifikanter Anstieg des trabekulären Abstandes mit zunehmendem Alter, bei Auftragung des trabekulären Abstandes gegen das Alter.

#### 4.4 Abhängigkeit der Knochenstrukturparameter zueinander

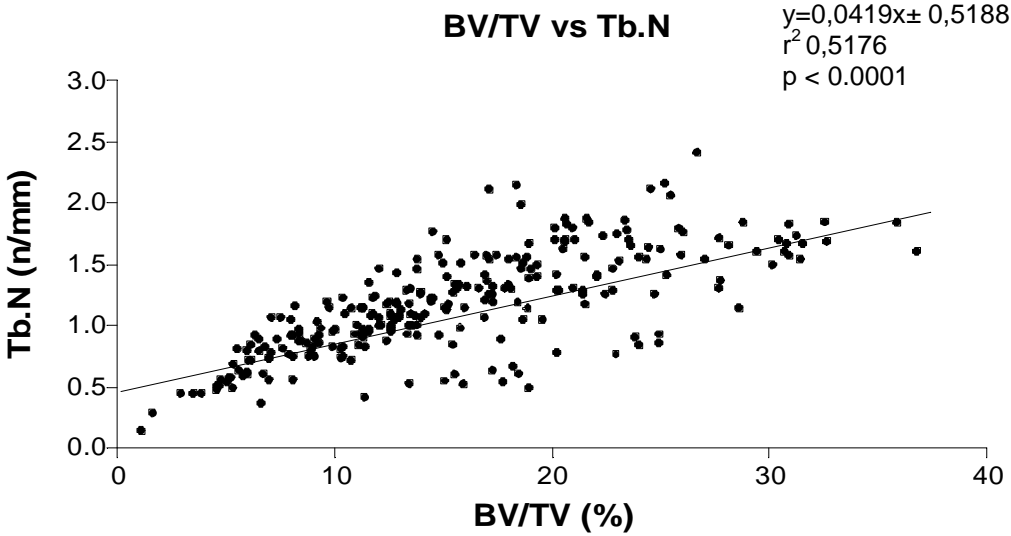
Infolge der gemachten Feststellung, dass eine Abhängigkeit zwischen dem Alter und den Strukturparametern bestand, galt es zu untersuchen, ob gleichfalls ein Zusammenhang zwischen den Strukturparametern untereinander bestünde. Hierzu wurden zunächst die Werte der Knochendichte (BV/TV) gegen die jeweilig gemessene Tb.Th. und Tb.N. aufgetragen. Gleichfalls wurde die Trabekuläre Dicke gegen die entsprechende Anzahl der Trabekel in ein Punktwolkendiagramm übertragen.

Auf diese Weise ließ sich zeigen, dass eine erhöhte Knochendichte sowohl mit einer signifikanten Erhöhung der Trabekeldicke als auch einer signifikanten Erhöhung der Trabekelanzahl einhergeht.

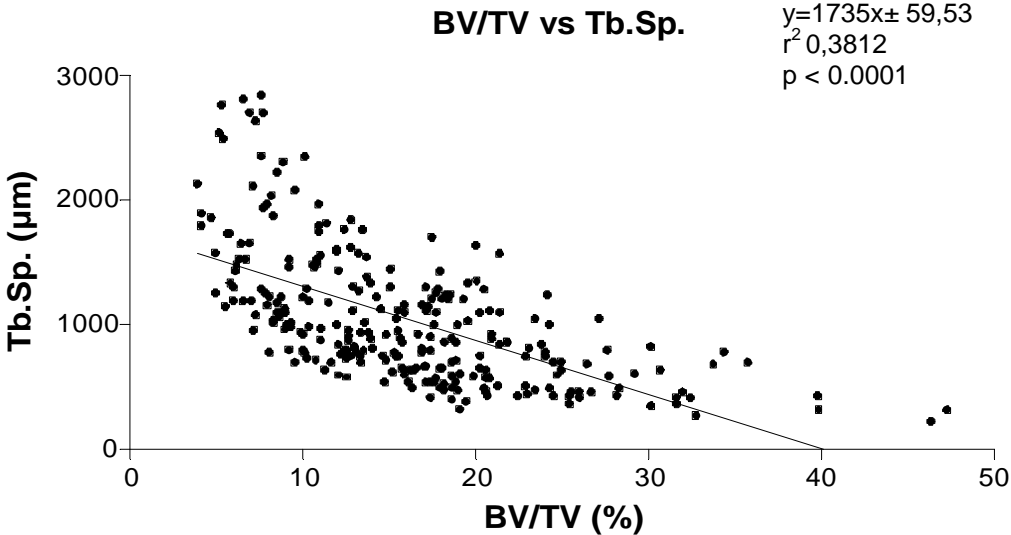
Die Auftragung der Trabekeldicke gegen den Abstand zwischen den Trabekeln wies ebenfalls ein signifikantes Maß eines Zusammenhanges auf.



**Abb. 17: BV/TV vs Tb.Th** Es liegt eine signifikante Verjüngung der trabekulären Dicke bei abnehmendem Knochenvolumen vor. Je höher das Knochenvolumen, desto höher die Trabekeldicke.



**Abb. 18:** Die Auftragung des Knochenvolumens gegen die trabekuläre Dicke zeigt einen signifikanten Zusammenhang. Je höher das Knochenvolumen, desto höher die Anzahl der Trabekel.



**Abb. 19:** Knochenvolumen gegen trabekulären Abstand. Signifikante Abnahme des trabekulären Abstandes bei zunehmendem Knochenvolumen.

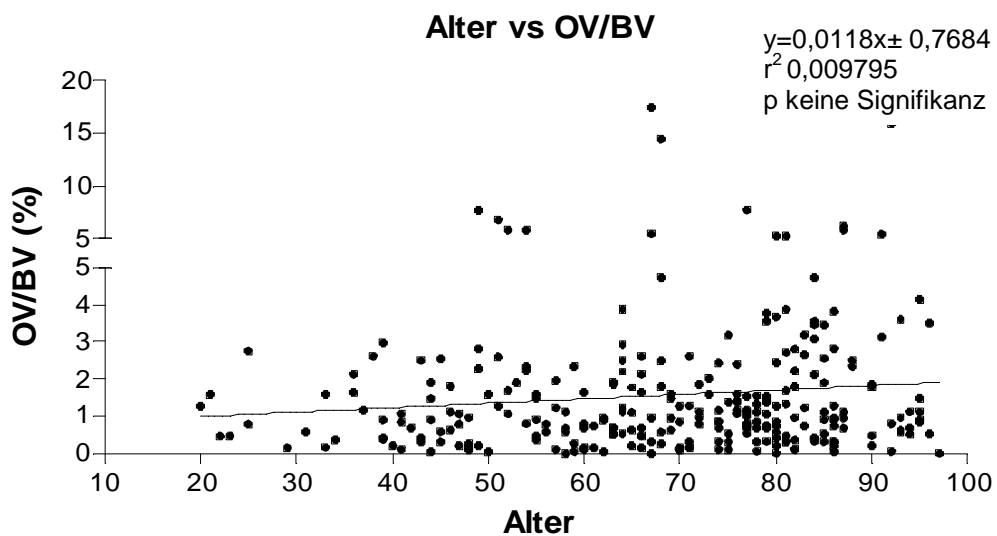
#### 4.5 Ermittlung des Anteils nicht mineralisierten Knochens

Die osteoidabhängigen Werte wurden einmal als Osteoid Volume per Bone Volume (OV/BV) und zum anderen als Osteoid Surface per Bone Surface errechnet und in Prozent angegeben.

Eine Korrelation zum Alter konnte nicht ermittelt werden. Es konnte aber bei einem Grenzwert von 1,2% OV/BV bei 40,9% der Frauen eine Volumenosteoidose nachgewiesen werden.

Das Hochsetzen des Grenzwertes auf 2% führt zu einer Prävalenz der Volumenosteoidose von 23,4%.

Bei einem festgelegten Höchstwert von 20% für OS/BS weisen 34,7% der weiblichen Probanden eine Oberflächenosteoidose.



**Abb. 20:** Altersverteilung des Osteoidvolumens. Über 40% der Frauen, unabhängig vom Alter, litten an einer Volumenosteoidose.

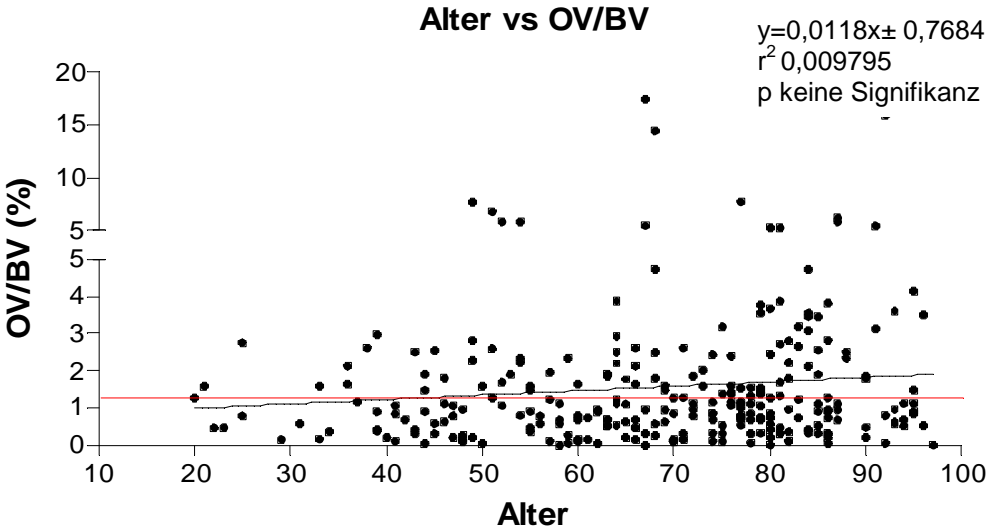


Abb. 21: Altersverteilung des Osteoidvolumens. 40,9% der untersuchten Frauen weisen eine Volumenosteoidose bei einem Grenzwert von 1,2% OV/BV auf.

