

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Abteilung für Allgemeine Psychiatrie II  
Direktor Univ.-Prof. Dr. W. Gaebel

**Biochemische Marker des  
Knochenstoffwechsels bei Patienten mit  
Alzheimer-Demenz, Mild Cognitive Impairment  
und Osteoporose**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

Bijan Mahabadi

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Referent: Priv.-Doz. Dr. Luckhaus

Korreferent: Prof. Dr. Kieseier

„behind crystalline irises  
loons can dive  
where the world bleeds white”

(tori amos – carbon)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Luckhaus C, Mahabadi B, Grass-Kapanke B et al. (2009) Blood biomarkers of osteoporosis in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. J Neural Transm 116:905-911

## Zusammenfassung

Die aktuelle Studienlage weist auf eine erhöhte Komorbidität von Alzheimer-Demenz und Osteoporose hin. Es gibt Hinweise dafür, dass diese nicht nur im Rahmen fortgeschrittener Krankheitsstadien in Erscheinung tritt, sondern auch bereits in frühen Krankheitsstadien vorhanden ist. Um die Komorbidität der beiden Erkrankungen bereits im Rahmen subklinischer Stadien zu detektieren wurden biochemische Marker der Osteoporose bei Probanden mit leichtgradiger Alzheimer-Demenz oder Mild Cognitive Impairment im Vergleich zu Probanden mit primärer Osteoporose und gesunden Kontrollprobanden untersucht. Als möglicher krankheitsübergreifender, pathogenetisch relevanter Marker wurde Osteoprotegerin, ein Rezeptor von RANKL und TRAIL, untersucht.

Die Spiegel für c-terminale Kollagenfragmente (Cross Laps), welche auf Knochenabbau hindeuten, waren gleichermaßen bei Patienten mit Alzheimer-Demenz und Patienten mit Osteoporose erhöht. Osteocalcin als Marker für Knochenaufbau und Knochenremodeling war bei Probanden mit Alzheimer-Demenz signifikant erhöht, bei Probanden mit Osteoporose zeichnete sich ein Trend zu höheren Werten ab. Für Osteoprotegerin konnten keine signifikanten Unterschiede der Plasmaspiegel bei den einzelnen Gruppen gefunden werden. Die Plasmaspiegel für Vitamin D lagen in einem gleichwertig niedrig normalen Bereich, außer bei der Osteoporosegruppe.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei leichtgradiger Alzheimer-Demenz ein erhöhter Knochenkatabolismus mit begleitendem Knochenaufbau bzw. Knochenremodeling unabhängig vom Vitamin D-Status besteht; diese Befunde zeigen sich jedoch nicht bei Probanden mit MCI, das als Risiko- bzw. Vorstadium der Alzheimer-Demenz gilt. Die Befunde bestätigen bereits zuvor gefundene Ergebnisse klinischer und epidemiologischer Studien in Bezug auf eine erhöhte Komorbidität von Alzheimer-Demenz und Osteoporose in frühen Krankheitsstadien. Bezüglich des Osteoprotegerin konnten Erhöhungen der Plasmakonzentration bei Probanden mit Alzheimer-Demenz, wie in einzelnen früheren Studien beschrieben, im Rahmen unserer Studie nicht gefunden werden. Möglicherweise nur geringgradig vorhandene

Veränderungen der Osteoprotegerinkonzentration im Blut könnten erst in größeren Studienpopulationen gruppenstatistisch erfassbar werden oder bei Untersuchungen anderer Körperkompartimente (z.B. Liquor cerebrospinalis) eher zu Tage treten. Zudem besteht die Möglichkeit, dass andere Anteile des RANKL/TRAIL/Osteoprotegerin-Systems im Rahmen der Alzheimer-Demenz eher betroffen sind.

