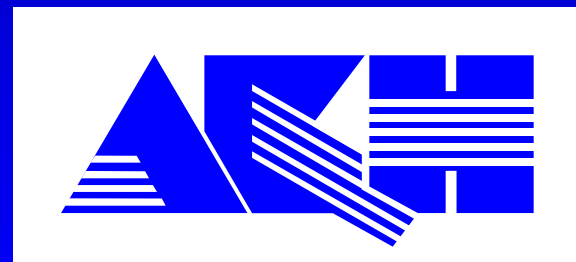


DIAGNOSE:

LABOR UND PARAMETER DES KNOCHENSTOFFWECHSELS

Ch. Bieglmayer, KIMCL



Knochen:

spezialisiertes Bindegewebe : Zellen + extrazelluläre Matrix

→ Kalzifizierung

Aufgaben des Knochens:

1.) Biomechanische Stütz- und Schutzfunktion

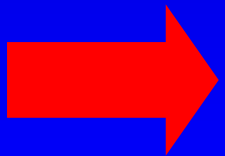
Biomineralisation: Hydroxylapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$

statisch

2.) Ca- und Phosphat- Puffer

Resorption \Leftrightarrow Anbau: Knochenstoffwechsel

dynamisch



Verteilung von Ca

nach Habicht, J Min Stoff W 2001

Ca: gesamt ~ 1400 g

- 90% im Knochen als Hydroxylapatit
- 0.03% im Plasma 45 - 50% Ca^{2+} (frei) , 40% Albumin-gebunden,
10 - 15% Citrat, Sulfat, Hydrogencarbonat, Lactat, Phospat
- intrazellulär: Botensubstanz:
Ca-Homöostase (Konz.Gradient extra- / intra- zellulär)

Verteilung von Phosphat

Phosphat: gesamt ~ 1000 g

- 75% im Knochen als Hydroxylapatit
- 0.08% im Plasma: H_2PO_4^- und HPO_4^{2-}
- intrazellulär: anorganische & organische Phosphate
(ATP, DNA, RNA, Phospholipide, phosphorylierte Proteine)

Knochen als Ca- und Phosphat- Puffer

Ca – HOMÖOSTASE:

Organe:

Niere, Darm, Knochen, Nebenschilddrüse, Haut, Leber

Schilddrüse, Gonaden, Nebenniere, Hypophyse...

Regelfaktoren:

Ca PTH 1,25(OH)₂VD PO₄ IGF1, GH, E2, T, CORT, T3, CT, PRL ...



Vitamin D- Aktivierung → (Prohormon)

Hormone

25OH Vit D
1,25(OH)₂ Vit D

CAVE: Sonne ↓
VD Malbasorption

Lebererkrankungen

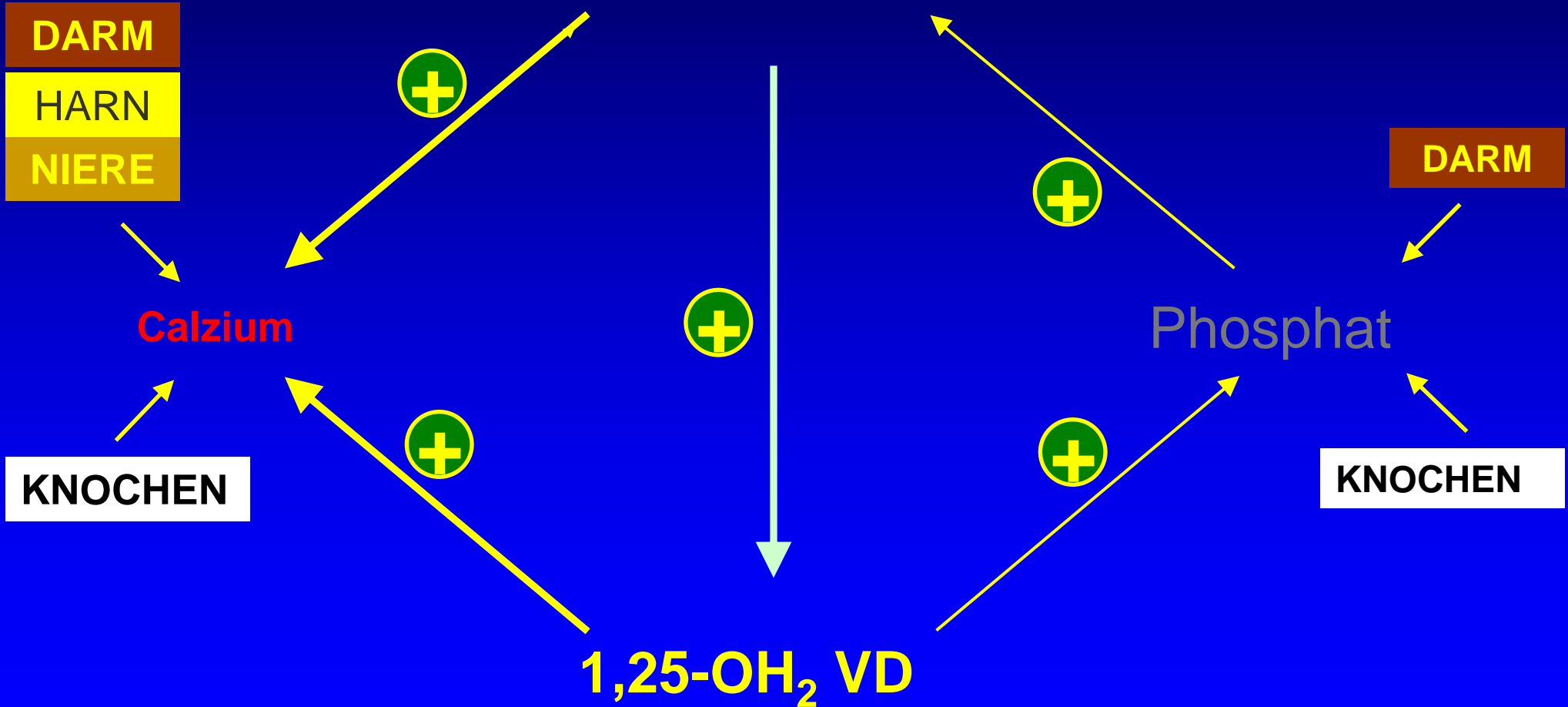
Nieren-Dysfunktion ↓↓
2°HPT (funktionell)