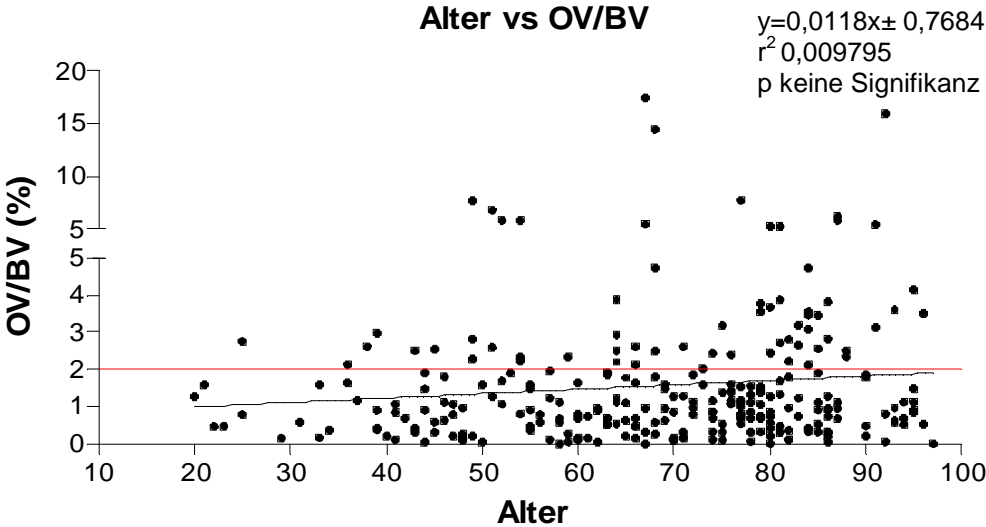
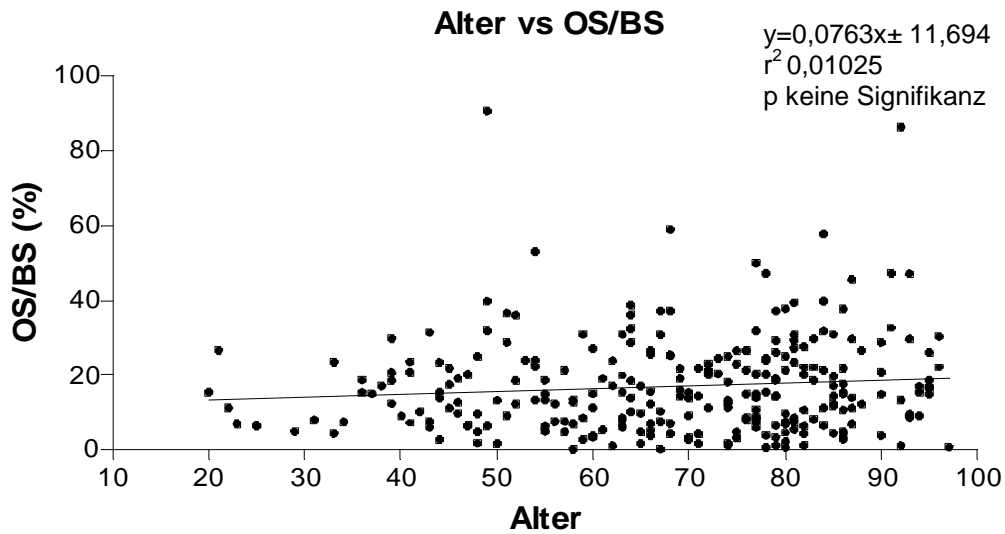


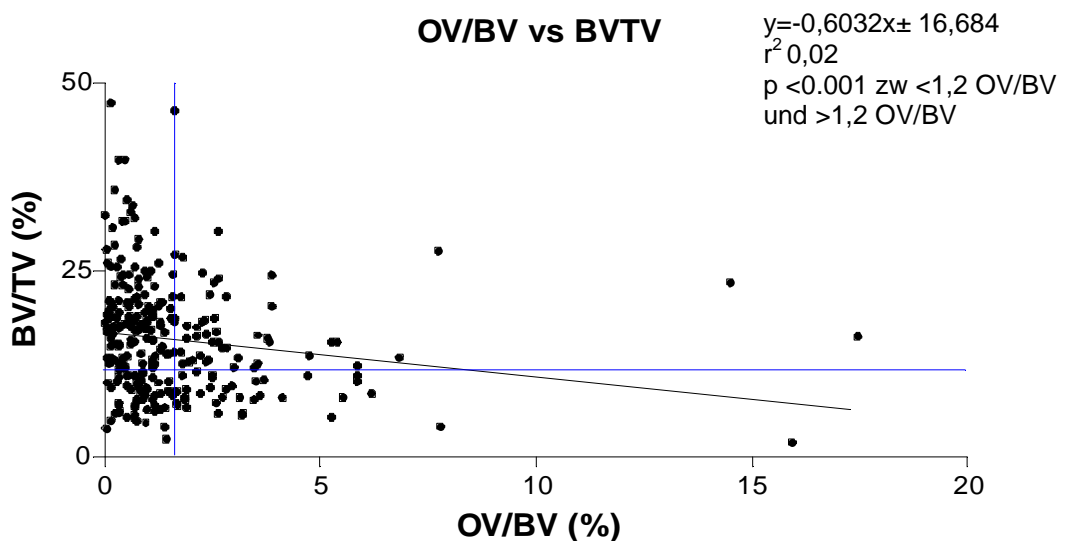
Abb. 22: Altersverteilung des Osteoidvolumens. 23,4% der Frauen zeigen eine Volumenosteoidose bei einem Referenzwert für OV/BV bei 2,0%.



**Abb. 23:** Altersverteilung der Osteoidoberfläche. Keine signifikante Korrelation zwischen OS/BS und dem Alter. Über 34% der Frauen, unabhängig vom Alter, hatten ein OS/BS über 20%.

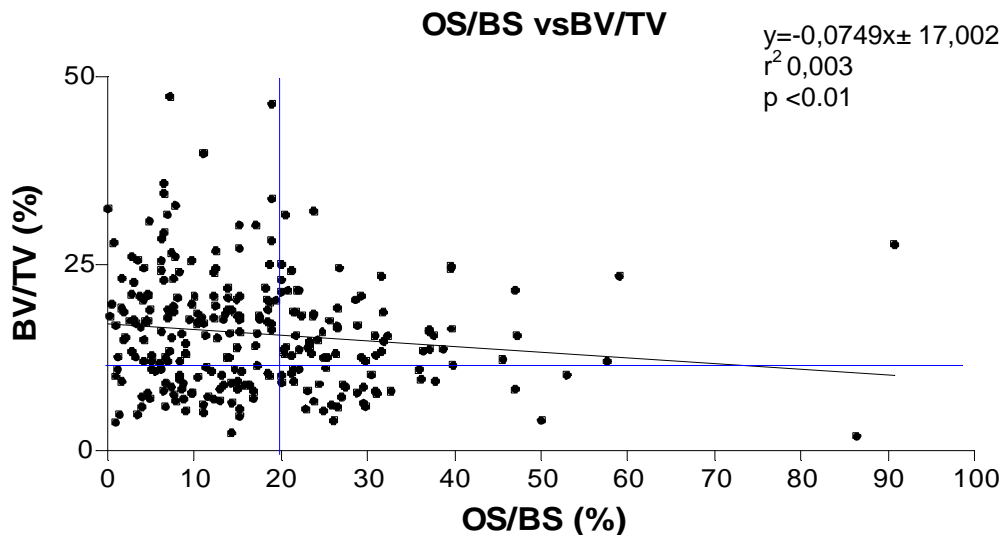
In der Gruppe der 30 jährigen wurde ein durchschnittlicher Normalwert für BV/TV von 20% errechnet. Damit errechnete sich bei 32 % der Frauen, die an einer Volumenosteoidose, OV/BV größer 1,2%, erkrankt waren, gleichzeitig ein verringertes Knochenvolumen.

Rund 28% der weiblichen Probanden mit einem OS/BS Wert über 20%, wiesen zeitgleich ein BV/TV von kleiner 20% auf.



**Abb. 24:** Auftragung des Osteoidvolumen gegen das Knochenvolumen. 32% der Frauen mit BV/TV unter 20% zeigten zeitgleich ein OV/BV über 1,2%.





**Abb. 25:** Auftragung der Osteoidoberfläche gegen das Knochenvolumen. 28% der Frauen litten gleichzeitig unter einem OS/BS über 20% und BV/TV unter 20%.

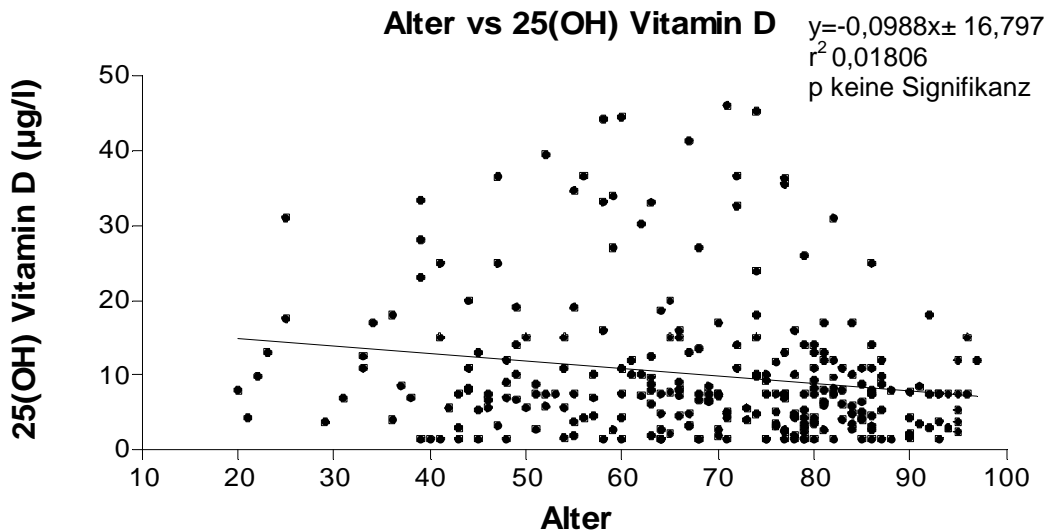
#### 4.6 25(OH) Vitamin D Status und dessen Auswirkung auf die Mineralisierung

Insgesamt wurden 274 Frauen auf ihren 25 (OH) Vitamin D Serumgehalt hin überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass 92,7% der Frauen einen zu niedrigen 25(OH) D Gehalt im Blut haben.