# Inhaltsverzeichnis:

<b>Verwendete Abkürzungen</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>9</b>
1.1 Alzheimer-Demenz und Osteoporose, Erkrankungen des fortgeschrittenen Lebensalters .....	10
1.2 Gemeinsamkeiten von Alzheimer-Demenz und Osteoporose .....	12
1.3 Ziel der Arbeit.....	18
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.1 Probandenauswahl .....	20
2.1.1 Ethikvotum.....	20
2.1.2 Probanden mit Demenz vom Alzheimer Typ .....	20
2.1.3 Probanden mit Mild Cognitive Impairment (MCI) .....	22
2.1.4 Osteoporosegruppe .....	22
2.1.5 Kontrollprobanden.....	24
2.2 Probengewinnung und Lagerung.....	25
2.3 Biochemische Testverfahren .....	25
2.3.1 Bestimmung von CrossLaps.....	26
2.3.2 Bestimmung von Osteocalcin.....	27
2.3.3 Bestimmung von Osteoprotegerin .....	28
2.3.4 Bestimmung von 25 (OH) Vitamin D.....	29
2.4 Auswertung der biochemischen Bestimmungen .....	30
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>32</b>
3.1 Ergebnisse für Cross Laps .....	33
3.2 Ergebnisse für Osteocalcin.....	35
3.3 Ergebnisse für Osteoprotegerin .....	36
3.4 Ergebnisse für 25 (OH) Vitamin D.....	38
3.5 Korrelationsberechnungen.....	39
3.5.1 Cross Laps .....	39
3.5.2 Osteocalcin.....	40

3.5.3. Osteoprotegerin.....	41
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>42</b>
<b>5. Danksagung .....</b>	<b>59</b>
<b>6. Literatur .....</b>	<b>60</b>

## Verwendete Abkürzungen

AD	Alzheimer-Demenz
BMD	bone mass density, Knochendichte
CDR	clinical dementia rating
CN	Kontrollgruppe
DSM-III-R	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, dritte Version (Revision)
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, vierte Version
DXA	dual x-ray absorptiometry
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
MCI	mild cognitive impairment
MMSE	mini mental state examination
mRNA	messenger ribonucleic acid
NINCDS-ADRDA	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
OP	Osteoporose
OPG	Osteoprotegerin
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RANK	receptor activator of nuclear factor kappa B
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
SD	Standardabweichung
SXA	single x-ray absorptiometry
TMT	trail making test
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
WHO	world health organization
WMS	wechsler memory scale

## 1. Einleitung

Sporadische Alzheimer-Demenz und Osteoporose sind häufig auftretende, chronisch degenerative Erkrankungen des fortgeschrittenen Lebensalters mit weitgehender Organbegrenzung. Obwohl sie in ihrer Pathogenese sehr verschieden sind und in unterschiedlichen Organsystemen (zentrales Nervensystem bzw. Knochen) auftreten, gibt es doch auch einige Hinweise auf Überschneidungen hinsichtlich Ätiologie und einzelner Pathogenesefaktoren.

Osteoporose tritt bei Frauen häufig postmenopausal durch den einsetzenden Östrogenmangel auf. Die Substitution mit Hormonpräparaten führt zu einer Verbesserung der Knochendichte und einer Senkung der Frakturnraten (Banks et al. (2004). Hinsichtlich des positiven Einflusses von postmenopausaler Hormonersatztherapie auf die kognitive Leistung bestehen hingegen gegensätzliche Befunde (vgl. Jacobs et al. 1998, Maki et al. 2000, Resnick et al. 1998, Barrett-Connor et al. 1993, Polo-Kantola et al. 1998, Binder et al. 2001). 2003 wurde mit der Women's Health Initiative Memory Study eine große prospektiv angelegte Studie veröffentlicht, die den Einfluss einer Östrogen-Gestagen-Kombination als Hormonersatztherapie auf die kognitive Leistung bei Frauen im Alter ab 65 Jahren untersuchte. Hierbei fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der kognitiven Leistung zwischen Probanden mit Hormonsubstitution gegenüber denjenigen ohne Substitution (Rapp et al. 2003).

Des Weiteren zeigt sich bei beiden Erkrankungen ein verstärktes Wirksamwerden von Zytokinen, wie z.B. Interleukin 6 und  $TNF\alpha$ , was in dem pathogenetischen Konzept des Inflamm-Aging Berücksichtigung fand (Franceschi et al. 2000). Hierbei wird von einer chronischen subklinischen Inflammation als gemeinsamer pathogenetischer Basis für chronisch degenerative Alterserkrankungen ausgegangen.

Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass pharmakologische Substanzen der Gruppe der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer neben ihrer Wirkung als Lipidsenker auch protektiv gegenüber Osteoporose und Alzheimer-Demenz wirken (pleiotrope Wirkungen) (Ohnaka et al. 2001, Waldmann et al. 2003, Ransmayr 2003.)