CALZIUM- HOMÖOSTASE

↓ Plasma – Calcium

Parathormon



CALZIUM- HOMÖOSTASE

↑ Plasma – Calcium

Parathormon

HARN
NIERE

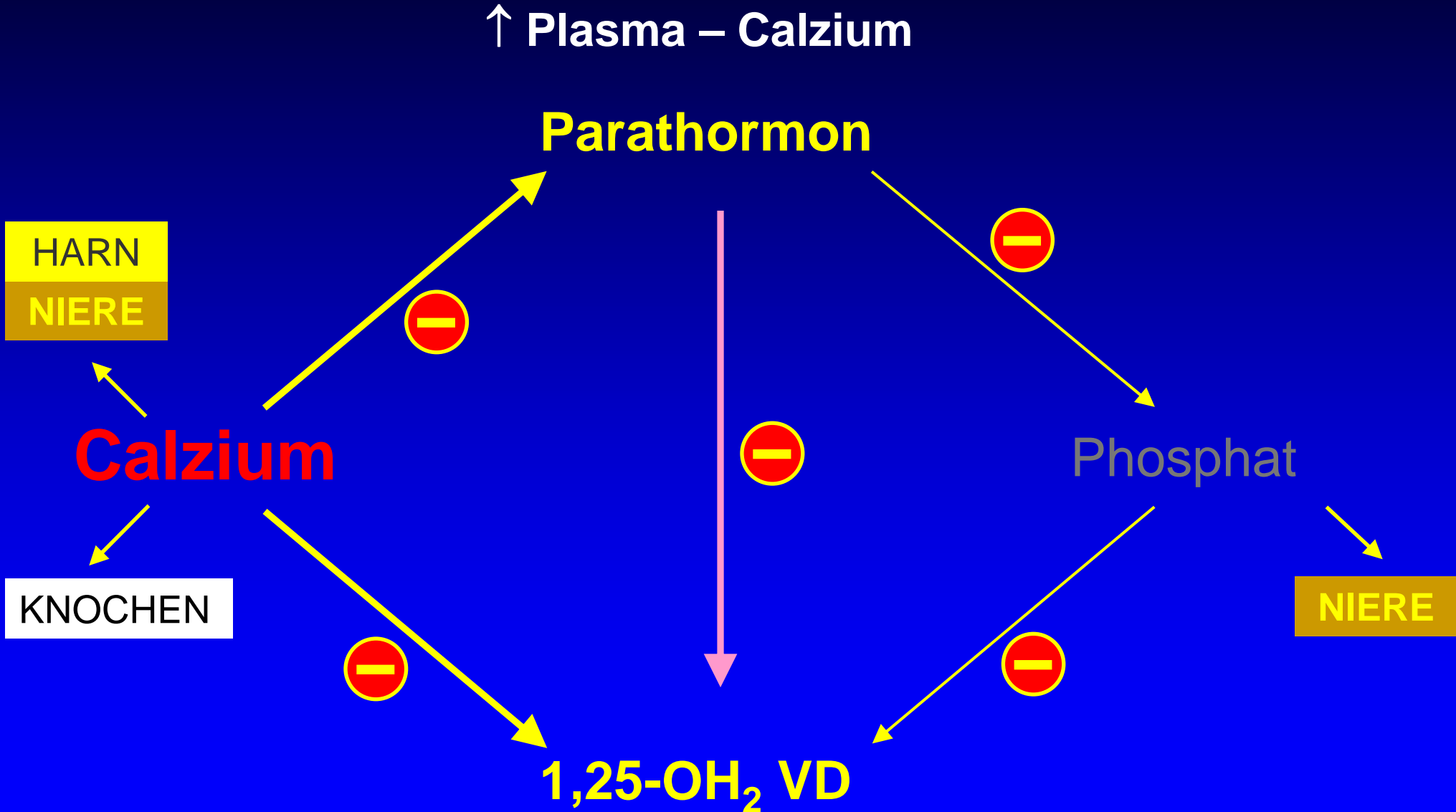
Calcium

KNOCHEN

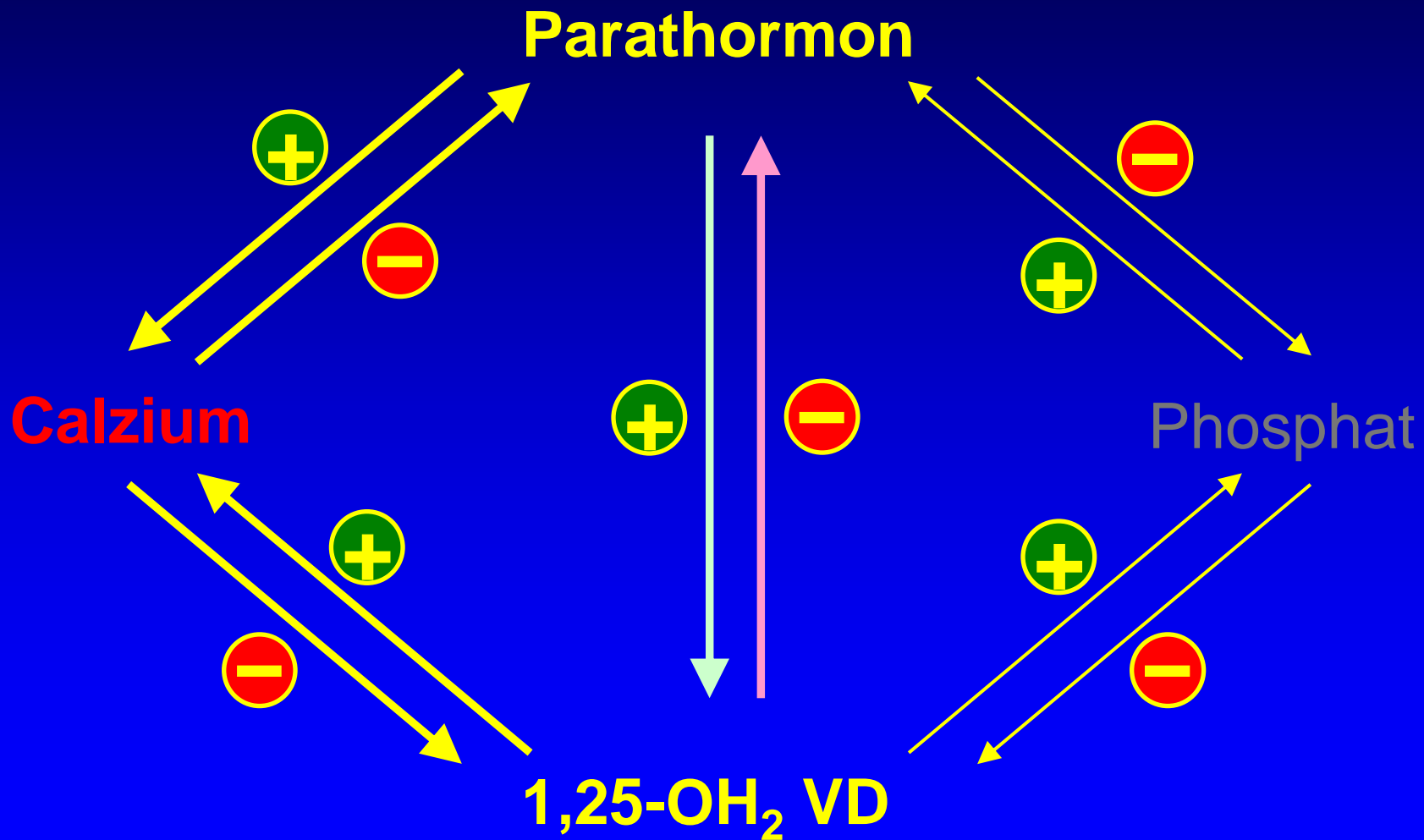
Phosphat

NIERE

1,25-OH₂ VD



CALZIUM- HOMÖOSTASE



Vitamin D und seine Bedeutung in der Präventivmedizin

Aus Wikipedia „Cholecalciferol“...

Eine Unterversorgung mit Vitamin-D scheint nach bisherigen Untersuchungen ein Risikofaktor für folgende Erkrankungen zu sein:

- Autoimmunkrankheiten (wie z. B. **Multiple Sklerose, Morbus Crohn, Diabetes mellitus Typ 1, Systemischer Lupus erythematodes**)
- Infektionskrankheiten wie **Tuberkulose** oder **Atemwegsinfekte**
- **Bluthochdruck**
- Vitamin D und Calcium sind protektiv bezüglich **Dickdarmkrebs** und einer Vielzahl weiterer Krebsarten, wie z. B. **Brustkrebs, Leukämie, Nierenkrebs, Ovarialkarzinom, Pankreaskarzinom, Karzinome des Halses, des Kopfes und des Oesophagus.**
- **Osteopenie** und **Osteoporose**
- Durch **Supplementation** von Vitamin D lässt sich die **Sturzrate** von Menschen über 65 Jahren **reduzieren**. Die Einnahme von 700 bis 1000 IE reduzierte die Sturzrate um 19 Prozent. Serumspiegel von unter 60 nmol/l Vitamin 25 OH hatten keinen Schutzeffekt.
- **Kardiovaskuläre Erkrankungen, Metabolisches Syndrom**
- Allgemein **erhöhte Sterblichkeit**
- **Muskelschwäche** und **-schmerzen** und **Fibromyalgie**
- **Demenz** und **Parkinson-Krankheit**
- **Hirnleistungsstörung**

25-OH VD und Diagnose: Mangel

Vit-D Mangelernährung

Störung der intestinalen Absorption

Verringerte Sonnenexposition

Vit-D Intoxikation

defizient: <50 nM (<20 µg/L)

insuffizient: 50 -75 nM (20-30 µg/L)

suffizient: >75 nM (>30 µg/L)

~1/1000 !!

1,25(OH)₂ VD und Diagnose

[25 - 66 pM]

Erhöht: 1°**Hyper**parathyreoidismus, Rachitis Typ 2**, Tuberkulose, Sarcoidose, M. Hodgkin, Wegener's Granulomatose, Pilz-Infektionen

Erniedrigt: CRF, 1°&2° **Hypo**parathyreoidismus, Rachitis Typ 1*, Tumor-induzierte Osteomalazie (AP↑, P ⊥↑)

* 1α-Hydroxylasedefekt

** Defekt des VDR

Synthese in Nierentubuli, Makrophagen, Endothelzellen, Colonzellen, Keratinozyten...

Hormonelle Modulatoren des Knochenstoffwechsels:

Akut:

PTH 1,25(OH)₂VD

Langzeitregulatoren der Knochenmasse:

GH → parakrin: IGF-1, TGF-β (fördernd)

E2 (>10pg/ml), T (fördernd)

CORT ⊥ (fördernd), CORT↑ (hemmend)

T3 ⊥ (fördernd), T3↑ adult (hemmend), T3↓ neonatal (hemmend)

PRL ↑ (hemmend)

DIAGNOSEBAUM nach Kudlacek KMWS 2001

Anamnese, körperliche Untersuchung

DXA T-Score

< - 2,5

-1 bis - 2,5

> - 1

Basislabor
Röntgen, QCT

pathologisch

Basislabor

normal

normal

Knochenmarker?

Labor-
diagnostische
Abklärung
Knochenmarker?

Wiederbestellung
in ~ 3a

1°
Osteoporose

2° Osteoporose
oder Osteopenie

Osteopenie

Therapie

antiresorptiv Grundkrankheit
Kontrolle durch **Marker** und DXA

sekundäre

Prävention

primäre

Laborparameter zur Diagnose von Ursachen eines gestörten Knochenstoffwechsels

„BASISLABOR“: Ca, Phosphat, AP, γ GT, KREA, BB, Eiweiß, TSH, bei CRP (BSG) \uparrow : ELPHO

25OH VD

Mangel, Intoxikation

Zusatzparameter (Absicherung, DD):

Ca/Krea, 24h-Ca

PTH 1°, 2° Hyperparathyroidismus

E2, FSH, LH, T, CORT, FT4, T3, PRL, IGF1,...

PTH-rP Neoplasie

1,25 (OH)₂ VD Nierenversagen, seltene Erkrankungen

Lactoseintoleranz

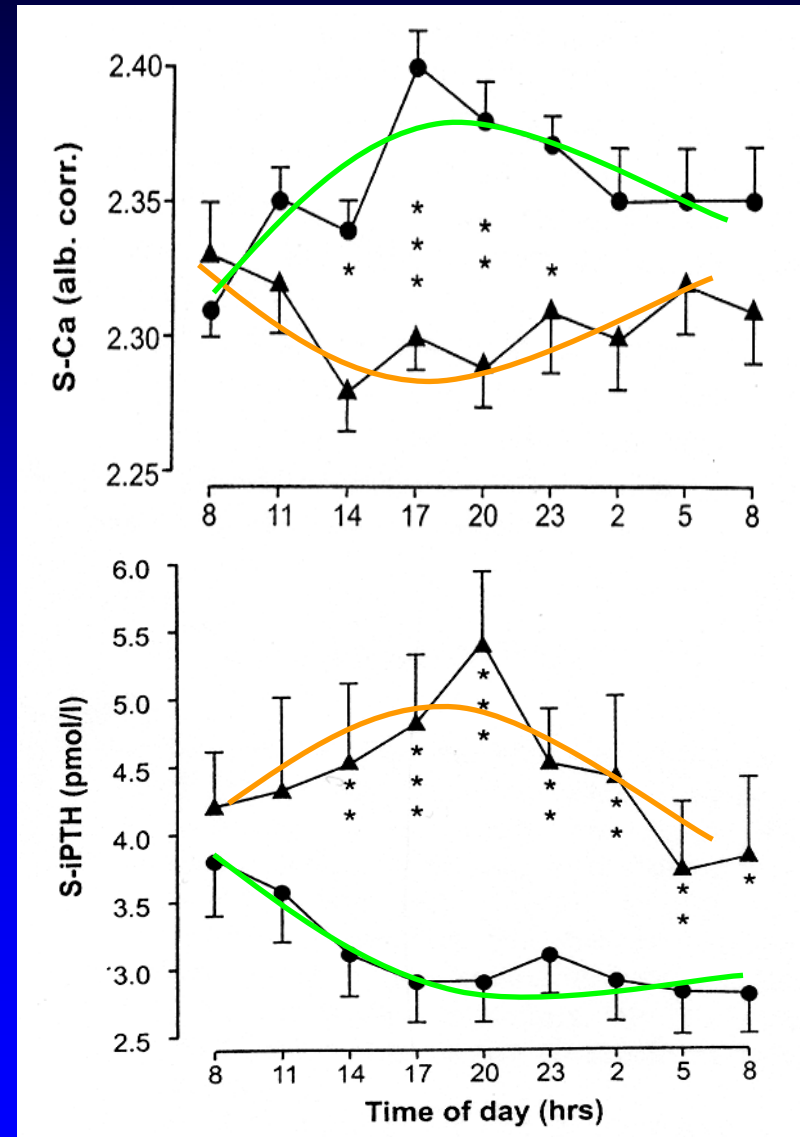
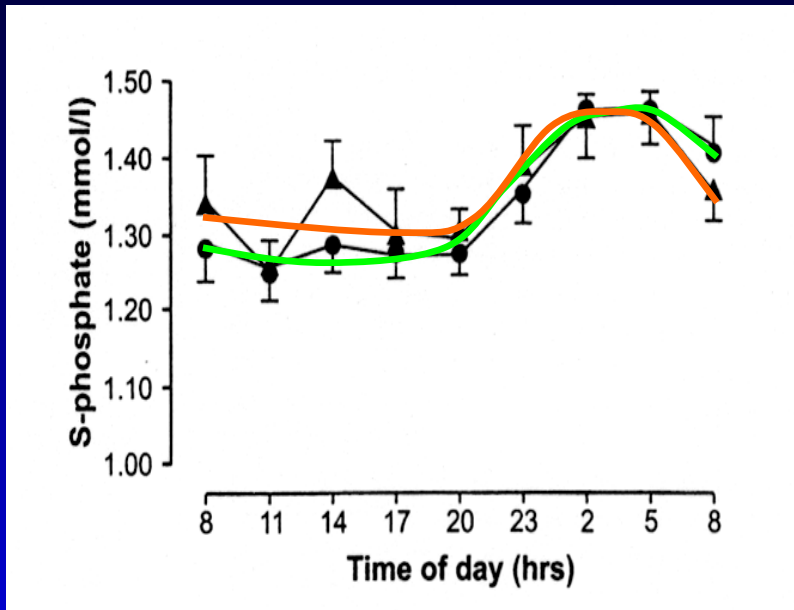
Knochenmarker für Resorption und Anbau

Differentialdiagnostisch relevante Laborparameter

	Serum Ca	Serum PO ₄	PTH	25OHD	Marker
1° OPOR	0	0	0	0	+
Knochen Metastasen	0 (+)	0	0	0	+
Neoplasie: PTH-rP +	+	0	0(-)	0	+
1° Hyperparathyroidismus (HPT)	+	-	+	0	+
2° HPT renal (CRF)	- (0)	+ (0)	++	0 / 1,25D -	+
Vit D Mangel	- (0)	- (0)	+	- / 1,25D -	+
1° Hypopara post PTX	-	+	-	0	- (0)
2° Hypopara Tubendefekt auf PTH	-	+	+	0 / 1,25D -	-
Osteomalazie kalzipenisch	-	0	+	- / 1,25D -	0(+) / BAP ++
phosphopenisch	0	-	0		0(+) / BAP ++
M. Paget	0	0	0	0	+ / BAP ++