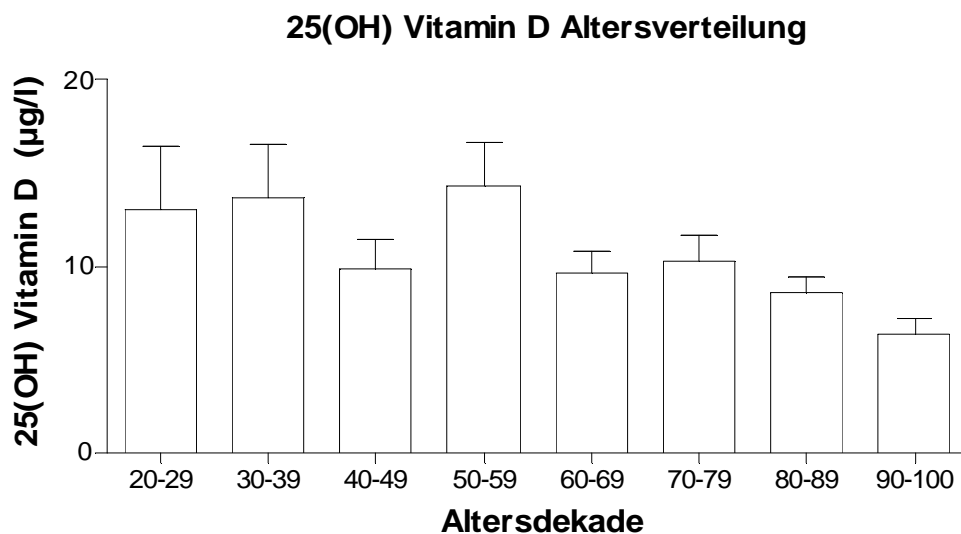
Unter Berücksichtigung der momentan gültigen Grenzwerte für das 25(OH) D Serum ergab sich: Im Bereich der Insuffizienz von  $<10-30\mu\text{g/l}$  lagen 22,99% der untersuchten Frauen. Über 69,71% der Spenderinnen wiesen mit ihren Werten von unter  $10\mu\text{g/l}$  25(OH) D im Serum einen ausgeprägten Zustand des Calcitriol Mangels auf. Hierbei erfolgte die Einteilung des 25 (OH)Vitamin D Status anhand der Referenzwerte des Instituts für Klinische Chemie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Es ergab sich hierbei ein Mittelwert von  $10,01\mu\text{g/l}$ , der Median lag bei  $7,5\mu\text{g/l}$ .

Eine Auftragung der 25(OH) D Werte gegen das jeweilige Alter zeigte, dass der 25(OH) Vitamin D Mangel innerhalb der weiblichen Bevölkerung unabhängig vom Alter auftritt. Bei der Auftragung der Mittelwerte der einzelnen Altersdekaden zeigte sich jedoch, um wie viel ausgeprägter der 25 (OH) D Mangel bei Frauen im höheren Lebensalter ist.



**Abb. 26:** Auftragung des 25(OH) Vitamin D Serumgehalts gegen das Alter. Deutlich zu erkennen ist das altersunabhängige Auftreten des Vitamin D Mangels.

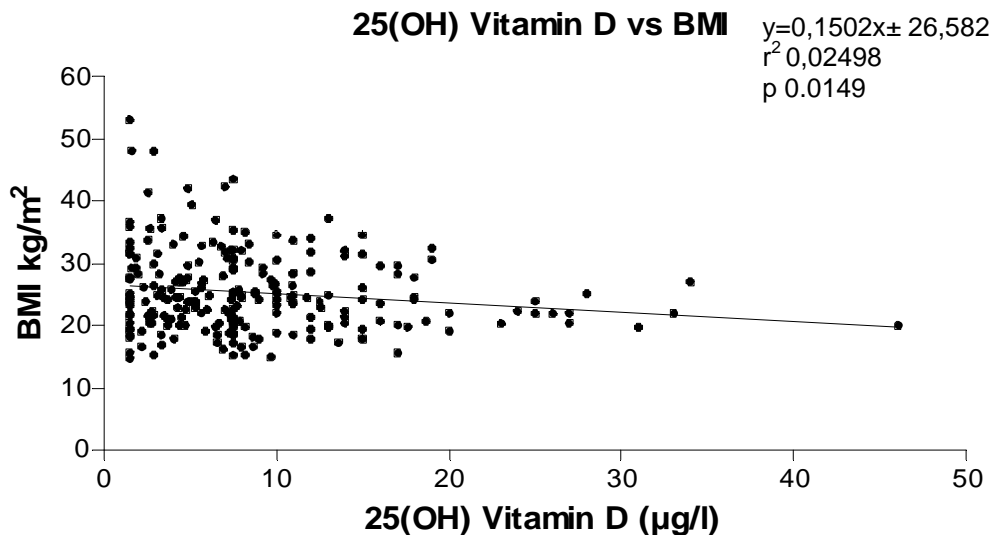


**Abb. 27:** Verteilung der 25 (OH) Vitamin D Werte über die Altersdekaden. Kein signifikanter Zusammenhang.

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurde überprüft, ob der 25(OH) Vitamin D Status abhängig ist vom BMI, also dem gemittelten Wert aus Größe eines Menschen so wie dessen Gewicht.

Hierbei konnte aber ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zwischen BMI und 25(OH) D Gehalt nachgewiesen werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Frauen, die besonders adipös oder untergewichtig waren, meist auch unter einem besonders ausgeprägten 25(OH) D Mangel litten.

Jedoch waren auch die meisten normgewichtigen bis leicht übergewichtigen Patientinnen (BMI zwischen 19 und 27 kg/m<sup>2</sup>) im Bereich der 25(OH) Vitamin D Insuffizienz und/oder des Mangels. Ein 25(OH) D Wert über 20µg/l sprach meist für das Vorliegen eines BMI im Normbereich.

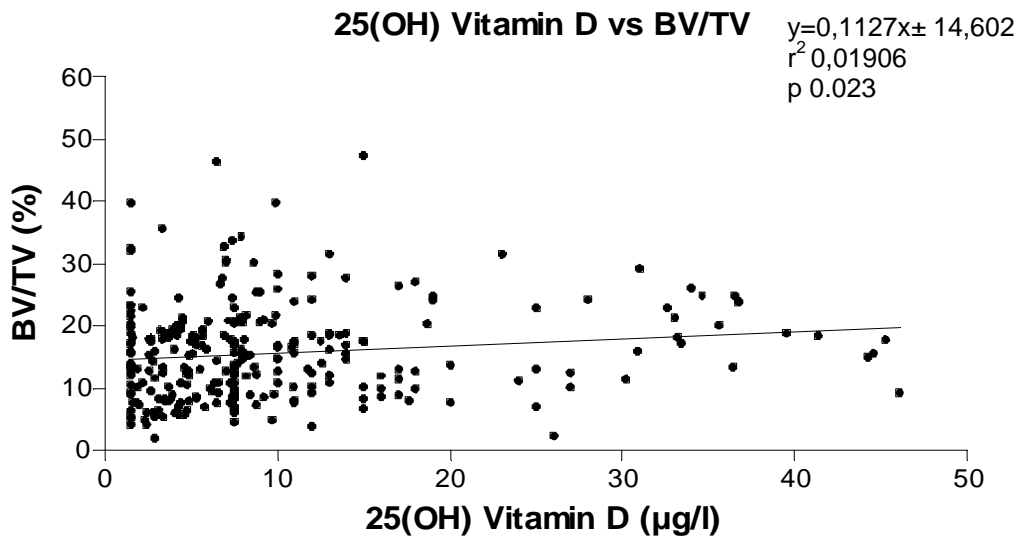


**Abb. 28:** Kein signifikanter Zusammenhang zwischen BMI und 25(OH) Vitamin D. Einen 25(OH) Vitamin D Wert über 20µg/l erreichten nur Patientinnen mit einem BMI zwischen 20 und 30 kg/m<sup>2</sup>.

In einem nächsten Schritt der statistischen Auswertung wurden die gewonnenen BV/TV-Werte gegen die entsprechenden 25(OH) D Werte aufgetragen.

Es konnten dabei keine Anhaltspunkte für einen signifikanten Zusammenhang gefunden werden.

Allerdings fand man bei suffizienten Serumwerten nur noch Knochenvolumenwerte in einem Bereich von 10 bis 30%. Hingegen war festzustellen, dass die Knochendichte bei Patientinnen mit manifestem 25(OH) D Mangel besonders stark zwischen einer ausgeprägten Osteosklerose oder häufiger einer Osteopenie schwankten. Dennoch wiesen auch unabhängig von der Höhe des 25 (OH) D Spiegels viele Probandinnen einen normalen und gesunden Wert bezüglich des Knochenvolumens auf.

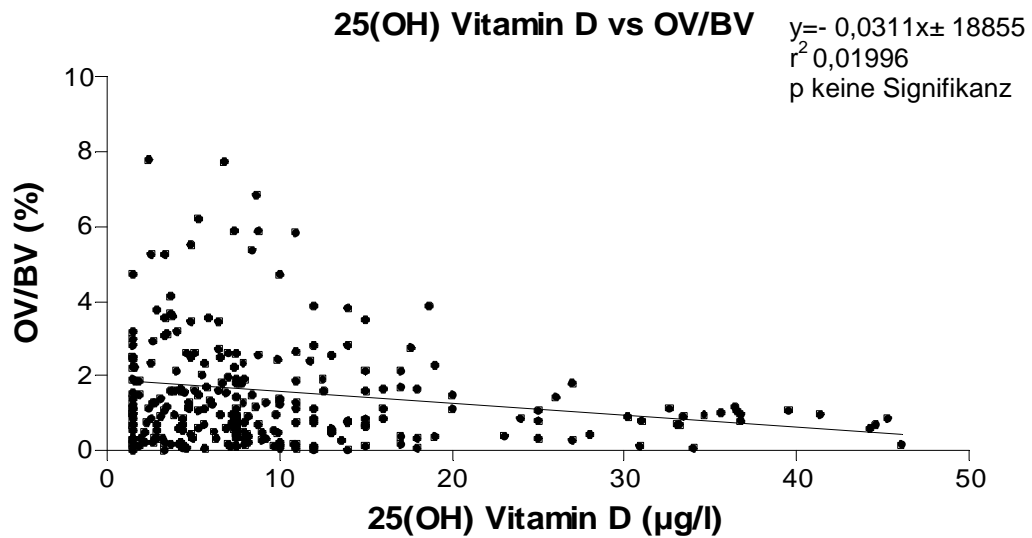


**Abb. 29:** Kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe des 25 (OH) D Serumgehaltes und der Knochendichte. Es lässt sich aber bei normalen Vitamin D-Werten eine verringerte Schwankungsbreite des BV/TV beobachten.