Aufgrund dieser Befunde erscheint es sinnvoll, die pathogenetischen Zusammenhänge zwischen sporadischer Alzheimer-Demenz und Osteoporose weiter zu untersuchen, um

die Frage nach einer erhöhten Komorbidität dieser beiden Erkrankungen und deren Ursachen eventuell klären zu können.

### **1.1 Alzheimer-Demenz und Osteoporose, Erkrankungen des fortgeschrittenen Lebensalters**

Die **Alzheimer-Demenz** ist eine neurodegenerative Erkrankung, die langsam fortschreitet und gemäß den neuropathologischen Befunden von Nagy, Hindley, Braak und Braak zunächst den entorhinalen Cortex und den Hippocampus, dann besonders temporale und parietale corticale Bereiche betrifft (Nagy et al. 1999). Es handelt sich hierbei mit ca. 60% um die häufigste Form der primären Demenzen. Mit fortschreitendem Alter steigt die Wahrscheinlichkeit an einer Demenz zu erkranken. Tabelle 1.1 zeigt die altersspezifische Prävalenz (in Prozent) der Alzheimer-Demenz nach Meta-Analysen.

	Männer	Frauen
65 – 69	0,6	0,7
70 – 74	1,5	2,3
75 – 79	1,8	4,3
80 – 84	6,3	8,4
80 – 84	6,3	8,4
90 und älter	17,6	23,6

**Tab. 1.1** Altersspezifische Prävalenz (in Prozent) der Alzheimer-Demenz (Lobo et al., 2000)

Im Rahmen der Erkrankung kommt es zu einer extrazellulären Ablagerung von schwer löslichem  $\beta$ -Amyloid ( $\beta$ -Amyloid-Plaques) sowie zu intrazellulärer Aggregation von Neurofibrillen, bedingt durch eine pathologische Phosphorylierung des Tau-Proteins (Tau-Fibrillen).

In der Mehrzahl der Fälle tritt die Erkrankung sporadisch auf, jedoch gibt es auch seltenere autosomal dominant erbliche Formen. Bei der sporadischen Form ist von polygenen genetischen Prädispositionen auszugehen, wobei ApoE  $\epsilon$ 4 das am konsistentesten replizierte Risikoallel ist (Potter et al. 2012).

Die pathologischen Veränderungen führen zu einer gestörten Neurotransmission, in

deren Zusammenhang insbesondere die Hypothese des cholinergen Defizits postuliert wurde (Coyle et al., 1983). Gestützt wird diese Hypothese durch zahlreiche experimentelle Befunde (Übersicht bei: Contestabile 2011), wie auch durch moderate Therapieeffekte ZNS-gängiger Acetylcholinesterasehemmstoffe in der Therapie der Alzheimer-Demenz.

Klinisch zeigt sich die Entwicklung multipler kognitiver Defizite mit schleichendem Beginn und stetiger, langsamer Progredienz. Im Vordergrund stehen vor allem Störungen des Gedächtnisses, der Orientierung, exekutiver Funktionen und der Sprache. Affektive Störungen können bereits in frühen Erkrankungsphasen auftreten und dann zu der wichtigen differentialdiagnostischen Abgrenzung primär affektiver Erkrankungen Anlass geben. Zudem können im Krankheitsverlauf der Alzheimer-Demenz auch weitere psychopathologische Symptome wie Angst, inhaltliche Denkstörungen, Agitiertheit oder Aggressivität hinzutreten (vgl. Supprian 2010).

Die **Osteoporose** ist die häufigste metabolische Knochenerkrankung, die mit einem Verlust von Knochendichte, -struktur und -funktion sowie einem erhöhten Frakturrisiko einhergeht. Die Diagnostik erfolgt mittels Knochendichtemessung anhand von der WHO festgelegten Richtwerten. Häufig bleibt die Erkrankung zunächst klinisch stumm und fällt erst durch pathologische Frakturen, meist Wirbelkörper-, Radius- oder Schenkelhalsfrakturen, auf.

Vor allem für Diagnostik und Therapie ist es wichtig, unterschiedliche pathogenetische Subtypen der Erkrankung zu differenzieren. Es bietet sich hierzu vor allem die Einteilung nach Ätiologie und Alter der Patienten an. Hinsichtlich des Alters unterscheidet man juvenile Formen von den postmenopausalen und senilen Formen. In Bezug auf die Ätiologie wird zwischen primären oder idiopathischen, also vor allem postmenopausalen und im Senium auftretenden, sowie den sekundären Osteoporoseformen unterschieden. Die sekundären Formen haben eine Vielzahl von definierten Ursachen, wie z.B. Störungen des endokrinen Systems, hämato-onkologische Grunderkrankungen, Malassimilationssyndrome, chronische Nierenerkrankungen oder Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis.