- Abfall, + Anstieg, 0 unverändert

Zirkardiane Rhythmik von Phosphat, Ca, PTH,



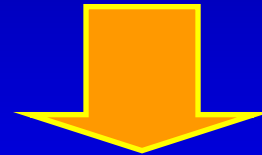
MW \pm SEM

▲ normal ● nüchtern

Knochen sind ständig

Anbau – und Resorptionsprozessen

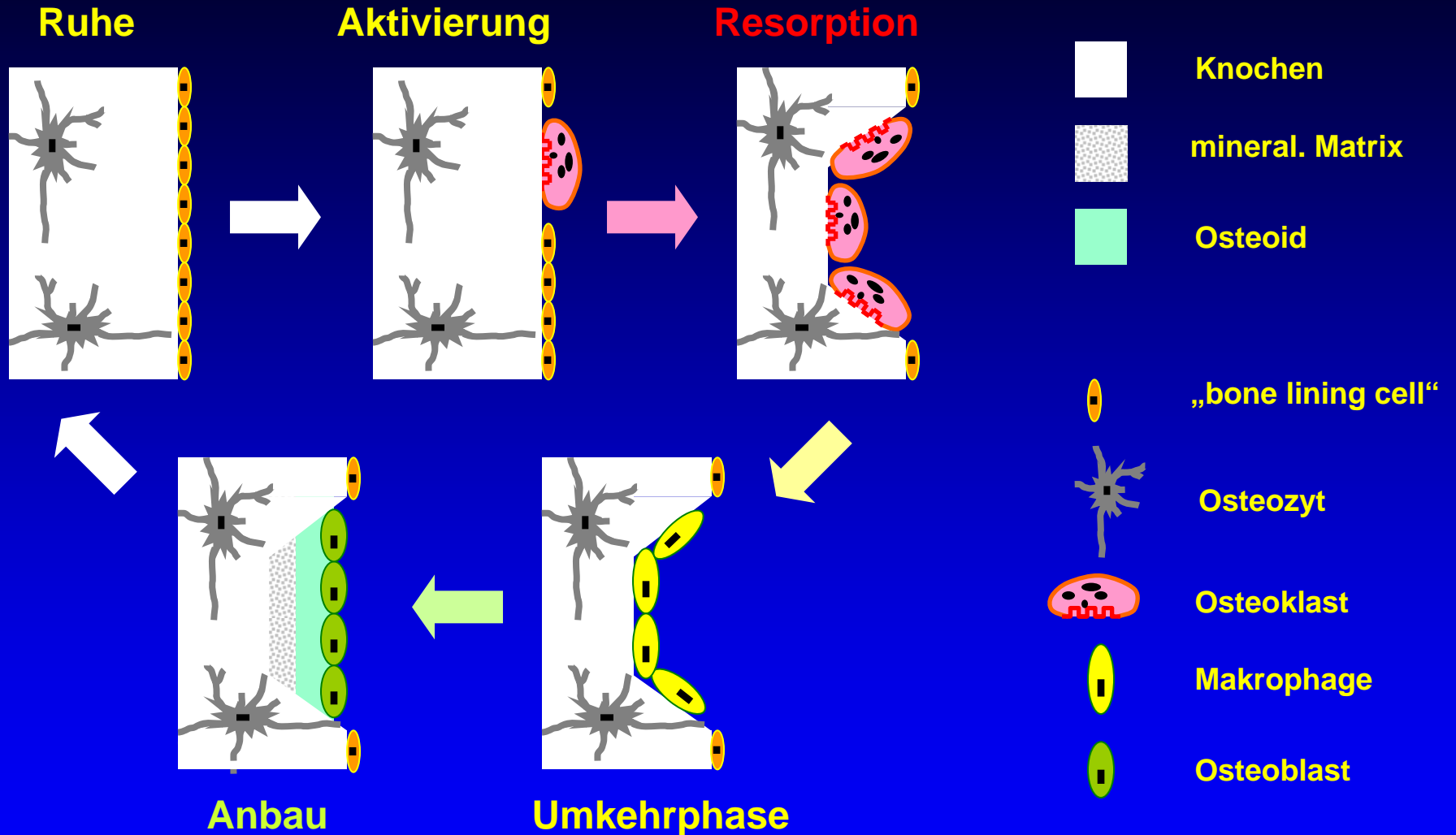
unterworfen



KNOCHENUMBAU

„bone – turnover“

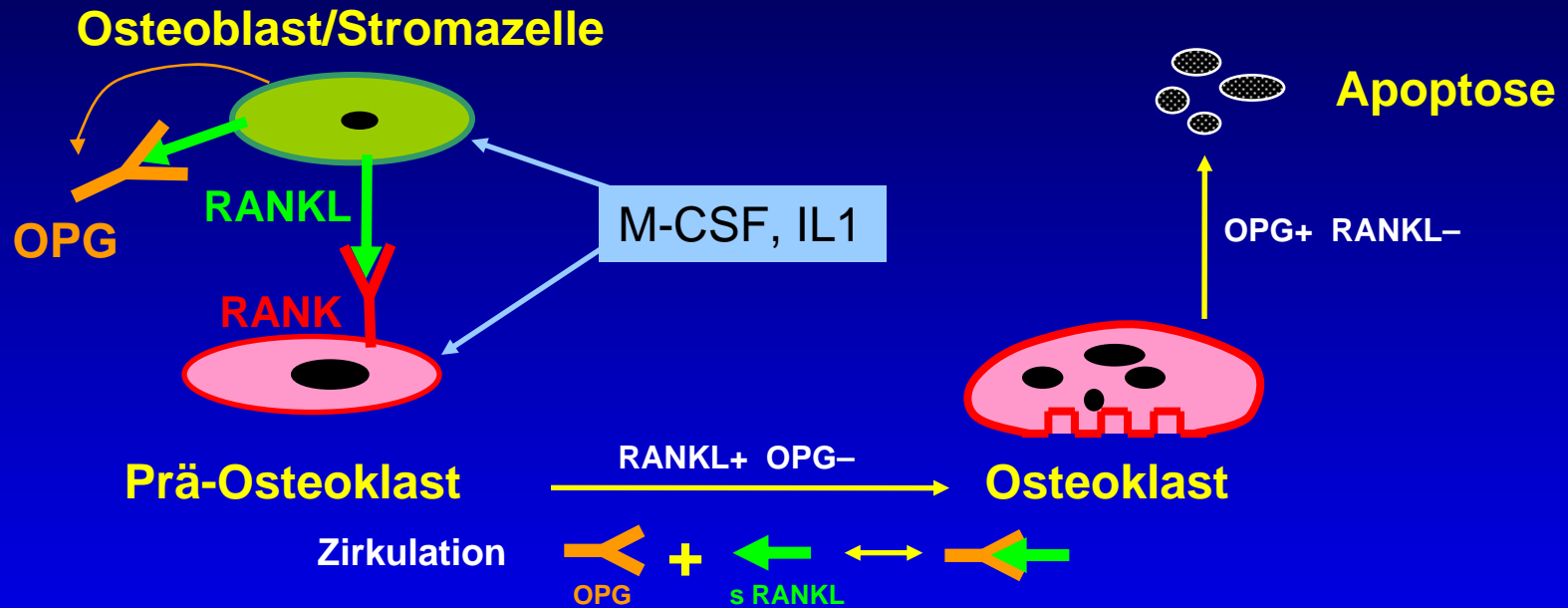
KNOCHENUMBAU



STEUERUNG: Differenzierung der Osteoklasten & Osteoblasten

Differenzierung der Osteoklasten : OPG, RANKL, RANK

OPG: Osteoprotegerin, RANKL: Ligand für Rezeptor des Aktivators von NF κ B (NF: nuklearer Faktor)



125 D, IL1, TNF, Cort, PTH, PGE2 ↑
TGF β ↓

RANKL

Resorption

OPG

↑ BMF, Ca, E2, IL1, TNF, TGF β
↓ Cort, PGE2, PTH, 125 D

Denosumab: AK gegen RANKL → Therapie

Differenzierung der Osteoblasten : Wnt - SIGNALWEG

Wnt: wingless & Int 1

LRP 5/6: LDL receptor related protein

Fz: Frizzled receptor [G-Protein]

Dvl: Disheveled

B: DKK: Dickkopf

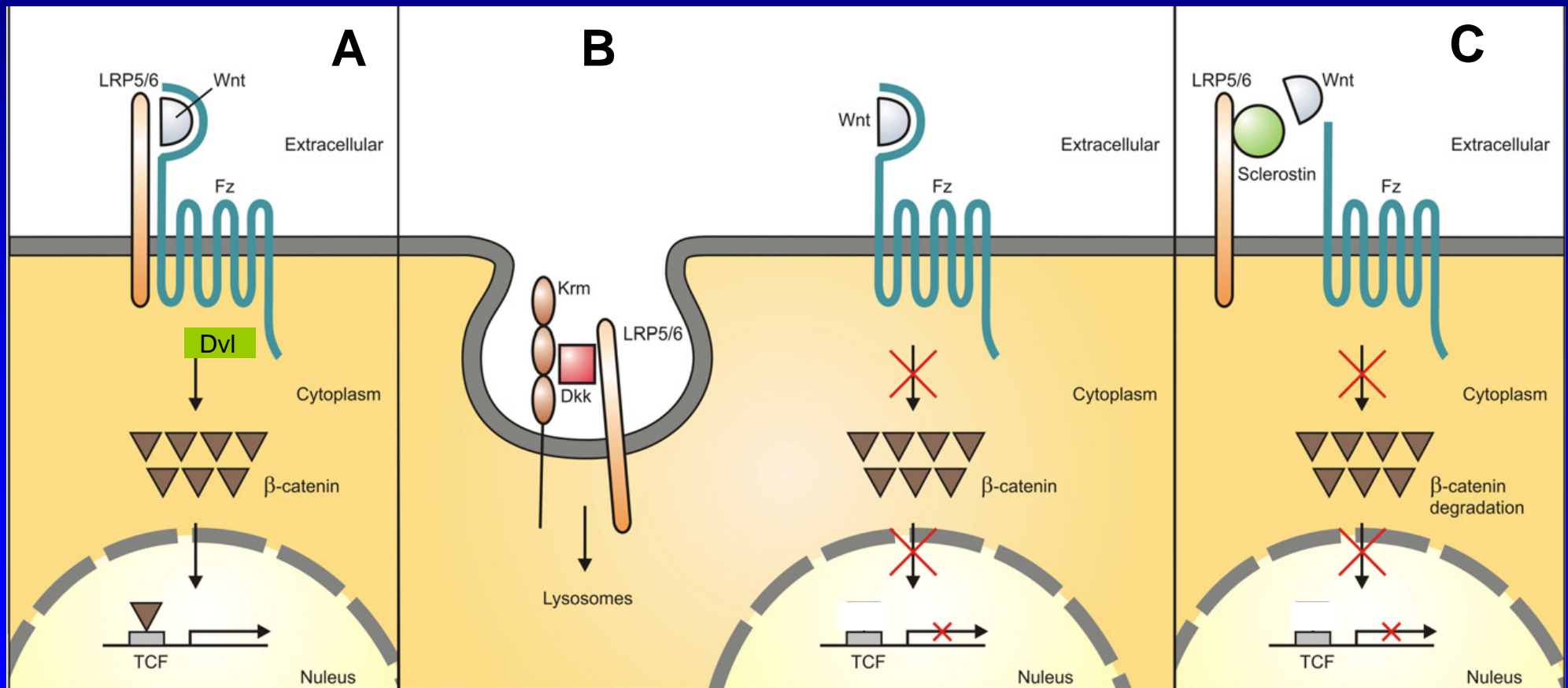
← Inhibitoren →

C: Sclerostin

Krm 1/2: Kremen [transmembranes-Protein]