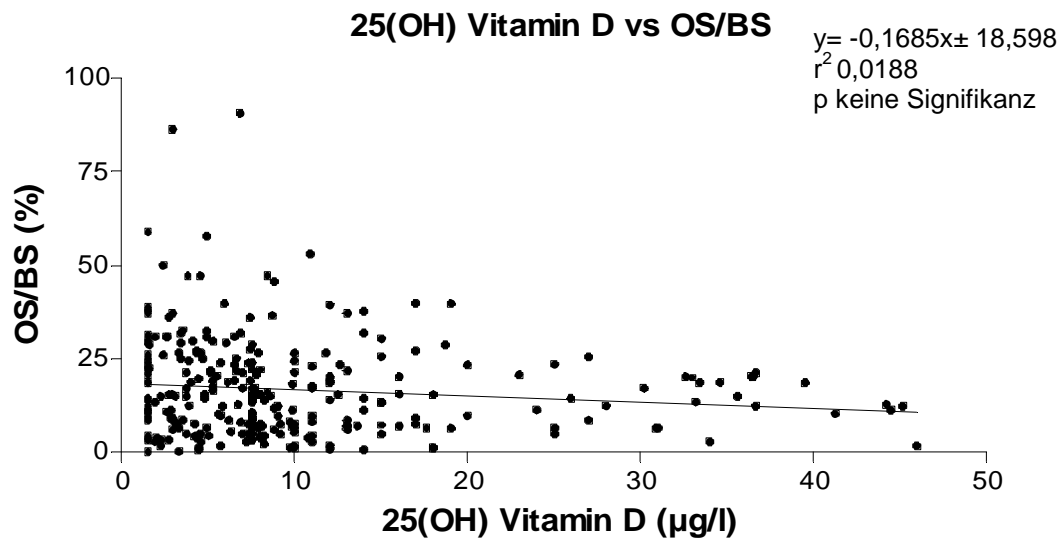
Die Frage, welche sich im Zusammenhang mit der hohen Zahl an Frauen mit Osteoidose ergab, war, ob es einen Zusammenhang zwischen 25(OH) D und Osteoidvolumen und –oberfläche gab.

Hierzu wurden ebenso wie im Rahmen der statistischen Auswertung der anderen Ergebnisse der 25(OH) Vitamin D Serumgehalt gegen den jeweils entsprechenden OV/BV- bzw. OS/BS- Wert aufgetragen.

Die gewonnene Punktwolke ergab zwei Ergebnisse. Ein niedriger 25(OH) D Status mit Werten unter 30µg/l konnte sowohl das Bild einer Volumen- und Oberflächenosteoidose, als aber auch ein normales histologisches Bild des mineralisierten Knochens aufweisen. In der Gruppe der Frauen mit 25(OH) Vitamin D Werten über 30µg/l gab es keine, die eine Oberflächen- und oder Volumenosteoidose aufwies.



**Abb. 30:** 25 (OH) Vitamin D gegen das Osteoidvolumen. Bei einem Vitamin D Serumspiegel von über 30µg/l kommt es zu keinem Auftreten einer Volumenosteoidose.



**Abb. 31:** Auftragung des 25(OH) Vitamin D gegen die Osteoidoberfläche. Kein Auftreten einer Oberflächenosteoidose bei Frauen, die einen Serumspiegel von über 30 µg/l 25(OH) D erreichen.

## 5 Diskussion

Die Bestimmung der Knochendichte hat in den letzten Jahren, im Zusammenhang mit einer zunehmenden Sensibilisierung für die Osteoporose, einen deutlichen Aufschwung erfahren. Im Vordergrund stehen hierbei die nichtinvasiven Methoden, wie DXA-Messung, Ultraschall und CT. Knochenqualität wird aber nicht nur durch ihre Knochendichte bestimmt, sondern auch durch ihre Struktur, den Mineralisierungsgrad und die Zellaktivität. Diesbezüglich weisen die nichtinvasiven Methoden Grenzen auf (Engelke et al. 1999; Link et al. 1999).

Eine weitere Möglichkeit der Diagnostik von Knochenpathologien ist die Bestimmung von Laborparametern im Blut und Urin. Hier ist besonders die Messung von Kalzium, Phosphat, Alkalische Phosphatase, Gamma-GT, TSH, Parathormon, Crosslinks im Urin, Hormone und 25(OH) Vitamin D von Bedeutung. Dabei spielt hinsichtlich der Diagnostik von Mineralisierungsstörungen das Parathormon bislang die Hauptrolle. Eine wichtige bekannte Funktion bei der Mineralisation des Knochens besitzt das 25(OH) Vitamin D.

Die bislang uneinheitlichen in vielen Studien ermittelten Referenzwerte für das 25(OH) D orientieren sich bislang an dem jeweiligen An- oder Abstieg des Parathormons bei dem jeweils gemessenen 25(OH) Vitamin D Wert (Chapuy et al. 1997; Malabanan et al. 1998; McKenna und Freaney 1998).

Die histomorphometrische Bestimmung der Knochenbiopsie als invasives Verfahren ist nach wie vor der Goldstandard in der Bestimmung der Knochenqualität. Sie erlaubt nicht nur Aussagen über die Mikroarchitektur des Knochens, sondern auch über den Mineralisierungsgrad und die Zellaktivität.

Neben der Erhebung eines Knochenstatus der weiblichen Bevölkerung sollten die Fragen nach der Häufigkeit des Auftretens von Mineralisierungsstörungen, der 25(OH) Status so wie der Zusammenhang zwischen Knochenstatus, Mineralisierungsstörung und 25(OH) D Status geklärt werden.

Zu diesem Zweck wurden in dieser Studie 274 Beckenkammbiopsien und 25(OH) D Serumbestimmungen an Frauen, die nicht an bekannten primären

oder sekundären Osteopathien leiden, durchgeführt. Damit stellt sie die weltweit größte Untersuchung ihrer Art da.

Die Problematik der Biopsieentnahme liegt in ihrer Invasivität. Aus diesem Grund liegen in den großen bisherigen Studien, die eine Aussage über den histologisch ermittelten Knochenstatus und Mineralisation treffen, Kollektive mit einer Knochenpathologie, wie z.B. Schenkelhalsfraktur vor (Wicks et al. 1982; Wilton et al. 1987; Hordon und Peacock 1990).

Um ein so großes Kollektiv von Knochengesunden zu gewinnen, wurden alle Biopsien und Serumentnahmen für die 25(OH) D Bestimmung im Rahmen von Sektionen des Rechtsmedizinischen Institut der Universität Hamburg gewonnen. Dabei handelt es sich um ein Patientengut, welches frei von bekannten primären und sekundären Osteopathien war und eine Verteilung über alle Altersschichten gewährleistete. Die Entnahmestelle der Biopsie wurde nach Bordier gewählt, da sie unkompliziert zu erreichen ist und aufgrund ihrer häufigen Anwendung ein hohes Maß an Vergleichbarkeit mit anderen Studien bietet.

Im Rahmen der histomorphometrischen Auswertung wurden die Knochenstrukturparameter BV/TV, Tb.Th., Tb.N. und Tb. Sp. bestimmt.

Hierbei zeigte sich eine nicht überraschende deutliche Korrelation zwischen der Knochenstruktur und dem Alter. Mit zunehmendem Alter kam es zu einer gleichzeitigen signifikanten Abnahme des Knochenvolumens (BV/TV). Die Anzahl der Trabekel fällt dabei signifikant am stärksten ab.

Die grafische Darstellung der Mittelwerte des BV/TV der einzelnen Altersdekaden lässt bei den untersuchten Frauen einen großen Einfluss der hormonellen Umstellung in den Wechseljahren auf den Knochen annehmen. Der Zusammenhang zwischen der Osteoporose und dem Mangel an Östrogen wurde bereits in vielen Studien nachgewiesen (Komm et al. 1988; Oursler 1998; Popat et al. 2009). Dennoch ist die Schlussfolgerung einer hormonellen Ursache in der vorliegenden Studie als hypothetisch zu erachten, da keine Hormonbestimmung durchgeführt wurde. Der Zeitraum, in dem das Knochenvolumen am stärksten abfällt, liegt jedoch in der Dekade der 50 bis 60 jährigen Frauen. Der Zeitraum des Beginns des Klimakteriums liegt für gewöhnlich im Alter zwischen 45 und 55. So ist davon auszugehen,

dass sich die meisten Frauen in dieser Gruppe bereits in der Phase der hormonellen Umstellung oder bereits in der Menopause befanden.

Die Auswertung der Strukturparameter lässt über dies hinaus noch einen weiteren Schluss zu. Immer wenn das BV/TV sich verändert, bedeutet dies, dass auch die anderen Strukturparameter veränderte Werte aufweisen. Das bedeutet, wenn das BV/TV sich verringert, geht das gleichzeitig mit einer Verjüngung der trabekulären Dicke und einer geringeren Anzahl von Trabekel einer definierten Fläche einher. Im selben Maß vergrößert sich auch in der Folge der Abstand zwischen den einzelnen Trabekeln.

Gleiches gilt umgekehrt auch für einen erhöhten Wert für BV/TV.

Dies ist insofern bedeutend, als dass aus einer beispielsweise stattgehabten Verringerung des BV/TV mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine geringere Stabilität des Knochens geschlossen werden kann. Würde bei einem niedrigeren BV/TV nur eine gleichzeitige Verringerung der Trabekeldicke stattfinden, so wäre mit einem geringeren Verlust der Stabilität zu rechnen, da neben der Trabekeldicke die Vernetzung der Trabekel einen maßgeblichen Anteil zur Stabilität des Knochens beiträgt. Dass die Vernetzung der Trabekel im Zusammenhang mit der Anzahl der Trabekel steht, konnte bereits nachgewiesen werden (Dalle Carbonare et al. 2005).

Diese Korrelation lässt sich auch zwischen den Strukturparametern Tb.Th, Tb.N, Tb.Th untereinander beobachten. Die statistische Analyse zeigte, dass die Abnahme des Knochenvolumens am stärksten mit der gleichzeitig abnehmenden Trabekelanzahl korreliert.

Für den Nachweis der signifikanten Zunahme des Knochenvolumens bei steigendem BMI bieten sich zwei Erklärungen an.

Ein erhöhte mechanische Belastung, wie sie bei einem höheren Körpergewicht auftritt führt zu einer reaktiven Knochenvolumenzunahme und so zu einer erhöhten Stabilität. Diese Theorie bietet jedoch nur eine sehr bedingte Erklärung für die signifikante Korrelation der Parameter, da der Beckenkamm nur gering im Alltag mechanisch belastet wird. Eine bessere Klärung lässt sich über eine bei Übergewichtigen zu vermutende erniedrigte Leptinkonzentration finden. In einem Mausmodell konnte der zentrale neuroendokrine Regulationsmechanismus des Leptins gezeigt werden. Bei



Mäusen führt ein erniedrigter Leptinspiegel zu Adipositas, Sterilität und erhöhter Knochenmasse (Ducy et al. 2000).