## 1.2 Gemeinsamkeiten von Alzheimer-Demenz und Osteoporose

Für beide Erkrankungen steigt die Wahrscheinlichkeit der Manifestation mit fortschreitendem Lebensalter. **Demographische Daten** zur Alzheimer-Demenz sind in Tabelle 1.1 dargestellt. Auch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer primären Osteoporose steigt mit zunehmendem Alter überproportional an. Tabelle 1.2 zeigt das geschlechtsspezifische 5-Jahres-Risiko für Hüftfrakturen.

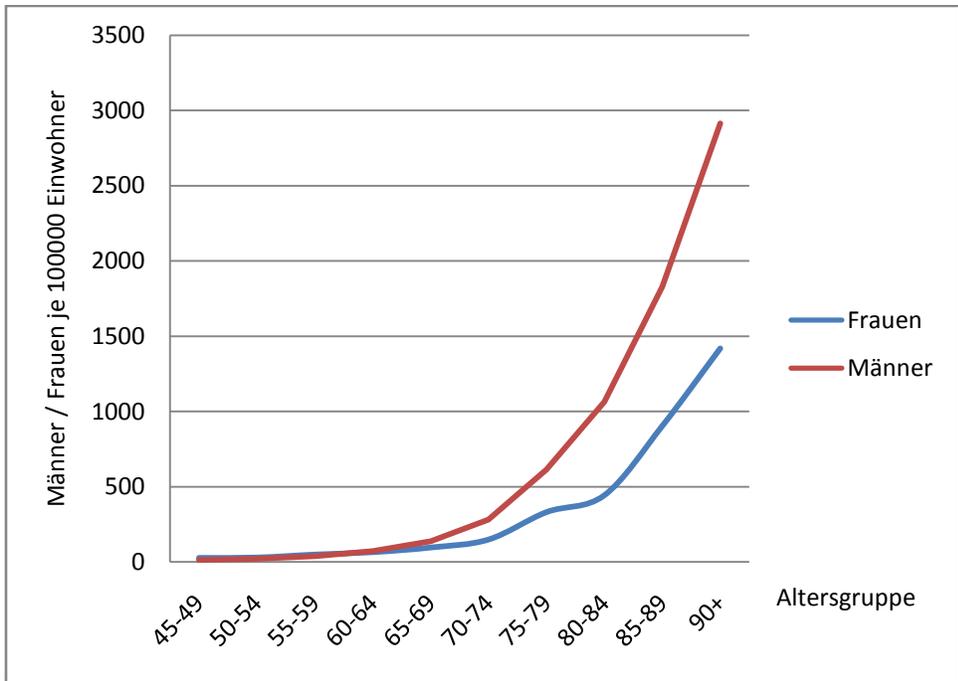
Die Zahl der Oberschenkelhalsfrakturen hängt jedoch nicht nur vom Vorhandensein einer Osteoporose ab. Hinzu kommt auch das im zunehmenden Alter gesteigerte Sturzrisiko.

Insgesamt zeigt sich bei beiden Erkrankungen ein Überwiegen der weiblichen Erkrankten. Gründe hierfür sind mitunter die Tatsache, dass Frauen ein höheres Lebensalter erreichen, aber auch Gründe, die in der Entwicklung des Hormonhaushaltes nach der Menopause liegen und im weiteren Verlauf noch weiter erläutert werden.