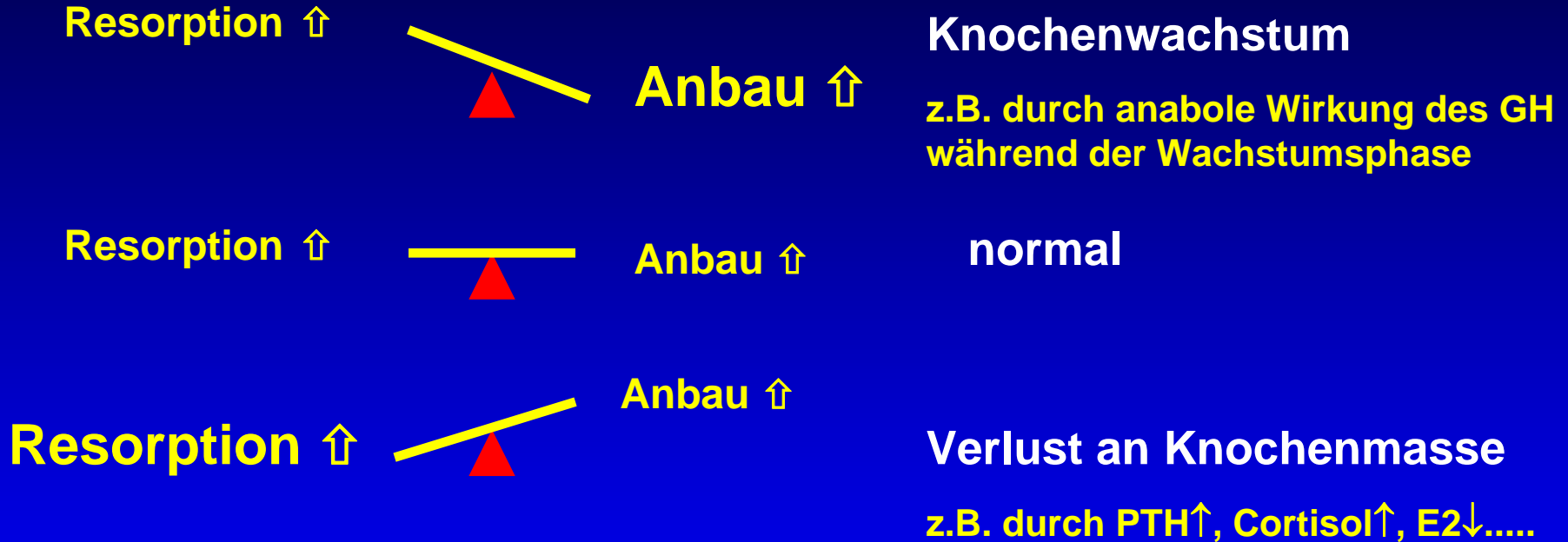
TCF: T-cell specific transcription factor

**AK gegen Sclerostin
→ Therapie**

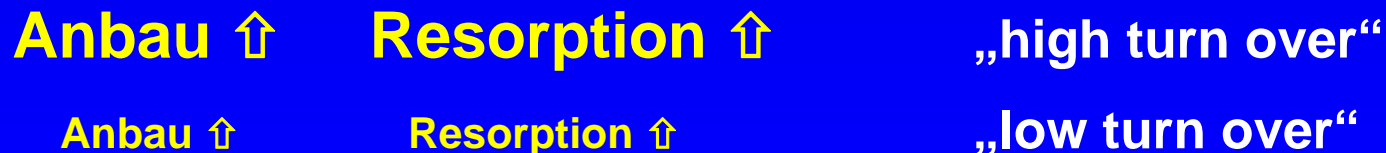


KNOCHENUMBAU

1.) Nettobilanz:



2.) Geschwindigkeit:



- **Frühzeitige Erkennung von Störungen der Netto-Bilanz**
 - **Klassifizierung von high und low turn-over**
 - **Therapieentscheidung und Nachkontrolle**

durch

KNOCHENMARKER

(Komponenten der Knochenmatrix /Sekretionsprodukte der Knochen auf- und abbauenden Zellen)

Idealer Anbau-Marker:

Knochenspezifisches Struktur Protein, das proportional zu seinem Einbau auch in das Blut abgegeben wird - unabhängig von Erkrankungen.

Idealer Resorptions-Marker:

Abbauprodukt einer knochenspezifischen Matrixkomponente, für Neubildung nicht wiederverwendbar.

KNOCHENMARKER: EINSCHRÄNKUNGEN

Selektivität, Metabolismus, Clearing, HWZ

Kongruenz, Erkrankungen, Dynamik

Zirkardiane, saisonale Rhythmik

Individuum, Menstruationszyklus

**Osteoblast/Osteoklast Syntheseprodukte werden in
verschiedenen Differenzierungsstadien der Zellen exprimiert**

Knochenmatrix:

- **Zellen: Osteozyten**
- **Mineralstoffe: Ca Mg Sr Ba Na K Phosphate, Fluoride**
- **Extrazelluläre Matrix: Osteoid**

➔ **90% Kollagen: 97% Typ I, 3% Typ III, V, IX**

4% Proteoglykane (Chondritinsulfat, Glucuronsäure, Heparansulfat, Decorin, Biglycan)

Zelladhäsionsmoleküle (Fibronectin, Thrombospondin, Vitronectin, Osteopontin, Knochensialoprotein)

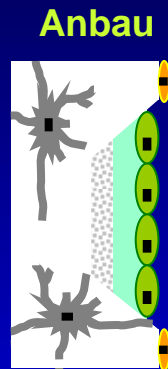
2% Osteonectin

1% γ -carboxylierte Proteine (Osteocalcin, Matrix GLA Protein)

3% gespeicherte Wachstumsfaktoren (IGF, TGF- β)

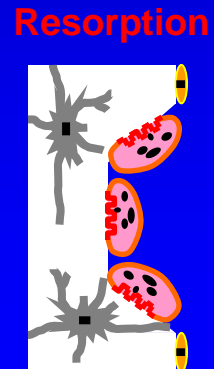
TYP I - KOLLAGEN MARKER

Osteoid: Syntheseprodukt der Osteoblasten



- ⇒ Knochenanbau
- ⇒ u.a. Synthese von Typ 1 Kollagen
(~ 90% des Osteoids)

Abbau der Knochenmatrix durch Osteoklasten



- ⇒ Knochenresorption
H⁺ Ionen & Proteasen
- ⇒ u.a. Proteolyse von Typ I Kollagen

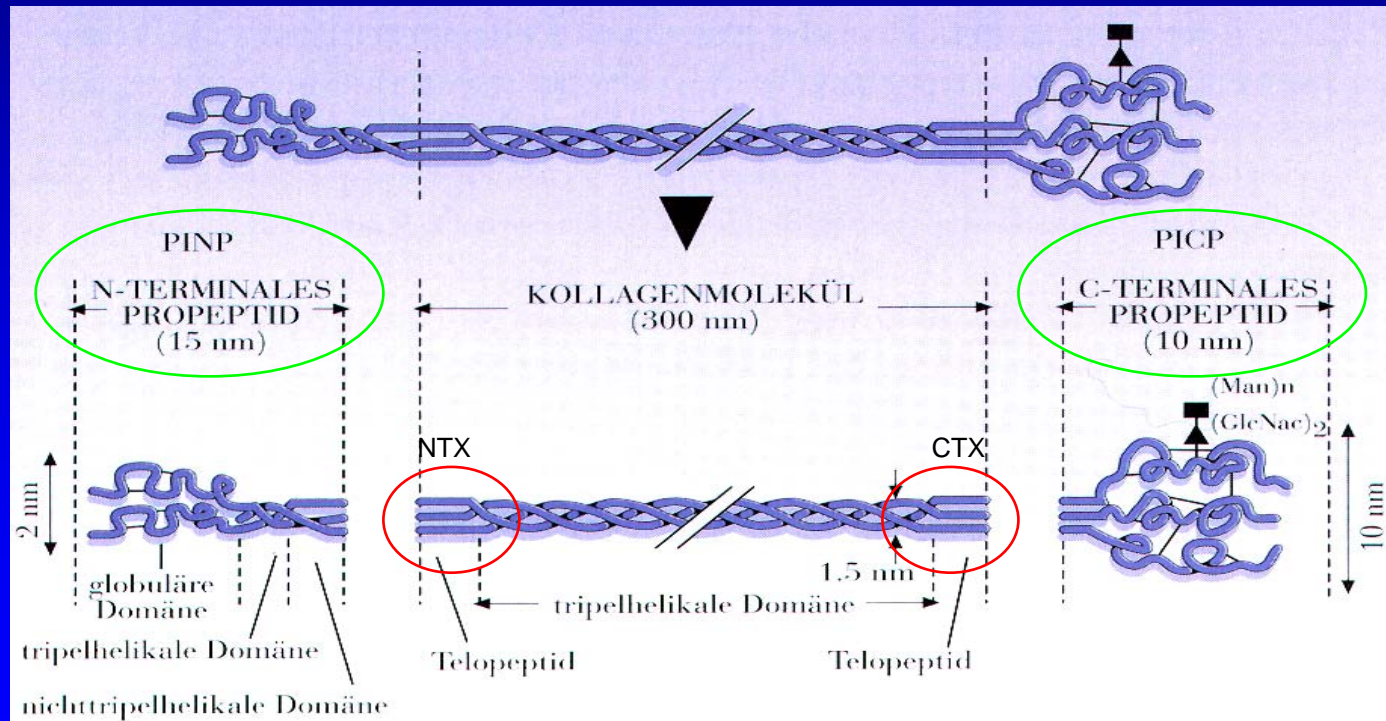
Typ I Kollagen

häufigste Proteinart, ~ 70% aller Kollagene ≡ 2-3 kg

Knochen > Sehne > Haut > Knorpel > Gefäße > Organe

Heterotrimer: 2 α 1(I) (Chromosom 17) und α 2(I) (Chromosom 7); Splicing-Varianten!

Helikale Region: (Gly - X - Y)_n Modifikation ⇒ Hyp, Hyl



Typ I Kollagen **Anbau - Marker *)**

PINP

Prokollagen Typ I N-terminales Propeptid

35 kD, globulär & helikal,

phosphoryliert

Clearing Leber

ECLIA: Roche (automatisiert)

**Deutliche Änderungen durch
antiresorptive Therapien!**

PICP

Prokollagen Typ I C-terminales Propeptid

100 kD, globulär

Mannose-Oligosaccharide

Clearing Leber (Mannoserezeptor)

RIA: Orion, Incstar

***) werden auch in Sehnen, Haut & Knorpel gebildet!**

Typ I Kollagen **Resorptions** - Marker

Abbau des Typ 1 Kollagens durch:

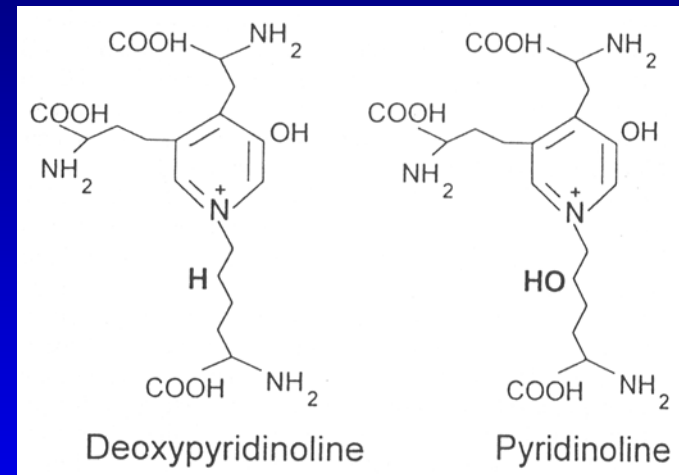
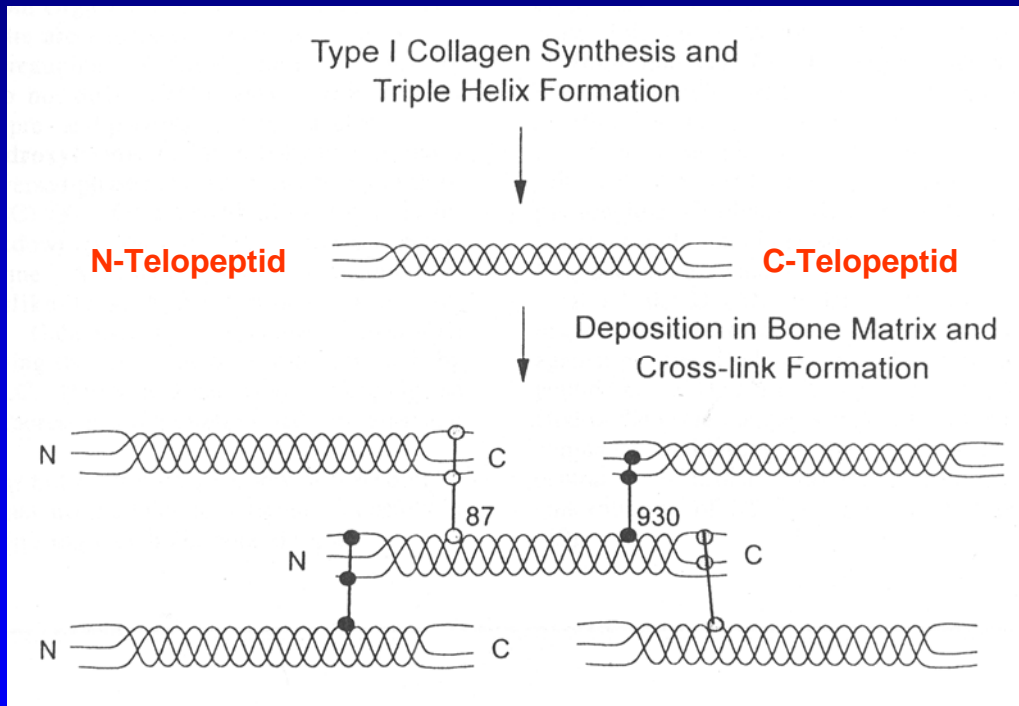
- **Metalloproteasen** (interstitielle Kollagenase, Stromelysin, Gelatinase)
- **Telopeptidasen**
- **Kathepsin K**
- **Plasmin**

⇒ **Komponenten gelangen in die Zirkulation**

Typ I Kollagen **Resorptions** - Marker

Reifung der Kollagenmatrix: bivalente und trivalente Quervernetzungen

N- und C- Telozeptidregionen bilden trivalente Quervernetzungen (X) zwischen Fasern:



DPD:
2 Hly+1Lys

PYD:
3 Hly

Typ I Kollagen **Resorptions** - Marker

X- Clearing: Niere, zirkardiane Rhythmik (Tag ↓) ⇒ Serum: nüchtern

24 h Harn / 2. Morgen-Harn: Normierung auf Kreatinin **Stabil!**

PYD Pyridinoline	DPD Deoxypyridinoline	NTX N-Telopeptid Crosslink	CTX C-Telopeptid Crosslink
HPLC: gesamt (frei + Peptid-gebunden), frei		Peptid-gebunden	Peptid-gebunden
Knochen, Bindegewebe	primär Knochen	~ Knochen	~ Knochen

✓ Kollagen Marker:

Anbau - Marker (PICP, PINP)

Resorptions - Marker (PYD, DPD, NTX, CTX, ICTP)

Nicht- Kollagen Marker:

Anbau - Marker (Osteoblast ⇒ OC, BAP)

Resorptions - Marker (Osteoklast ⇒ TRAP)

Neue Marker (BSP, OPN, SPARC, RANKL, OPG)

Osteoblast Anbau – Marker

OSTEOCALCIN (OC, bone GLA-Protein)

Synthese in Osteoblasten & Odontoblasten unter Kontrolle von 1,25 D

C-Terminus: Chemotaxis, Ca-Bindung

HWZ 5 min, Proteolyse durch Plasmin, Kathepsine: Fragmentierung auch bei Resorption!

Saisonale Rhythmik: $\pm 25\%$ (Februar \uparrow Juli \downarrow)



Synthese: Vit K anhängige Carboxylase

→ AS 17, 21, 24: γ -Carboxy-Glutaminsäuren \Leftrightarrow Hydroxylapatit Bindung

Vit K - Malabsorption beim apo E4- Phänotyp:

\Rightarrow unter-carboxyliertes OC \uparrow \Rightarrow Knochendichte \downarrow Risiko für Hüftfrakturen \uparrow

\Rightarrow Marcoumar (Vit K Antagonist): OC \downarrow , unter-carboxyliertes OC \uparrow

Osteoblast Anbau - Marker

KNOCHENSPEZIFISCHE ALKALISCHE PHOSPHATASE (BAP)

Isoenzyme (4 Gene): Darm, Plazenta, Plazenta - ähnlich
Leber / Niere / Knochen ⇒ Glycosylierung

BAP: membrangebundenes tetrameres Glycoprotein

⇒ Freisetzung durch Phospholipase

Clearing: Leber, saisonale Rhythmik, stabil

Immunologische Methoden: ~ 10% Kreuzreaktion zu Leber - Enzym

⇒ Cave Lebererkrankungen!

Osteoklast Resorptions - Marker

TARTRAT RESISTENTE SAURE PHOSPHATASE Typ 5b (b-TRAP)

5 Isoenzyme: Prostata, Uterus, Pankreas, Milz, Blutzellen, **Osteoklast**
(PAP)

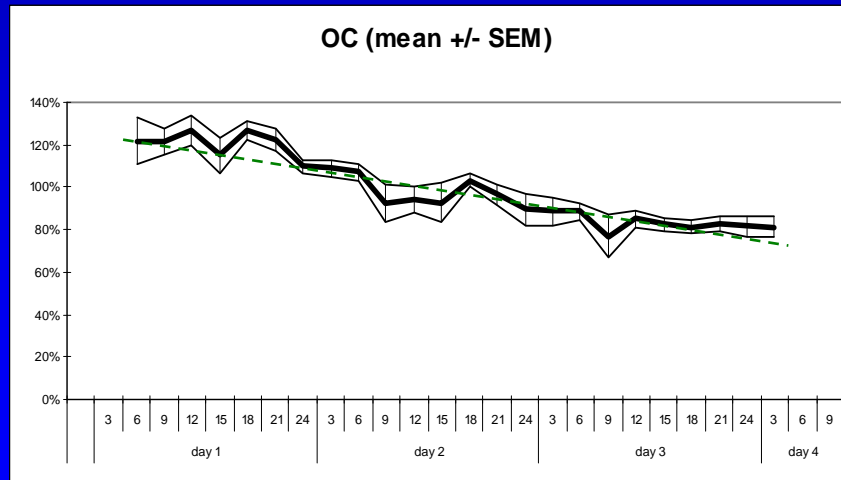
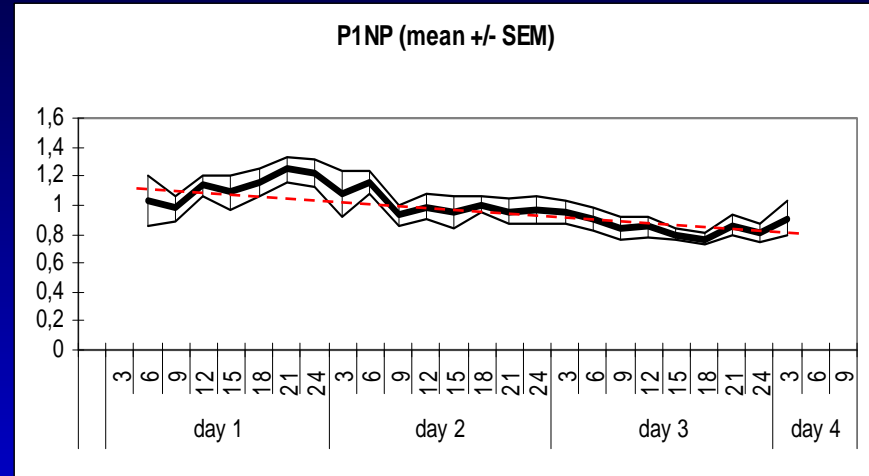
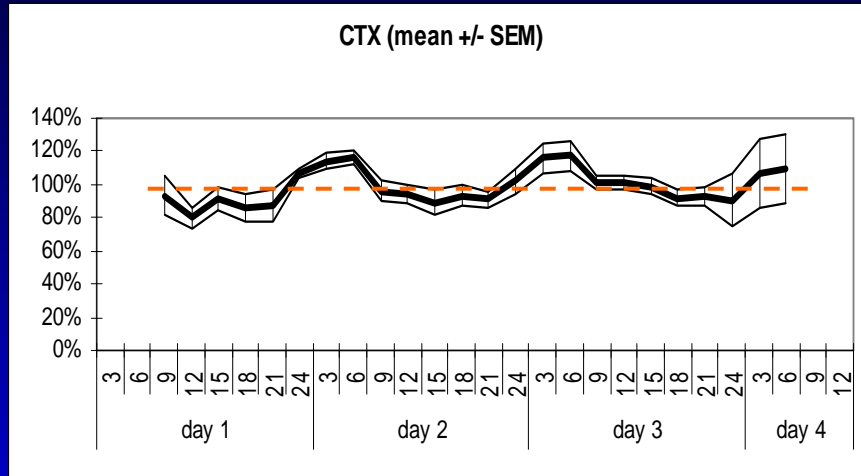
b-TRAP: Isoenzym Typ 5b

Lysosomales [Fe] Enzym: Thyrosin-Phosphatase,
Generator für OH^\bullet , Fe-Metabolismus

Clearing: Leber Rhythmus gering

CAVE: instabil \Rightarrow - 80°C !!

Zirkardiane Rhythmik (Hungerversuche, n=10)