Derzeit wird dem Auftreten der Osteoidose innerhalb der Bevölkerung in Deutschland keine besondere Aufmerksamkeit geschenkt. In der Kindheit führt eine ausgeprägte Osteoidose zu dem Krankheitsbild der Rachitis, beim Auftreten im Erwachsenenalter führt sie zur Osteomalazie. Lediglich von ausgeprägten Fällen der Osteomalazie, vor allem bei weiblichen, muslimischen Immigranten und dialysepflichtigen Patienten, wird in der aktuellen Literatur regelmäßig berichtet (Schober et al. 1998; Jensen und Hitz 2000)

Da eine gängige Substitution von 25(OH) Vitamin D, wie Anfang des 20. Jahrhunderts nicht mehr stattfindet, ist zu hinterfragen, ob das Problem von Mineralisierungsstörungen heute nicht mehr existiert. In der vorliegenden Studie sollte überprüft werden, ob und in welchem Ausmaß Mineralisierungsstörungen in der Bevölkerung auftreten. Zur Charakterisierung des Mineralisierungsstatus wurden das Osteoid Volume per Tissue Volume, sowie das Osteoid Surface per Bone Surface ermittelt.

Es zeigte sich, dass 34,7 % der Frauen an einer Oberflächenosteoidose, OS/BS >20%, leiden. Der von Delling geforderte Grenzwert für das OS/BS bei den 21 bis 30 jährigen liegt bei 17,5% dies hätte zur Folge, dass 40,51% der Frauen erkrankt wären.

Den Beginn einer Volumenosteoidose setzte Delling mit 1,2% OV/BV (Delling 1975) fest. Das heißt bei gemessenen Werten für OV/BV von über 1,2% wird von einer Volumenosteoidose gesprochen. Unter Verwendung dieses Grenzwerts wiesen 40,9% der Frauen eine Volumenosteoidose auf. Hinsichtlich der 34,7% der Frauen die unter einer Oberflächenosteoidose leiden, erscheint der Wert für den Beginn einer Volumenosteoidose mit 1,2% als zu niedrig angesetzt. Ein realistischer Grenzwert für die Volumenosteoidose ist den Ergebnissen zufolge bei 2,0% anzunehmen. Bei Verwendung dieses Grenzwertes sinkt die Prävalenz der Volumenosteoidose bei den Frauen auf 23,4% ab.

Die Ergebnisse der Osteoidbestimmung zeigen, dass die Zahl der Patientinnen mit einer ausgeprägten Osteoidose sehr hoch ist. Es ist vorstellbar, dass ein Teil dieser Patientinnen unentdeckt auch unter den

Symptomen einer Osteomalazie gelitten haben könnte. Die Kardinalsymptome der Osteomalazie sind generalisierte Knochenschmerzen, besonders an Orten erhöhter Belastung des Skelettsystems, sowie pathologische Frakturen. Diese Vermutung bestätigten Studien, in denen anhand von Biopsien überprüft wurde, wie oft die Osteomalazie bei Schenkelhalsfrakturen auftrat. So diagnostizierten Chalmers et al. bei 130 Patienten bereits 1969 anhand von Biopsien, dass eine Osteomalazie,  $OV/BV > 5\%$  bei 20% der Betroffenen vorlag (Chalmers et al. 1969). Hingegen wurde in einer Studie mit 201 Patienten im Jahre 1987 bei nur 4% mit  $OV/BV > 5\%$  eine Osteomalazie festgestellt (Wilton et al. 1987). Bei dem Ansetzen des Grenzwertes für  $OV/BV$  bei  $> 5\%$  wären nach unseren Daten 5% der Frauen an Osteomalazie erkrankt. Diesen genannten und weiteren Studien liegt jedoch vor allem das Problem der schwierigen Vergleichbarkeit zu Grunde, zum einen durch unterschiedliche Messmethoden. Zum anderen bestehen unterschiedliche Grenzwerte der zur Diagnose herangezogenen Osteoidparameter ( $OV/BV$ ,  $OS/BS$  oder  $O.Th.$ ) selbst, so dass insgesamt in diesen Studien, die teilweise in den gleichen Ländern durchgeführt worden waren, die Zahlen der Prävalenz der Osteomalazie mit zwischen 0 und 37% angegeben werden (Hodkinson 1971; Aaron et al. 1974).

In der vorliegenden Studie zeigt eine in Bezugsetzung des Osteoidvolumen mit dem Knochenvolumen, dass eine Osteoidose nicht zwangsläufig mit einer Osteopenie einhergeht. Dennoch weisen 21,9% der untersuchten Frauen mit einer Volumenosteoidose ( $OV/BV > 1,2\%$ ) ein Knochenvolumen von unter 13,62% auf.

Der Grenzwert für die Osteopenie wurde, entsprechend der WHO, durch Verrechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung aller 30 bis 39 jährigen ermittelt.

Die Diagnostik der Osteomalazie im klinischen Alltag ist problematisch, da sie mit den herkömmlich radiologischen Methoden erst bei ausgeprägtem Krankheitsbild erkennbar wird. Im Rahmen dessen nehmen vor allem die gemessenen laborchemischen Parameter Parathormon und das  $25(OH) D$  eine wichtige Rolle ein.

Vitamin D ist nicht nur für die Kalziumhomöostase und den Knochenmetabolismus wichtig, sondern nimmt auch einen immer höheren Stellenwert ein, beispielsweise im Rahmen der Kanzerogenese und ihrer Therapieoptionen. Dieses zeigt die aktuelle Forschung. Trotz dieser immer größer werdenden Erkenntnis, dass 25(OH) D eine ausgesprochen wichtige Rolle im Leben eines Menschen spielt, gibt es nur eine große Studie, die den 25(OH) D Status der Bevölkerung im gesamten deutschen Bundesgebiet unabhängig von Alter und Krankheit, bestimmt (Hintzpeter et al. 2008).

Die Messung des 25(OH) D unserer Serumproben ergab bei 92,7% der Frauen einen unzureichend hohen 25(OH) D Gehalt. Hierbei setzt das Institut für Klinische Chemie am Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg für den Referenzbereich von 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D3 Werte von 22-46µg/l und für 25-Hydroxy-Vitamin-D3 30-68µg/l als normal an.

Demzufolge liegen im Bereich der Insuffizienz von 30 - >10 µg/l 22,99% der untersuchten Frauen. Einen ausgeprägten Mangel an 25(OH) D von unter 10 µg/l 25(OH) D im Serum zeigten 69,71% der Spenderinnen. Damit liegen im Gegensatz zu den Ergebnissen der Studie von Hintzpeter et al. ein deutlich größerer Anteil der untersuchten Frauen im Bereich einer 25(OH) D Mangelversorgung. Die Ergebnisse dieser Studie wiesen einen 25(OH) D Mangel bei lediglich 57,8% der 2267 untersuchten Frauen auf. Hier wurde jedoch erst ein Wert von unter 50 nmol/l als Mangel gewertet. Dies entspricht umgerechnet lediglich 20µg/l und liegt somit deutlich unter der bei uns angesetzten Grenze für einen 25(OH) Vitamin D Mangel von 30µg/l 25(OH) D Serumgehalt. Setzt man den Grenzwert von 25(OH) D unter 20µg/l, in unserer Studie, liegen immer noch rund 88% der Frauen im Bereich der Unterversorgung.

Ein immer noch erstaunlich gutes Ergebnis, wenn man sie mit spanischen Studien, ein Land, in dem meist die Sonne scheint und das soziale Leben sich vor allem im Freien abspielt, vergleicht (Gomez Alonso et al. 2003). Eine weitere spanische Studie mit gesunden und an Osteoporose erkrankten Frauen wies hier bei 87,1% einen 25(OH) D Wert von unter 20 µg/l auf (Aguado et al. 2000). Eine weitere Studie mit 8532 postmenopausalen Frauen und Osteoporose in ganz Europa zeigte eine 25(OH) D

Unterversorgung bei über 80% auf (Bruyere 2006). Die meisten der Studien haben jedoch zweierlei Nachteil. Zum einen werden vorzugsweise Patientinnen mit bestehenden Pathologien wie dem Zustand nach einer Schenkelhalsfraktur aufgenommen (Webb et al. 1988; Thomas et al. 1998), zum anderen wurden die meisten in großem Rahmen durchgeführten Studien in Orten, die auf einem nicht vergleichbarem Breitengrad liegen, durchgeführt. Dass dies einen nicht zu unterschätzenden Unterschied macht, konnte schon durch Webb et al. gezeigt werden (Webb et al. 1988). Damit geht aber nicht nur eine mögliche andere Ernährungsweise, sondern vor allem auch ein anderes Klima einher. Da der 25(OH) Vitamin D Status in einem erheblichen Maß von der Sonneneinstrahlung abhängig ist, ist dies ein nicht zu unterschätzender Faktor.

Erstaunlich erscheint bei Betrachtung der weltweiten Literatur vor allem, wie unterschiedlich groß der Anteil der von Hypovitaminose 25(OH) D Betroffenen teilweise in denselben Ländern ist. Die Ursache hierfür ist neben den oben aufgeführten Gründen aber auch in den zur Messung von 25(OH) D verwendeten unterschiedlichen Assays zu suchen. Die Varianz der Ergebnisse ein und derselben Serumprobe bei verschiedenen Messmethoden kann bis zu 38% betragen (Jongen et al. 1982; Jongen et al. 1984; Lips et al. 1999).

Das generelle Problem der bisherigen geltenden Vorschläge zur Einteilung der Hypovitaminose 25(OH) D besteht derzeit in der enormen Varianz, 12 - 40 µg/l, für die optimalen Referenzwerte des 25(OH) D Gehaltes. Diese entstand vor allem durch eine Vielzahl von Studien, die sich an dem gleichzeitig gemessenen Parathormonspiegel orientieren. Hierzu machte man sich den Effekt des Auftretens des sekundären Hyperparathyreoidismus bei 25(OH) D Mangel zunutze. So wurden die entsprechenden 25(OH) Vitamin D Spiegel bestimmt, die zu einem jeweiligen Anstieg des Parathormons und somit langfristig zu einem Abbau des Knochens führen (Chapuy et al. 1997; Malabanan et al. 1998; McKenna und Freaney 1998).

Für die Ermittlung eines Referenzwertes des 25(OH) D scheint es aufgrund seiner Wirkung im Knochenmetabolismus und der Kalziumhomöostase sinnvoller, die Knochenmineralisation als Surrogatparameter zu wählen. Der Einfluss des 25(OH) D auf den Knochen selbst ist bisher noch nicht

vollständig erforscht. Einerseits konnte bei fetalen Ratten die Stimulation von Osteoblasten im Scheitelbein nachgewiesen werden (Reichel, Koeffler et al. 1989). Andererseits konnte in vitro eine durch 25(OH) D geförderte Knochenresorption nachgewiesen werden (Norman et al. 1982; DeLuca 1988). Derzeit wird davon ausgegangen, dass der 25(OH) Vitamin D Mangel im wesentlichen zu zwei Pathologien am Knochen führt. Die eine Ursache ist ein entsprechender Kalzium- und Phosphatmangel zur Entstehung des sekundären Hyperparathyreoidismus und somit zu einer Osteopenie führt (Krall et al. 1989; Sahota et al. 1999). Dieser Pathomechanismus steht im Verdacht für einen Teil der Fälle ursächlich für die Entstehung der Osteoporose zu sein.