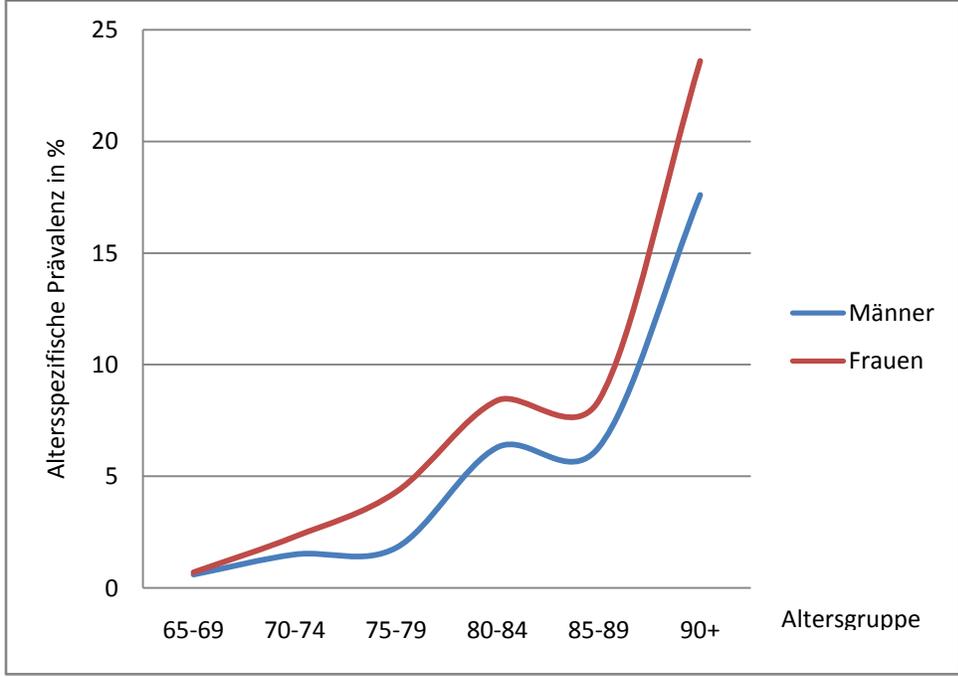
In den Diagrammen Abb. 1.1 sowie 1.2 wird nochmals das gehäufte Auftreten beider Erkrankungen mit zunehmendem Lebensalter grafisch dargestellt.

Altersgruppe	Männer (je 100000 Einwohner)		Frauen (je 100000 Einwohner)	
	Alte Bundesländer	Neue Bundesländer	Alte Bundesländer	Neue Bundesländer
45 bis 49	13,7	13,3	21,9	30,5
50 bis 54	27,5	15,4	26,9	30,1
55 bis 59	41,8	37,5	48,8	47,8
60 bis 64	77,8	67,2	64,2	58,1
65 bis 69	134,7	142,0	104,4	85,9
70 bis 74	291,6	271,7	159,7	136,7
75 bis 79	653,5	574,3	319,3	341,1
80 bis 84	1172,3	955,5	516,8	367,9
85 bis 89	2024,8	1635,3	1056,4	750,2
Ab 90	2820,5	3006,5	1387,3	1449,1

**Tab. 1.2** Geschätztes alters- und geschlechtsspezifisches 5-Jahres-Risiko für Hüftfrakturen für das Jahr 1996 (nach Wildner et al. 2001)



**Abb. 1.1** Alters- und geschlechtsspezifisches 5-Jahres-Risiko für Hüftfrakturen für das Jahr 1996 (nach Wildner et al. 2001)



**Abb. 1.2** Altersspezifische Prävalenz (in Prozent) der Alzheimer Demenz (nach Lobo et al. 2000)

**Genetische Faktoren** spielen bei beiden Erkrankungen eine ätiopathogenetische Rolle; so gibt es neben den häufigeren sporadischen bzw. idiopathischen Formen bei beiden Krankheitsbildern auch monogenetisch determinierte Formen mit früherem Manifestationsalter und eher rascher Progredienz.

Der sporadischen Alzheimer Demenz seien die familiären Formen gegenübergestellt: Es handelt sich bei letzteren um Erkrankungen mit autosomal dominantem Erbgang und zum Teil frühem Beginn. Die Mutationen der einzelnen Variationen liegen in den Genen Präsenilin 1 und 2 sowie im Amyloid-Precursor Protein. Unter den familiären Formen tritt am häufigsten die Mutation im Präsenilin 1-Gen zu Tage. Mit etwa 90% Anteil ist jedoch die sporadische Alzheimer Demenz die häufigste Form. Bei der sporadischen Form ist von einer polygenetischen Prädisposition auszugehen. Hier ist insbesondere das  $\epsilon 4$  Allel des Apolipoprotein E Gens hervorzuheben, welches als Risikofaktor für das Auftreten der sporadischen Alzheimer Demenz konsistent beschrieben wurde (Xin et al., 2010). Weitere replizierte Risikogene sind in Tab. 1.3 zusammengefasst.