BEEINFLUSSUNG VON KNOCHENMARKERN

unkontrollierbar

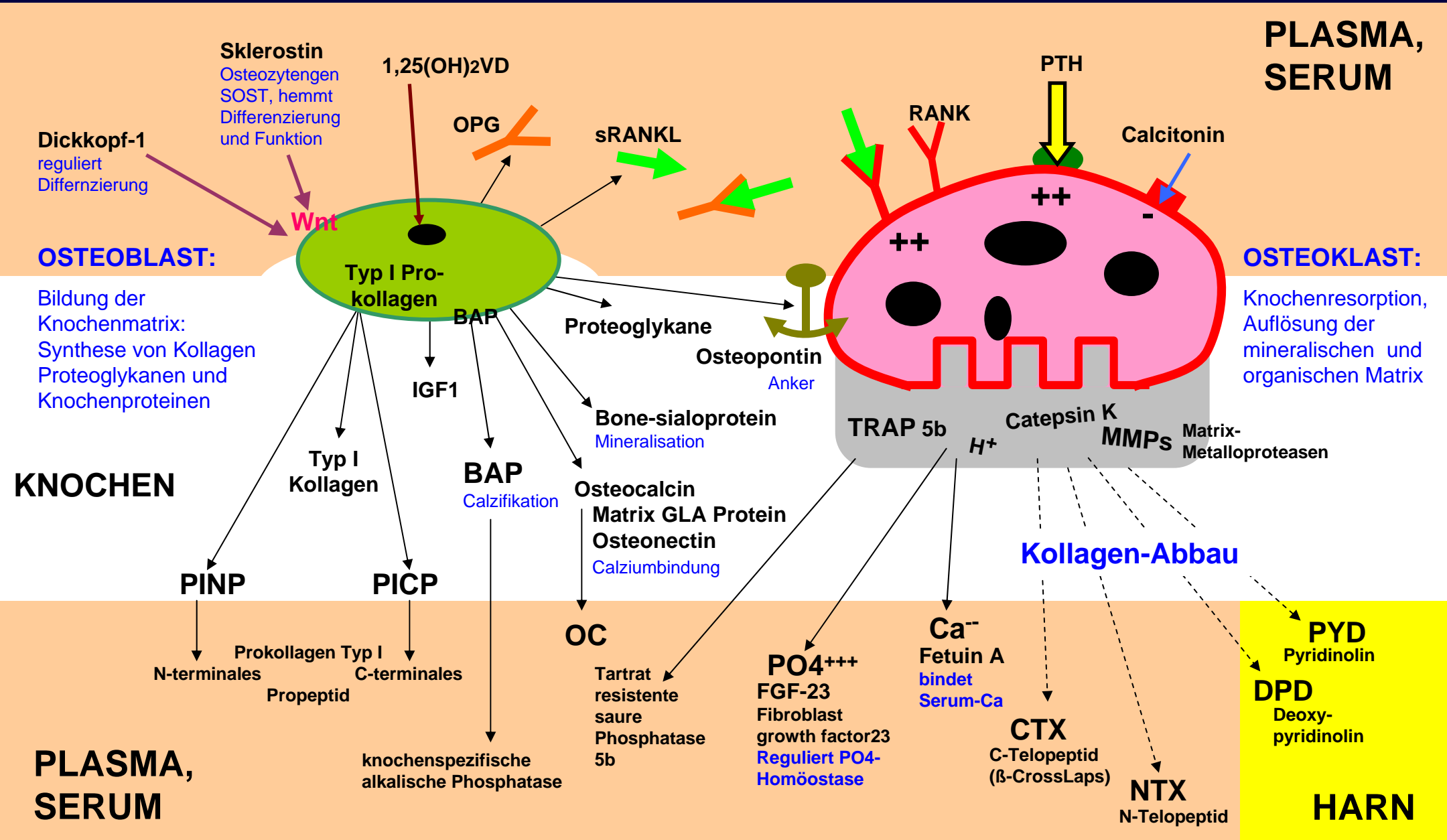
Alter (Kindheit↑), **Geschlecht** (Menopause↑), **Nierenfunktion** (CRF ↑), **Rasse** (Kaukasier ↑),
Brüche ↑, **Schwangerschaft & Stillen** ↑ [OC↓],
Immobilität ↑, **Grundkrankheiten**
Medikamente: Antiresorptiv ↓, Thiazide ↓, Kontrazeption (↓), CORT ↑ [OC ↓]

kontrollierbar

Zirkardiane & saisonale Rhythmik ↓ ↑,
Zyklus (~, luteal ↑),
intensives körperliches Training (↓, akut ↑)
Individuelle Fluktuation: Serum < Harn
Stabilität (-20; -80°C)

Referenzwerte: Alter (>30a), Geschlecht, Menopausenstatus, nüchtern am Morgen

Zusammenfassung KNOCHENSTOFFWECHSEL



KLINISCHE BEOBACHTUNGEN:

Saisonale Schwankungen:

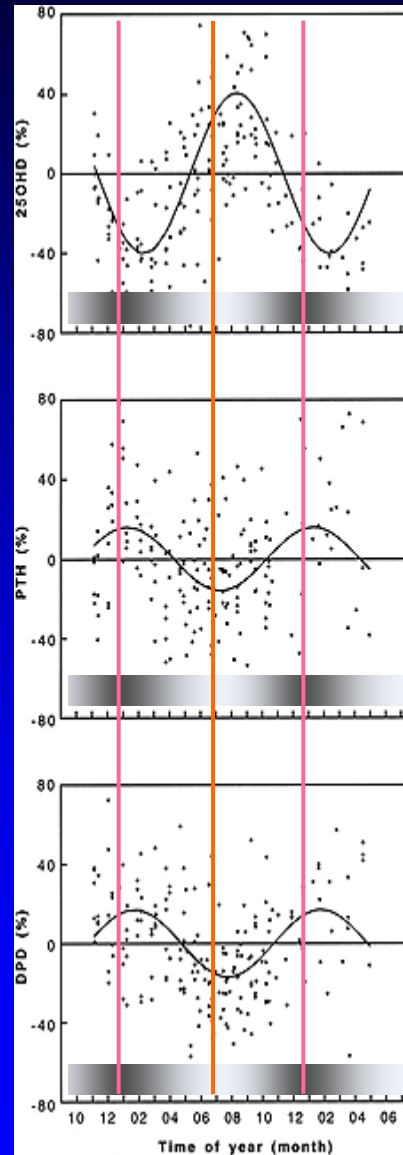
25OH VD

PTH

„Resorptionsmarker“
DPD bzw.
CTX

Europa 49, 5°N

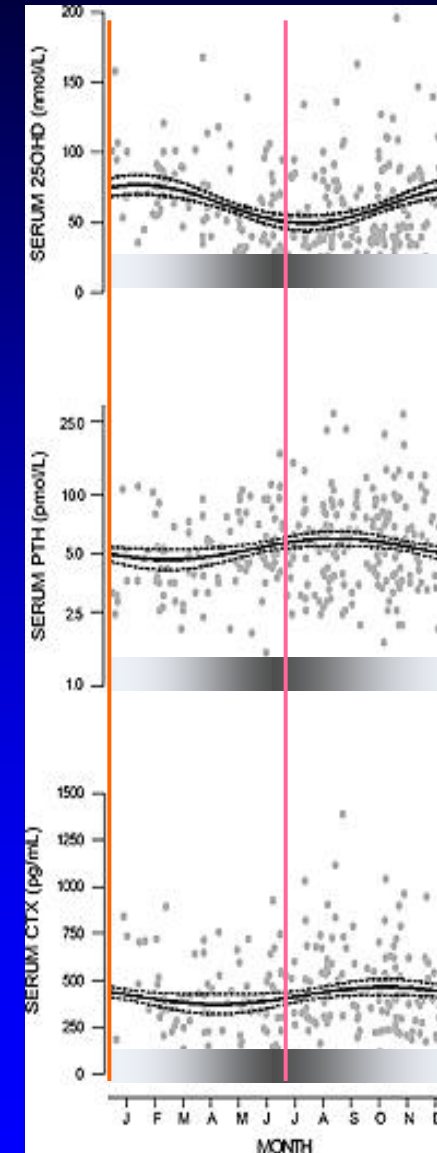
WSW SSW WSW



Woitke et al. JBMR 2000

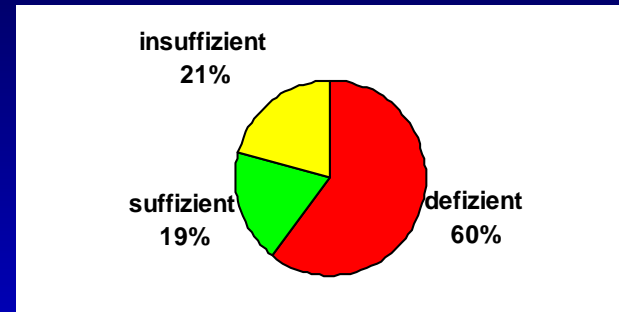
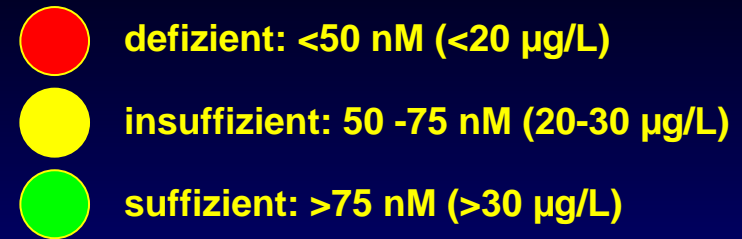
Australien 38,5°S