Eine weitere Möglichkeit ist ein erniedrigter Kalziumspiegel, der die Entstehung der Osteomalazie bei 25 (OH) Vitamin D Werten von unter 10µg/l auslöst (Lilliu et al. 2003; Bruyere 2006).

Mit unseren Ergebnissen lässt sich jedoch eine solche klare Einteilung von niedrigem 25(OH) D Serumgehalt und einer damit zwangsläufig auftretenden Pathologie des Knochens nicht bestätigen. Vielmehr verhält es sich so, dass auch bei 25(OH) Vitamin D Werten unter 15µg/l ein normal mineralisierter und in seinem Volumen nicht reduzierter Knochen möglich ist.

Diese Beobachtung lässt verschiedene Erklärungsansätze zu: So ist zu vermuten, dass ein Teil der Menschen auch unter fast vollständiger Abwesenheit von 25(OH) Vitamin D in der Lage ist, scheinbar genügend Kalzium aus der Nahrung aufzunehmen, beziehungsweise aus dem Harn zu reabsorbieren. Durch den somit genügend hohen Spiegel an Calcium kommt es zu keinem Abbau des Knochens und keiner Störung der Mineralisierung.

Da der Aufbau von Osteoid nicht innerhalb kürzester Zeit vonstatten geht, gäbe es für das Phänomen der normalen Mineralisierung bei gleichzeitig bestehendem 25(OH) D Mangel noch einen weiteren Erklärungsansatz. Die Patientinnen hatten einfach bis zu einem gewissen Zeitpunkt vor der Blut- und Biopsieentnahme noch einen normalen 25(OH) D Spiegel. Über den nötigen Zeitraum, in der ein 25(OH) D Mangel zu Veränderungen am Skelettsystem führt, gibt es derzeit noch keine feste Aussage. Eine weitaus wahrscheinlichere Erklärung ist die jeweils spezifische unterschiedliche Reaktion des menschlichen Körpers auf Mangelzustände. Ein Beispiel

hierfür sei das nicht zwangsläufige Auftreten einer Struma beim Menschen bei fehlender Supplementierung von Jod in Jodmangelgebieten. Es wäre somit auch bei den Knochenzellen innerhalb eines Kollektivs eine unterschiedliche Sensivität der Knochenzellen auf 25(OH) Vitamin D und PTH vermuten.

Weitaus interessanter aber ist die Feststellung, dass ab einem Wert des Calcitriols von über 30 µg/l keine Osteoidose mehr auftritt. Es kann also das Auftreten einer Mineralisierungsstörung mit einer ausreichenden Aufsättigung des 25(OH) Vitamin D Spiegels verhindert werden. Dies macht es zu einem überragenden Prophylaktikum in der Verhinderung von Mineralisierungsstörungen. Die Zahl der Frauen mit einer Osteoidose und somit auch der potentiellen Gefahr, an einer Osteomalazie zu erkranken, ist mit über 30% hoch. Von diesen 30% an Osteoidose Erkrankten leiden 21,9% gleichzeitig an einer Osteopenie. Hier ist zu vermuten, dass allein die Gabe von ausreichend 25(OH) Vitamin D genügen könnte, um die Patientinnen aus der Osteopenie herauszuführen. Denn das Osteoid welches als „Grundgerüst“ für die Mineralisierung dient, muss nur noch mineralisiert werden.

Die logische Konsequenz hieraus muss die Primärprophylaxe im Sinne einer flächendeckende Substitution des 25(OH) D, in der Milch zum Beispiel, ähnlich dem Jodzusatz im Salz, sein. Eine Zahl von 30% an Mineralisierungsstörungen und dem somit deutlich erhöhtem Risiko für Schmerzen des Skelettsystems und der erhöhten Frakturanfälligkeit ist in einer Industrienation wie Deutschland unvertretbar. Zumal in einer Vielzahl von Studien gezeigt werden konnte, dass das Risiko für das Auftreten von Nebenwirkungen als gering einzustufen ist. So konnte nachgewiesen, dass erst sehr hohe Dosen von über 2000IU/d oder Einzelgaben von über 600,000 IU eventuell zu Hyperkalzämie führen können (Johnson et al. 1980; Sebert 1987). Beschriebene Nebenwirkungen der 25(OH) Vitamin D Intoxikation sind die Hyperkalzämie, Knochenverlust, Hyperkalzurie und eine eingeschränkte Nierenfunktion. Selbst eine orale Gabe von bis zu 50,000 IU/d über 8 Wochen führte bei den Probanden einer Studie nicht zu einem Auftreten einer Hyperkalzämie (Barger-Lux et al. 1998). Diverse Studien zeigten bereits, dass die orale Vitamin D und Calcium Gabe in der

Prävention von Schenkelhalsfrakturen kosteneffektiver ist als die Therapie mit Hormonersatzpräparaten, Thiaziddiuretika, Alendronat und Calcitonin (Papadimitropoulos et al. 2002).

Es muss in Deutschland endlich eine ernsthafte Diskussion um eine flächendeckende Supplementation mit 25(OH) D geführt werden. Wie und in welcher Höhe 25(OH) Vitamin D verabreicht werden muss, gilt es in weiteren Studien in Zukunft zu klären - auch in Hinblick von Einfluss auf Muskeln, Immunsystem und Krebs zum Beispiel.

Zusammenfassend weisen die Frauen in Hamburg insgesamt einen höheren prozentualen Anteil mit an ausgeprägten 25(OH) D Mangel leidenden Frauen auf, als dies in anderen großen Studien im Ausland der Fall war. Eine Volumenosteoidose tritt mit 23,4% überraschend häufig auf. Eine direkte Korrelation zwischen Knochenvolumen und 25(OH) Vitamin D Serumwert ist nicht zu finden.

Der 25(OH) Vitamin D Referenzwert ist bei 30µg/l aus osteologischer Sicht anzusetzen, da so keine Mineralisierungsstörung bei einer sonst gesunden Person auftritt.

## 6 Zusammenfassung

Die Knochenqualität ist entscheidend für die Stabilität und Funktionstüchtigkeit des Skelettsystems. Die Qualität wird aber nicht nur durch die Strukturparameter des Knochens bestimmt, sondern ebenso durch den Grad der Mineralisation. Für die Bestimmung beider Parameter ist die Knochenbiopsie der Goldstandard. Neben dem Parathormon gibt es eine Reihe von weiteren Einflussfaktoren auf die Mineralisation. Einer davon, der zunehmend in den Fokus der Forschung gerät, ist das 25(OH) Vitamin D.

Anhand der vorliegenden Studie sollte neben der Erhebung des Knochenstatus der Mineralisierungsgrad, der 25(OH) D Status, und der Zusammenhang untereinander innerhalb eines großen weiblichen Kollektivs ermittelt werden. Es wurden bei 274 Frauen unterschiedlichen Alters Beckenkammbiopsien und Blut gewonnen. Die Studie ist weltweit die größte ihrer Art. Die Blutproben wurden auf ihren 25(OH) D Gehalt untersucht. Alle Biopsien wurden unentkalkt eingebettet und histologisch aufgearbeitet. Die statistisch strukturelle Analyse wurde unter Nutzung des Osteomeasure Systems entsprechend der ASBMR Standards durchgeführt. Die histomorphometrische Auswertung ergab, dass ein signifikanter Abfall des BV/TV, Tb.Th und Tb.N. bei steigendem Alter besteht. Ebenso konnte die signifikante Korrelation der Strukturparameter untereinander bewiesen werden. Unabhängig vom Alter zeigten 23,4% der Frauen eine Volumenosteoidose bei einem Grenzwert für OV/BV von 2%. Eine Oberflächenosteoidose wurde bei 34% der Frauen nachgewiesen. Eine Osteopenie und Oberflächenosteoidose konnten bei 28% der weiblichen Bevölkerung ermittelt werden. Die Auswertung der gemessenen 25(OH) D Werte ergab eine Prävalenz von über 92% für das Auftreten eines 25(OH) D Mangels. Die Studie konnte nicht beweisen, dass ein erniedrigter 25(OH) D Spiegel eine normale Mineralisierung ausschließt. Alle Frauen mit einem 25(OH) D Wert von über 30µg/l wiesen keine Mineralisierungsstörung auf. Für eine optimale Mineralisierung sollte ein 25(OH) Vitamin D Referenzwert von über 30µg/l erreicht werden.

Zu überprüfen bleibt, ob die große Anzahl an Osteoidose erkrankter Frauen mit einer möglichen hohen Prävalenz für die Osteomalazie verknüpft ist.



## 7 Literatur

Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ (1994). "Function of osteocytes in bone." *J Cell Biochem* 55(3): 287-99.

Aaron JE, Gallagher JC, Anderson J, Stasiak L, Longton EB, Nordin BE, Nicholson M (1974). "Frequency of osteomalacia and osteoporosis in fractures of the proximal femur." *Lancet* 1(7851): 229-33.

Aguado P, Garces MV, Gonzalez Casaus ML, del Campo MT, Richi P, Coya J, Torrijos A, Gijon J, Martin Mola E., Martinez ME (2000). "[High prevalence of vitamin D deficiency in postmenopausal women at a rheumatology office in Madrid. Evaluation of 2 vitamin D prescription regimens]." *Med Clin (Barc)* 114(9): 326-30.

Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T (2006). "Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss." *J Bone Miner Res* 21(4): 605-15.

Allolio B, Dambacher M, Dreher R, Felsenberg D, Franke J, Kruse HP, Leidig-Bruckner G, Ringe JD, Semler J, Willvonseder R, Ziegler R (2000). "Die Osteoporose des Mannes." *Med Klin (Munich)* 95(6): 327-38.

Aloia JF und Li-Ng M (2007). "Re: epidemic influenza and vitamin D." *Epidemiol Infect* 135(7): 1095-6; author reply 1097-8.

Amling M, Priemel M, Holzmann T, Chapin K, Rueger JM, Baron R, Demay MB (1999). "Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: formal histomorphometric and biomechanical analyses." *Endocrinology* 140(11): 4982-7.

Arnstein AR, Frame B, Frost HM (1967). "Recent progress in osteomalacia and rickets." *Ann Intern Med* 67(6): 1296-330.

Barger-Lux MJ, Heaney RP, Dowell S, Chen TC, Holick MF (1998). "Vitamin D and its major metabolites: serum levels after graded oral dosing in healthy men." *Osteoporos Int* 8(3): 222-30.

Baron R., VA, Neff L, Silverglate A, Santa Maria A (1983). "Processing of undecalcified bone specimens for bone histomorphometry. In: Recker, RR (Ed.) *Bone histomorphometry: Techniques and interpretation.*" 13-35.

Bartl R, Bartl C, Mutschler W (2003). " Diagnostik und Therapie der Osteoporose. Strategie für eine effiziente Prävention von Folgefrakturen." *Unfallchirurg* 106(7): 526-41.

Benson, PF, Stroud CE, Mitchell NJ, Nicolaidis A (1963). "Rickets in immigrant children in London." *Br Med J* 1(5337): 1054-6.

Bingham CT und Fitzpatrick LA (1993). "Noninvasive testing in the diagnosis of osteomalacia." *Am J Med* 95(5): 519-23.

Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Willett WC, Staehelin HB, Bazemore MG, ZeeRY, Wong, JB (2004). "Effect of Vitamin D on falls: a meta-analysis." *Jama* 291(16): 1999-2006.

Bordier P, Matrajt H, Miravet L, Hioco D (1964). "[Histological Measure of the Volume and Resorption of Bone Joints.]" *Pathol Biol (Paris)* 12: 1238-43.

Bouillon RA, Auwerx JH, Lissens WD, Pelemans WK (1987). "Vitamin D status in the elderly: seasonal substrate deficiency causes 1,25-dihydroxycholecalciferol deficiency." *Am J Clin Nutr* 45(4): 755-63.

Bruyere O, MO, Neuprez A, Reginster J-Y, WHO Collaborating Center for Public Health (2006). "High prevalence of inadequate serum Vitamin D levels

in osetoporotic European postmenopausal women." Abstracts of IOF World Congress on Osteoporosis P142SA: 33.

Burgos-Trinidad M, Brown AJ, DeLuca HF (1986). "Solubilization and reconstitution of chick renal mitochondrial 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase." *Biochemistry* 25(9): 2692-6.

Chalmers J, Barclay A, Davison AM, Macleod DA, Williams DA (1969). "uantitative measurements of osteoid in health and disease." *Clin Orthop Relat Res* 63: 196-209.

Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, Meunier PJ (1997). "Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population." *Osteoporos Int* 7(5): 439-43.

Compston J (1997). "Bone Histomorphometry." In: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW, eds. *Vitamin D*. San Diego: Academic Press Inc.: 573-86.

Cook PF und Moore SG (1992). "Case report 746: Osteopetrosis." *Skeletal Radiol* 21(6): 396-8.

Dalen N, Hellstrom LG, Jacobson B (1976). "Bone mineral content and mechanical strength of the femoral neck." *Acta Orthop Scand* 47(5): 503-8.

Dalle Carbonare L, Valenti MT, Bertoldo F, Zanatta M, Zenari S, Realdi G, Lo Cascio V, Giannini S (2005). "Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry." *Micron* 36(7-8): 609-16.

Delling G (1975). " Endokrine Osteopathien: Morphologie, Histomorphometrie und Differenzialdiagnose." *Veroff Pathol*(98): 1-111.

DeLuca HF (1988). "The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine." *Faseb J* 2(3): 224-36.

Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G (2000). "Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass." *Cell* 100(2): 197-207.

Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W (1999). "Mikro-CT Technologie und Applikationen zur Erfassung von Knochenarchitektur." *Radiologe* 39(3): 203-12.

Esvelt RP, Schnoes HK, DeLuca HF (1979). "Isolation and characterization of 1 alpha-hydroxy-23-carboxytetranorvitamin D: a major metabolite of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>." *Biochemistry* 18(18): 3977-83.

Frame B und Parfitt AM (1978). "Osteomalacia: current concepts." *Ann Intern Med* 89(6): 966-82.

Friedman PA und Gesek FA (1993). "Vitamin D<sub>3</sub> accelerates PTH-dependent calcium transport in distal convoluted tubule cells." *Am J Physiol* 265(2 Pt 2): 300-8.

Frost HM (1969). "Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling." *Calcif Tissue Res* 3(3): 211-37.

Gardiner EM, Baldock PA, Thomas GP, Sims NA, Henderson NK, Hollis B, White CP, Sunn KL, Morrison NA, Walsh WR, Eisman JA (2000). "Increased formation and decreased resorption of bone in mice with elevated vitamin D receptor in mature cells of the osteoblastic lineage." *Faseb J* 14(13): 1908-16.

Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Grant WB, Giovannucci EL, Lipkin M, Newmark H, Holick MF, Garland FC. (2007). "Vitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis." *J Steroid Biochem Mol Biol* 103(3-5): 708-11.

Gartland A, Buckley KA, Dillon JP, Curran JM, Hunt JA, Gallagher JA (2005). "Isolation and culture of human osteoblasts." *Methods Mol Med* 107: 29-54.

Glüer CC, Eastell R, Reid DM, Felsenberg D, Roux C, Barkmann R, Timm W, Blenk T, Armbrecht G, Stewart A, Clowes J, Thomasius FE, Kolta S (2004). "Association of five quantitative ultrasound devices and bone densitometry with osteoporotic vertebral fractures in a population-based sample: The OPUS study." *J Bone Miner Res* 19:782-93

Gomez Alonso C, Naves Diaz M, Rodriguez Garcia M, Fernandez Martin JL, Cannata Andia JB (2003). "Vitamin D status and secondary hyperparathyroidism: the importance of 25-hydroxyvitamin D cut-off levels." *Kidney Int Suppl.* (85): 44-8

Harada S und Rodan GA (2003). "Control of osteoblast function and regulation of bone mass." *Nature* 423(6937): 349-55.

Hintzpeter B, Mensink GB, Thierfelder W, Muller MJ, Scheidt-Nave C (2008). "Vitamin D status and health correlates among German adults." *Eur J Clin Nutr* 62(9): 1079-89.

Hodkinson HM (1971). "Fracture of the femoral neck in the elderly. Assessment of the role of osteomalacia." *Gerontol Clin (Basel)* 13(3): 153-8.

Hordon LD und Peacock M (1990). "Osteomalacia and osteoporosis in femoral neck fracture." *Bone Miner* 11(2): 247-59.

Huebner AK, Schinke T, Priemel M, Schilling S, Schilling AF, Emeson RB, Rueger JM, Amling M (2006). "Calcitonin deficiency in mice progressively results in high bone turnover." *J Bone Miner Res* 21(12): 1924-34.

Huldschinsky K (1919). "Heilung von Rachitis durch künstliche Höhensonne." *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 45: 712-13.

Jensen JE und Hitz MF (2000). "[Osteomalacia--a frequently overlooked condition among refugees and immigrants]." *Ugeskr Laeger* 162(46): 6250-1.

Johnson KR, Jobber J, Stonawski BJ (1980). "Prophylactic vitamin D in the elderly." *Age Ageing* 9(2): 121-7.

Jongen MJ, van der Vijgh WJ, van Beresteyn EC, van den Berg H, Bosch R, Hoogenboezem T, Visser TJ, Netelenbos JC (1982). "Interlaboratory variation of vitamin D(1) metabolite measurements." *J Clin Chem Clin Biochem* 20(10): 753-6.

Jongen MJ, Van Ginkel FC, van der Vijgh WJ, Kuiper S, Netelenbos JC, Lips P (1984). "An international comparison of vitamin D metabolite measurements." *Clin Chem* 30(3): 399-403.

Kalu DN. (1991). "The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss." *Bone Miner* 15(3): 175-91.

Knese K (1985). "Knochenstruktur als Verbundbau." Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Knutson JC und DeLuca HF (1974). "25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-24-hydroxylase. Subcellular location and properties." *Biochemistry* 13(7): 1543-8.

Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, Graeme KA, Gallegos A, Korc M, Greene GL, O'Malley BW, Haussler MR (1988). "Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells." *Science* 241(4861): 81-4.

Krall EA, Sahyoun N, Tannenbaum S, Dallal GE, Dawson-Hughes B (1989). "Effect of vitamin D intake on seasonal variations in parathyroid hormone secretion in postmenopausal women." *N Engl J Med* 321(26): 1777-83.

Lambers TT, Bindels RJ, Hoenderop JG (2006). "Coordinated control of renal Ca<sup>2+</sup> handling." *Kidney Int* 69(4): 650-4.

Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP (2007). "Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial." *Am J Clin Nutr* 85(6): 1586-91.

Lilliu H, Pamphile R, Chapuy, MC, Schulten J, Arlot M, Meunier PJ (2003). "Calcium-vitamin D<sub>3</sub> supplementation is cost-effective in hip fractures prevention." *Maturitas* 44(4): 299-305.

Lindsay R, Hart DM, MacLean A, Clark AC, Kraszewski A, Garwood J (1978). "Bone response to termination of oestrogen treatment." *Lancet* 1(8078): 1325-7.

Link TM, Majumdar S, Grampp S, Guglielmi G, van Kuijk C, Imhof H, Glueer C, Adams JE (1999). "Imaging of trabecular bone structure in osteoporosis." *Eur Radiol* 9(9): 1781-8.

Lips P, Chapuy MC, Dawson-Hughes B, Pols HA, Holick MF (1999). "An international comparison of serum 25-hydroxyvitamin D measurements." *Osteoporos Int* 9(5): 394-7.

MacLaughlin JA, Anderson RR, Holick MF (1982). "Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D<sub>3</sub> and its photoisomers in human skin." *Science* 216(4549): 1001-3.

Malabanan A, Veronikis IE, Holick MF (1998). "Redefining vitamin D insufficiency." *Lancet* 351(9105): 805-6.

Malluche HH, Faugere MC, Rush M, Friedler R (1986). "Osteoblastic insufficiency is responsible for maintenance of osteopenia after loss of ovarian function in experimental beagle dogs." *Endocrinology* 119(6): 2649-54.

Matsuoka LY, Wortsman J, Haddad JG, Hollis BW (1989). "In vivo threshold for cutaneous synthesis of vitamin D<sub>3</sub>." *J Lab Clin Med* 114(3): 301-5.

McCollum EV, Simmonds N, Kinney M, Shipley PG, Park EA (1995). "Studies on experimental rickets. XVII. The effects of diets deficient in calcium and in fat-soluble A in modifying the histological structure of the bones. 1921." *Am J Epidemiol* 141(4): 280-96; discussion 279.

McKenna MJ und Freaney R (1998). "Secondary hyperparathyroidism in the elderly: means to defining hypovitaminosis D." *Osteoporos Int* 8 Suppl 2: S3-6.