SSW WSW



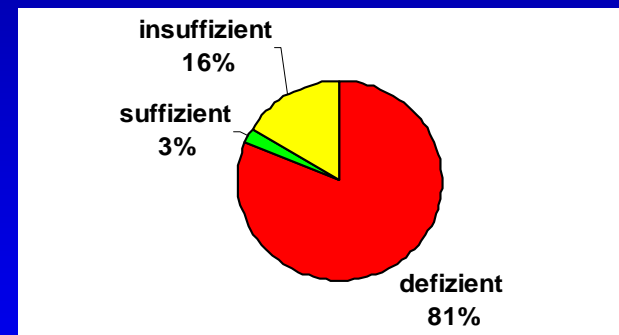
Pasco et al. JBMR 2004

Vit D Versorgung



Österreich n=1013

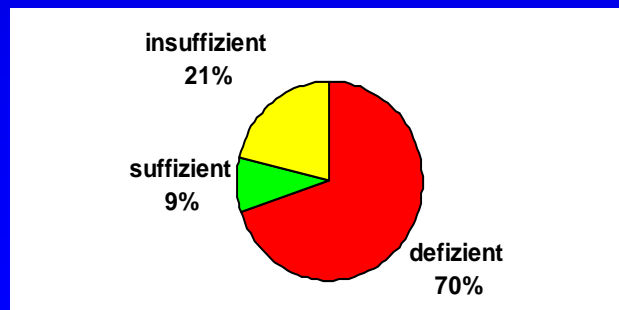
S Kudlacek et al. EJCI, 2003,33: 323



Spanien, Vic

n=1724 postmenop. Frauen

E. Kanterewitz, pers. Mitteilung

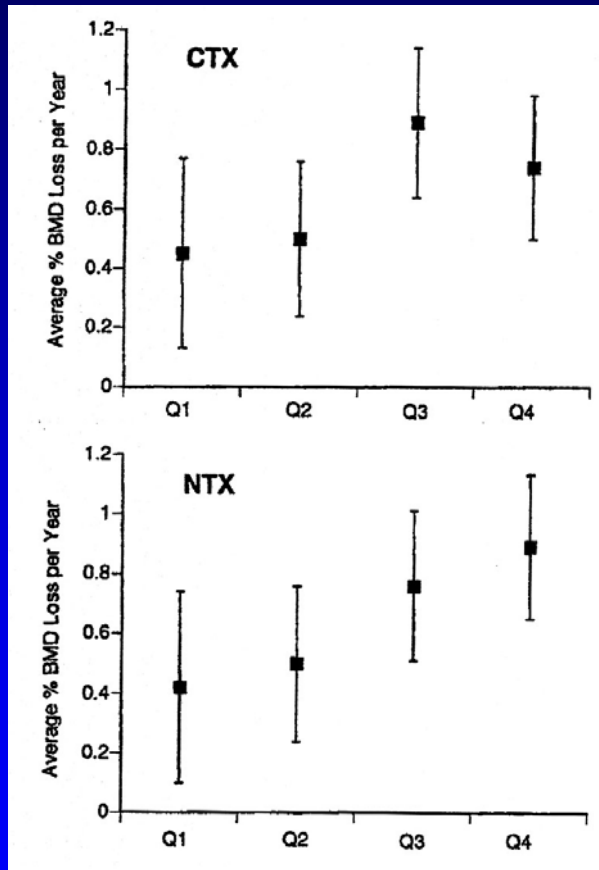


Pakistan, Kabul n=123

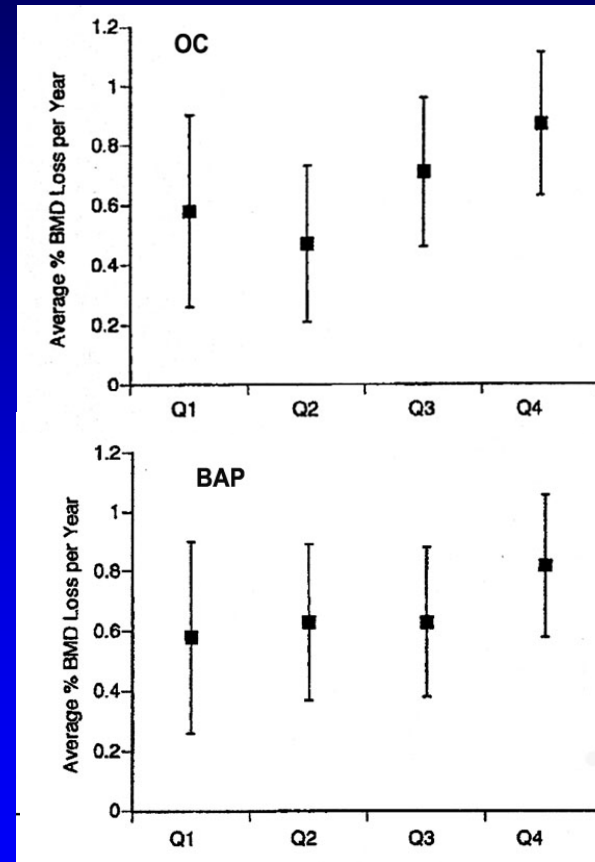
S Mansoor et al. CLB, 2010 im Druck

Mittlerer Knochenverlust /a in der Hüfte und Quartilen-Bereiche

Resorptionsmarker

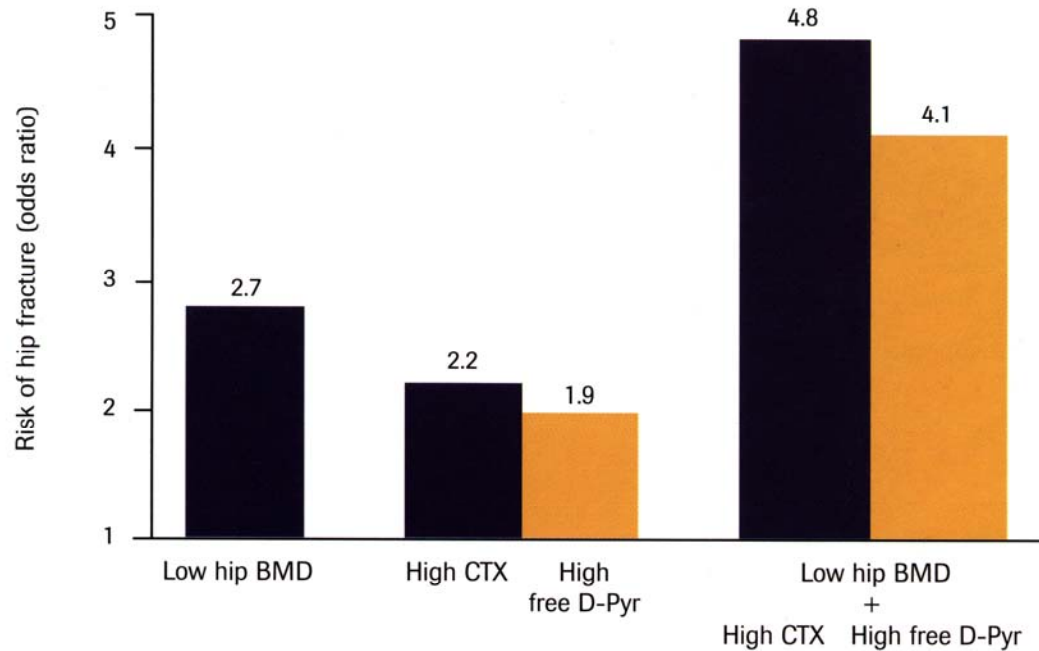


Anbaumarker



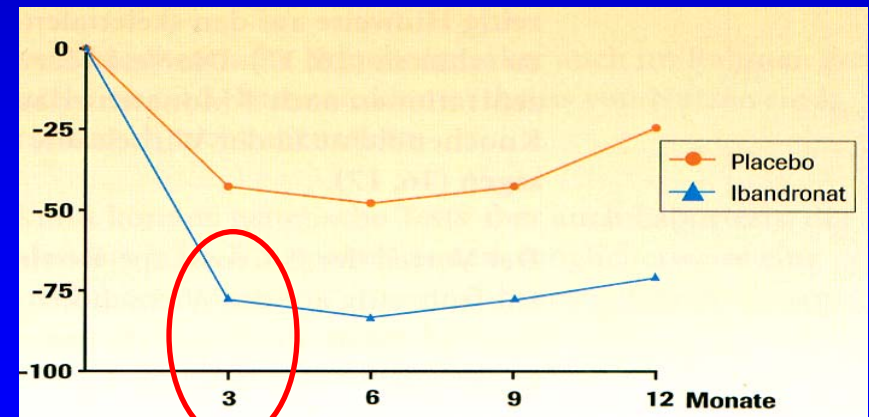
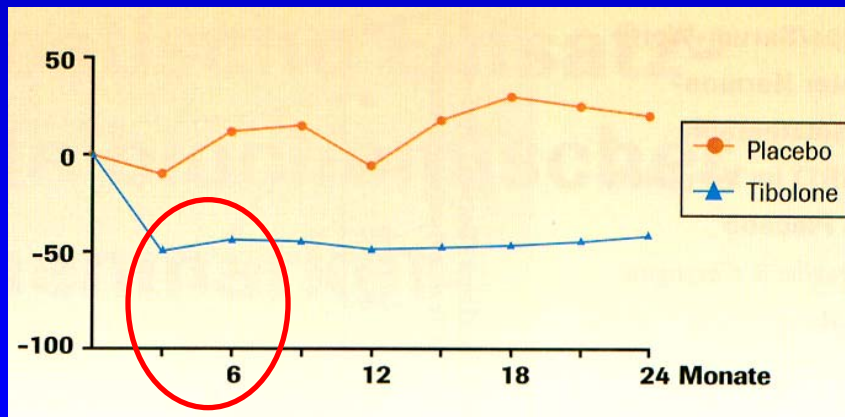
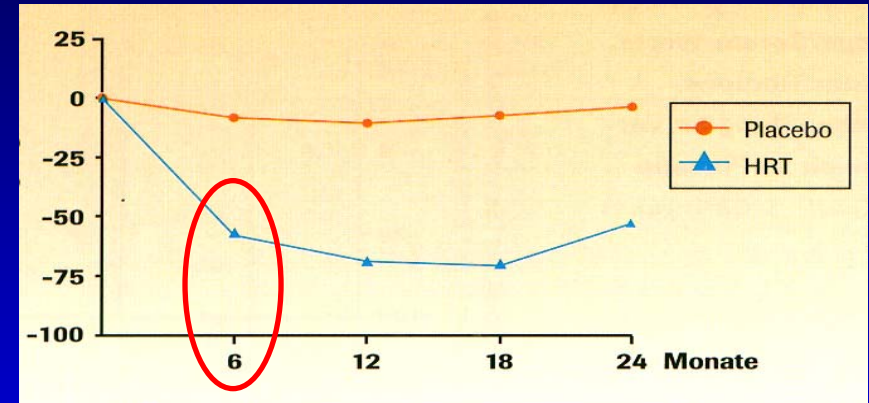
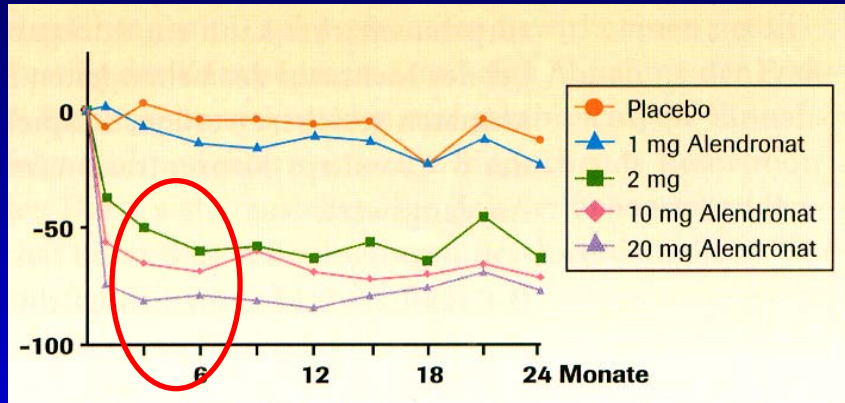
Bruchrisiko: BMD und erhöhte Resorptionsmarker sind additiv!

Combination of the Assessment of BMD and the Bone Resorption Rate to predict Hip Fracture Risk in the Elderly



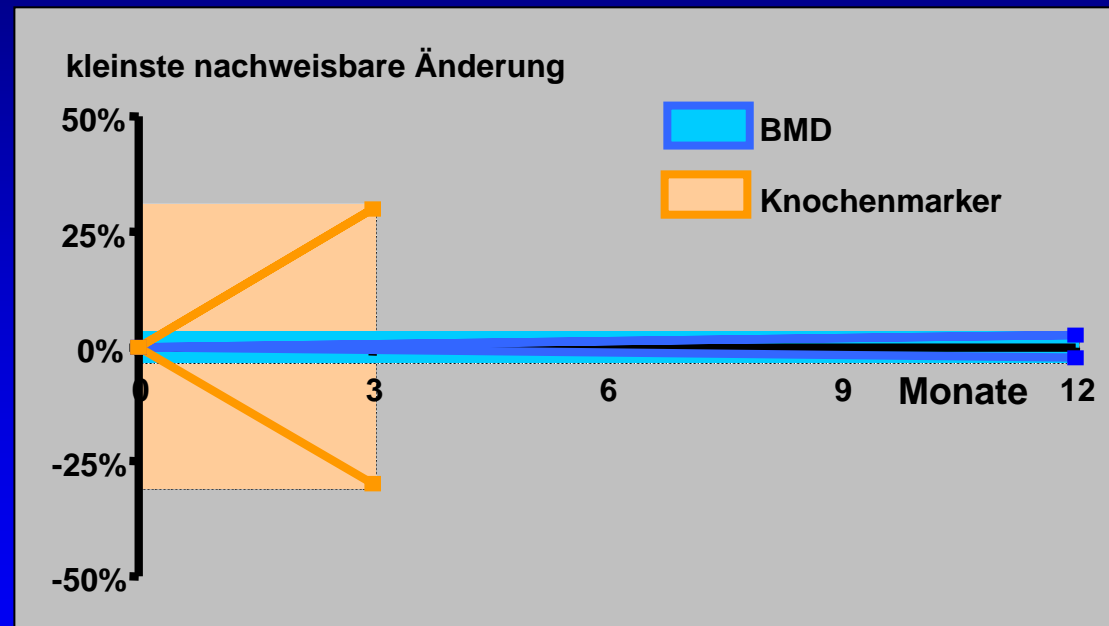
Reproduced from Ganero et al. ²⁴⁾

Antiresorptive Therapie und S-CTX (0%=Ausgangswert)



KNOCHENMARKER

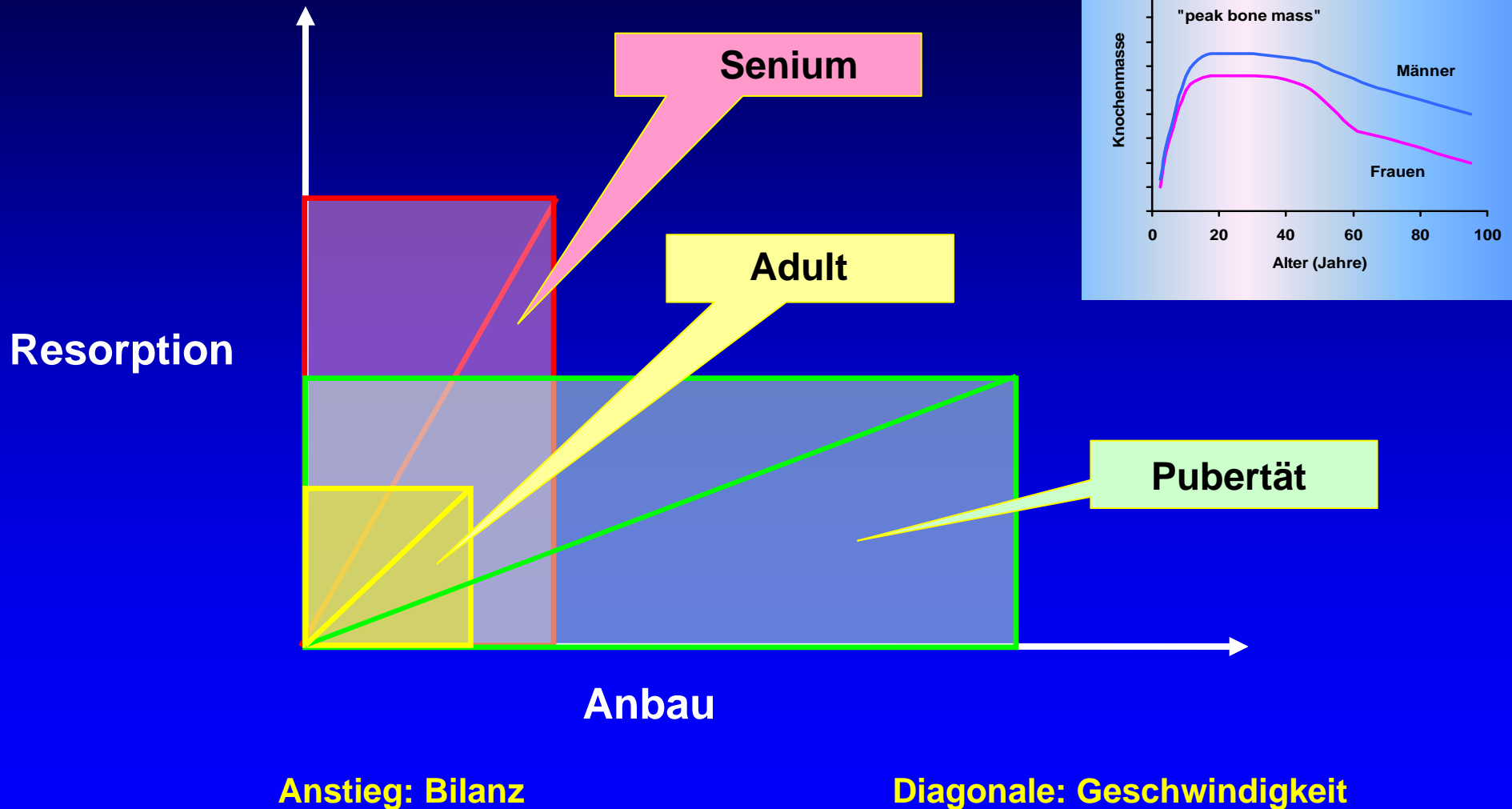
- sind ungeeignet zur Diagnose der Osteoporose (DEF: über BMD)!
- sind geeignet zur Therapiekontrolle (rascher als BMD)



„significant least change“ $SLC = 2,77 * \sqrt{Cv_i^2 + Cv_a^2}$ $p < 0,05$

Cv_i individuelle Streuung Cv_a analytische Streuung

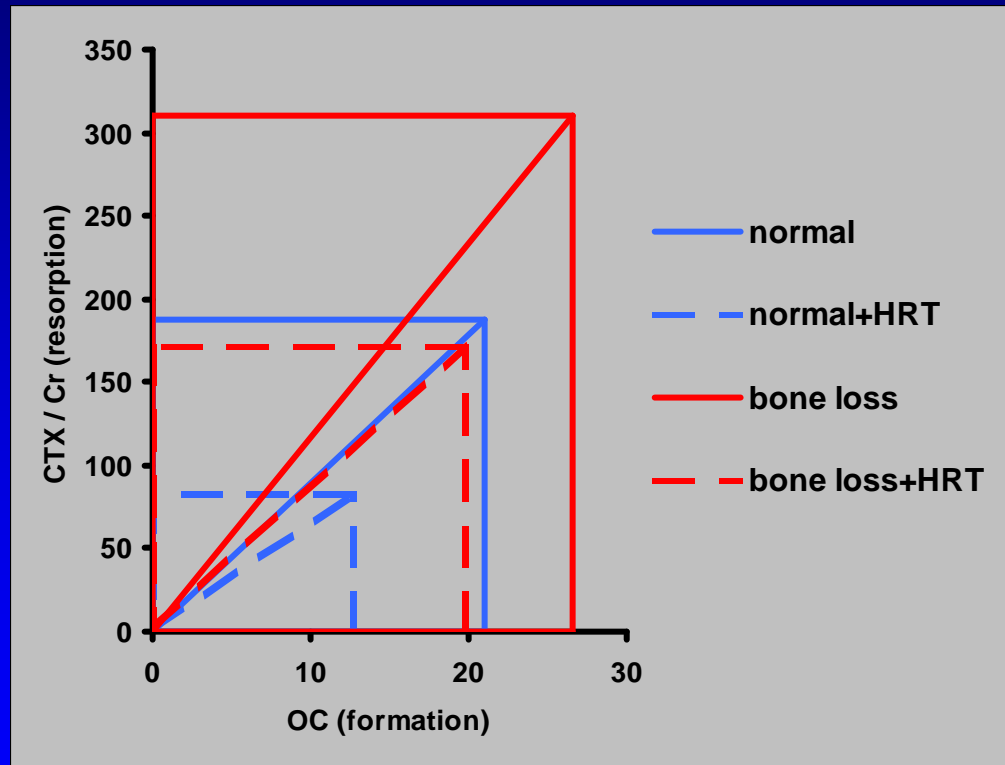
Schema: Veränderung der Kinetik des Knochenumbaus



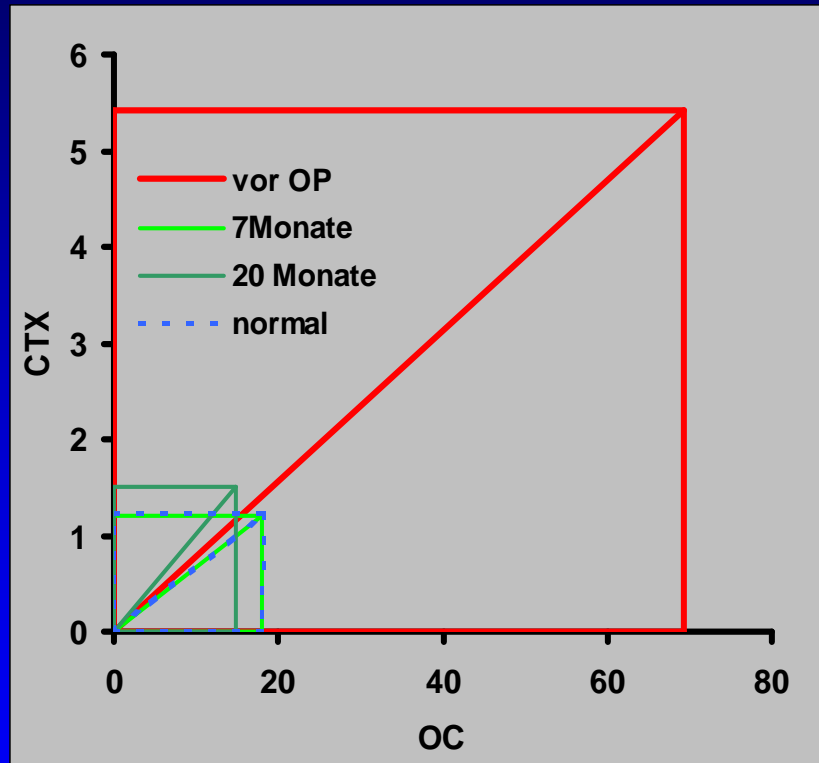
Meopausale Frauen

+/- Osteoporose

+/- HRT

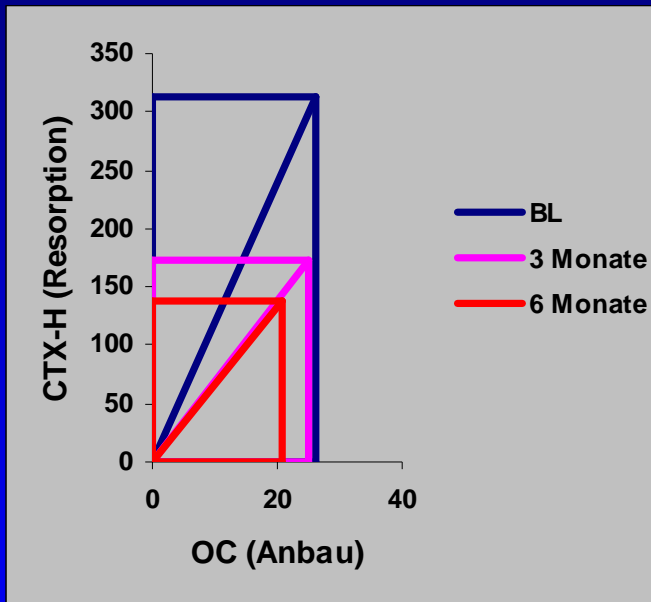


Prä und post 1° HPT

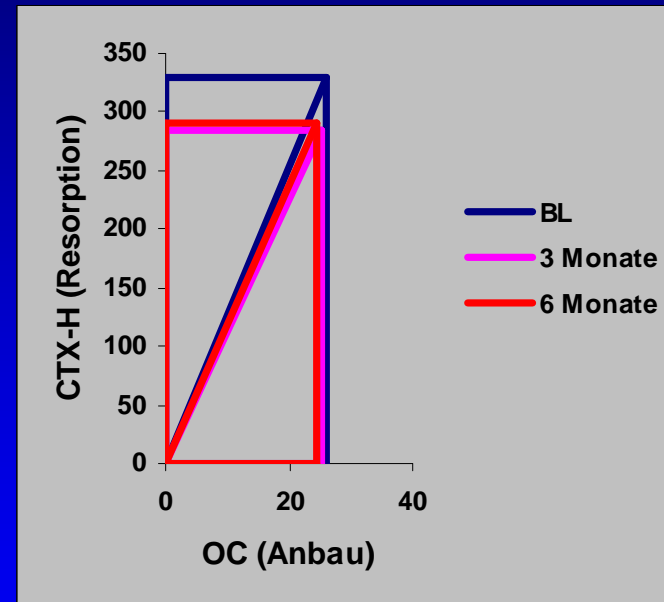


Patientenbeurteilung durch BMD vor/nach 2a HRT

HRT: Erfolg



HRT: Misserfolg



nach Delmas et al. Bone, 2000

Therapiekontrolle mit Knochenmarkern

Antiresorptive Therapie

Bisphosphonate

(Alendronat, Risendronat, Ibandronat, Pamidronat, Zolendronat)

SERMS (selektive Östrogenrezeptor Modulatoren)

(Raloxifen, Tamoxifen, Clomiphen)

Calcitonin (Nasalspray)

CTX
NTX
b-TRAP

Resorptionsmarker

Anabole Therapie

1- 34 PTH (Teripatid, intermittierend, täglich 1 Inj.)

Strontiumranelat (Protelos)

1,25 (OH)₂ VD (Calcitriol, Alphacalcidol, Rocaltrol)

PINP
BAP
OC

Anbaumarker

Immuntherapie

AK gegen RANKL (Denosumab hemmt Ostoblasten: Therapie von Knochenmetastasen des Mamma CA, Prostata CA)

AK gegen Sklerostin (AMG 785 fördert Osteoblasten: in klin. Testung)

AK gegen DKK (Tierexperimente)

CTX > PINP > BAP

PINP (entkoppelt von CTX)

ZUSAMMENFASSUNG

Aufgaben des Labors bei Diagnose und Therapie von Störungen des Knochenstoffwechsels:

Diagnose von Ursachen,
Therapiekontrolle



Basislabor, gezielte labordiagnostische Abklärung

Erkennung von Störungen der Netto-Bilanz
Klassifizierung high und low turn-over
Nachkontrolle der Therapie



Komponenten der Knochenmatrix / Sekretionsprodukte der Knochen auf- und abbauenden Zellen