Mellanby T (1918). "The part played by an "accessory factor" in the production of experimental rickets. A further demonstration of the part played by accessory food factors in the aetiology of rickets." *J Physiology* 52: 11.

Mundy GR (1996). "Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors." *Clin Orthop Relat Res*(324): 24-8.

Niles RM (1995). "Use of vitamins A and D in chemoprevention and therapy of cancer: control of nuclear receptor expression and function. Vitamins, cancer and receptors." *Adv Exp Med Biol* 375: 1-15.

Norman AW, Roth J, Orci L (1982). "The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors, and biological response (calcium binding proteins)." *Endocr Rev* 3(4): 331-66.

Nursyam EW, Amin Z, Rumende CM (2006). "The effect of vitamin D as supplementary treatment in patients with moderately advanced pulmonary tuberculous lesion." *Acta Med Indones* 38(1): 3-5.

Nussey SS, Whitehead SA (2001). "Endocrinology: An integrated approach." BIOS Scientific Publishers Ltd.: 171-4.



Ornoy A, Goodwin D, Noff D, Edelstein S (1978). "24, 25-dihydroxyvitamin D is a metabolite of vitamin D essential for bone formation." *Nature* 276(5687): 517-9.

Oursler MJ (1998). "Estrogen regulation of gene expression in osteoblasts and osteoclasts." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 8(2): 125-40.

Papadimitropoulos E, Wells G, Shea B, Gillespie W, Weaver B, Zytaruk N, Cranney A, Adachi J, Tugwell P, Josse R, Greenwood C, Guyatt G (2002). "Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. VIII: Meta-analysis of the efficacy of vitamin D treatment in preventing osteoporosis in postmenopausal women." *Endocr Rev* 23(4): 560-9.

Parfitt AM (1985). "Stereologic basis of bone histomorphometry. Theory of quantitative microscopy and reconstruction of the third dimension." In:

Recker RR (ed.) *Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation*. CRC Press, Boca Raton, FL: 53-87.

Park EA (1940). "The therapy of rickets." *JAMA* 115: 370-9.

Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, Nachtigall D, Hansen C (2001). "Effects of a short-term vitamin D(3) and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women." *J Clin Endocrinol Metab* 86(4): 1633-7.

Pitt MJ (1991). "Rickets and osteomalacia are still around." *Radiol Clin North Am* 29(1): 97-118.

Popat VB, Calis KA, Vanderhoof VH, Cizza G, Reynolds JC, Sebring N, Troendle JF, Nelson LM (2009). "Bone mineral density in estrogen deficient young women." *J Clin Endocrinol Metab*.

Rahn BA, DDH (1994). "Knochengewebe, Knochenbau." Benninghoff Anatomie Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore 15: 145-59.

Raisz LG (1999). "Physiology and pathophysiology of bone remodeling." Clin Chem 45(8 Pt 2): 1353-8.

Ralston SH (1997). "What determines peak bone mass and bone loss?" Baillieres Clin Rheumatol 11(3): 479-94.

Reichel H, Koeffler HP, Norman AW (1989). "The role of the vitamin D endocrine system in health and disease." N Engl J Med 320(15): 980-91.

Rizzoli R, Ferrari SL, Pizurki L, Caverzasio J, Bonjour JP (1992). "Actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein." J Endocrinol Invest 15(9 Suppl 6): 51-6.

Rodan SB, Fischer MK, Egan JJ, Epstein PM, Rodan GA (1984). "The effect of dexamethasone on parathyroid hormone stimulation of adenylate cyclase in ROS 17/2.8 cells." Endocrinology 115(3): 951-8.

Sahota O, Masud T, San P, Hosking DJ (1999). "Vitamin D insufficiency increases bone turnover markers and enhances bone loss at the hip in patients with established vertebral osteoporosis." Clin Endocrinol (Oxf) 51(2): 217-21.

Schenk RK, OAJ, Herrmann W (1984). "Preparation of calcified tissues for light microscopy." Dickson G.R. (Ed.): Methods of calcified tissue preparation.: 1-56.

Schinke T, McKee MD, Karsenty G (1999). "Extracellular matrix calcification: where is the action?" Nat Genet 21(2): 150-1.

Schober HC, Han ZH, Foldes AJ, Shih MS, Rao DS, Balena R, Parfitt AM (1998). "Mineralized bone loss at different sites in dialysis patients: implications for prevention." *J Am Soc Nephrol* 9(7): 1225-33.

Schott GD und Wills MR (1976). "Muscle weakness in osteomalacia." *Lancet* 1(7960): 626-9.

Schwartz Z, Schlader DL, Swain LD, Boyan BD (1988). "Direct effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 24,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on growth zone and resting zone chondrocyte membrane alkaline phosphatase and phospholipase-A<sub>2</sub> specific activities." *Endocrinology* 123(6): 2878-84.

Sebert JL, FP, Ruiz JC, Perdu V, Bellony R, Liu SY, Defrance D (1987). "Vitamin D deficiency and supplementation in elderly institutionalized women." *Copenhagen: Osteopress ApS*: 592-4.

Smith R und Stern G (1967). "Myopathy, osteomalacia and hyperparathyroidism." *Brain* 90(3): 593-602.

St-Arnaud R (1999). "Targeted inactivation of vitamin D hydroxylases in mice." *Bone* 25(1): 127-9.

Stern PH und Mavreas T (1976). "Bone-resorbing activity of analogues of 25-hydroxycholecalciferol and 1,25-dihydroxycholecalciferol: effects of side chain modification and stereoisomerization on responses of fetal rat bones in vitro." *Mol Pharmacol* 12(6): 879-86.

Suda T, Ueno Y, Fujii K, Shinki T (2003). "Vitamin D and bone." *J Cell Biochem* 88(2): 259-66.

Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT, Vamvakas EC, Dick IM, Prince RL, Finkelstein JS (1998). "Hypovitaminosis D in medical inpatients." *N Engl J Med* 338(12): 777-83.

Turner CH und Forwood MR (1995). "What role does the osteocyte network play in bone adaptation?" *Bone* 16(3): 283-5.

van der Wielen RP, Lowik MR, van den Berg H, de Groot LC, Haller J, Moreiras O, van Staveren WA (1995). "Serum vitamin D concentrations among elderly people in Europe." *Lancet* 346(8969): 207-10.

Velluz L und Amiard G (1949). "Chimie organique – le precalciferol." *C R Hebd Seances Acad Sci* 228(8): 692-4.

Webb AR, Kline L, Holick MF (1988). "Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D<sub>3</sub>: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D<sub>3</sub> synthesis in human skin." *J Clin Endocrinol Metab* 67(2): 373-8.

Wicks M, Garrett R, Vernon-Roberts B, Fazzalari N (1982). "Absence of metabolic bone disease in the proximal femur in patients with fracture of the femoral neck." *J Bone Joint Surg Br* 64(3): 319-22.

Wilton TJ, Hosking DJ, Pawley E, Stevens A, Harvey L (1987). "Osteomalacia and femoral neck fractures in the elderly patient." *J Bone Joint Surg Br* 69(3): 388-90.

Wong MM, Rao LG, Ly H, Hamilton L, Tong J, Sturtridge W, McBroom R, Aubin JE, Murray TM (1990). "Long-term effects of physiologic concentrations of dexamethasone on human bone-derived cells." *J Bone Miner Res* 5(8): 803-13.

Yin L, Li YB, Wang YS (2006). "Dexamethasone-induced adipogenesis in primary marrow stromal cell cultures: mechanism of steroid-induced osteonecrosis." *Chin Med J (Engl)* 119(7): 581-8.

## 8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Johannes M. Rueger danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit, in der ich mich in meiner wissenschaftlichen Tätigkeit frei entfalten konnte.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Michael Amling, der mich nicht nur in Hinsicht meiner Dissertation hervorragend unterstützte, sondern auch mein persönliches Vorankommen positiv beeinflusste.

Ich danke Herrn Dr. med. Matthias Priemel für das Einarbeiten, die zahlreichen Antworten auf meine Fragen und das Korrigieren der Erstentwürfe.

Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Klaus Püschel und allen Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin, da sie maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Steffen Kessler danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit, die vielen konstruktiven Gespräche und die angenehme Zeit, die ich mit ihm hatte.

Vor allem möchte ich mich auch bei meiner Freundin Hanna Marie Behr bedanken, die mir viel Kraft und Unterstützung über die ganze Zeit der Anfertigung meiner Dissertation und darüber hinaus gab.

Zu guter Letzt möchte ich mich vor allem bei meiner Familie bedanken, die mir mein Studium ermöglichte und mich in allen Dingen immer aus vollem Herzen unterstützt hat.

## 9 Curriculum Vitae

Till Orla Klatte

### Persönliche Informationen

Geburtsdatum: 31.05.1982

Geburtsort: Berlin

### Schulische Ausbildung

1988 - 1992 Grundschule Abt Kolomban Schule, Münstertal

1992 - 2001 Angell Gymnasium, Freiburg i. Brsg. (Abitur)

### Studium

10/2002 Beginn des Medizinstudiums, Universität Leipzig

08/2004 Ärztliche Vorprüfung, Universität Leipzig

10/2004 Medizinstudium, Universität Hamburg

09/2008 2.Staatsexamen, Universität Hamburg

### Beruf

26.11.2008 Approbation als Arzt

Seit 01.12.2008: Arzt in der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und  
Wiederherstellungschirurgie                      Universitätsklinikum  
Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg

Publikation:

Priemel M, von Domarus C, Klatte TO, Kessler S, Schlie J, Meier S, Proksch N, Pastor F, Netter C, Streichert T, Püschel K, Amling M. (2009). „Bone Mineralization Defects and Vitamin D Deficiency: Histomorphometric Analysis of Iliac Crest Bone Biopsies and Circulating 25-Hydroxyvitamin D in 675 Patients.” J Bone Miner Res. [Epub ahead of print]

Vortrag:

Klatte TO, Kessler S, Priemel M, von Domarus C, Schlie J, Püschel K, Amling M, (04/2008) „Vitamin D Mangel und Knochenmineralisierungsstörung in Deutschland: 675 Patienten der Hamburger Beckenkammstudie.“ Osteologie 2008, Bad Pyrmont/Hannover

Poster:

Klatte TO, Kessler S, Priemel M, von Domarus C, Schlie J, Püschel K, Amling M, (04/2008) „Prevalence of bone mineralization defects and Vitamin D deficiency in Germany. Histomorphometric analysis of iliac crest bone biopsies and circulating 25-hydroxyvitamin D in 675 patients.” 8. European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis, Istanbul, Türkei

**11 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere, dass ich die Arbeit selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe.

Alle Textstellen, die ich wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen habe, sind als solche kenntlich gemacht.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 29.07.2009