SNP	Gen
Rs2075650	APOE
Rs11136000	CLU
Rs3851179	PICALM
Rs744373	BIN1
Rs597668	EXOC3L2
Rs11771145	EPHA1
Rs2043948	LTBP2
Rs2825544	PRSS7
Rs7527934	PRDM2
Rs4296166	AKAP6

**Tab. 1.3** Gentische Varianten, die mit sporadischer Alzheimer-Demenz assoziiert sind (Seshadri et al. 2010)

Auch bei der Osteoporose gibt es Formen mit frühem Krankheitsbeginn. Hier seien die idiopathische juvenile Osteoporose mit Beginn zwischen dem 8. und 14. Lebensjahr und die idiopathische Osteoporose junger Erwachsener mit Beginn zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr erwähnt. Bei beiden Erkrankungen kommt es insbesondere zu einem

Befall des Achsenskeletts mit Kompressionsfrakturen der Wirbelkörper. Differentialdiagnostisch müssen hier Osteogenesis imperfecta oder ein Cushing Syndrom ausgeschlossen werden.

Genetische Faktoren sind für die Entstehung der Osteoporose ebenso relevant. In diesem Zusammenhang wurde in der letzten Zeit das Vitamin D Rezeptor Gen (VDR Gen) Gegenstand intensiver Forschung. Varianten dieses Gens (rs731236, rs7975232) wurden mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer postmenopausalen Osteoporose assoziiert (Seremak-Mrozikiewicz et al., 2009). Li et al. fanden signifikante Assoziation von VDR-Varianten (rs1544410, rs7975232) und Knochendichte bei chinesischen postmenopausalen Frauen (Li et al. 2012). Yoldemir et. al beschrieben hingegen keine signifikanten Hinweise für einen Zusammenhang zwischen den VDR-SNPs und Knochendichte bei postmenopausalen türkischen Frauen (Yoldemir et al. 2011). Zudem treten osteoporotische Veränderungen auch im Rahmen bekannter genetisch determinierter Erkrankungen wie dem Turner- und Klinefeltersyndrom oder dem Ehlers-Danlos- und Marfansyndrom auf. Analog gibt es eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der Alzheimer-Demenz bei vorhandener Trisomie 21.

Das Interleukin-6-Gen scheint ein beiden Erkrankungen zu Grunde liegendes Risikogen zu sein. So fanden Czerny et al. (2010) eine Assoziation zwischen Polymorphismen des Interleukin-6-Gens und Knochendichte sowie Osteoporose bei postmenopausalen Frauen. In vielen Studien wurde der Zusammenhang des Auftretens der sporadischen Alzheimer-Demenz und Interleukin-6-Polymorphismen untersucht (Chen et al. 2012, Dai et al. 2012). Hier zeigte sich, dass bestimmte Polymorphismen mit einem verringerten Risiko an einer Alzheimer Demenz zu erkranken assoziiert sind. Für Polymorphismen des Interleukin-6-Rezeptors wurde jedoch ein erhöhtes Risiko zu erkranken beschrieben (Wang et al. 2010). Auch Östrogen-Rezeptor-Polymorphismen wurden in Bezug auf beide Erkrankungen untersucht und teilweise assoziiert gefunden (Currò et al. 2011, Durusu Tanriover et al. 2010, Boada et al. 2012, Goumidi et al. 2011). Gemeinsame Risikovarianten für die Demenz vom Alzheimer Typ und die Osteoporose konnten in diesem Zusammenhang bisher jedoch nicht sicher identifiziert werden.

Auch das **endokrine System** beeinflusst die Entstehung beider Erkrankungen. Es

konnte gezeigt werden, dass Östrogene einen potenten inhibitorischen Effekt auf die Knochenresorption haben. Postmenopausal kommt es bei relativem Östrogendefizit zu einer Erhöhung des Knochenumsatzes. Durch die Gabe selektiver Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) oder mittels Hormonersatztherapie lässt sich eine Normalisierung des Knochenumsatzes bei postmenopausalen Frauen auf prämenopausale Level erzielen (Ohnaka et al., 2009).

Bei Männern sind die Östrogenspiegel deutlich stärker mit der Knochendichte, dem Knochenumsatz und Knochenverlust assoziiert als die Androgenspiegel. Fallstudien über junge Männer mit Östrogenresistenz oder Aromatasemangel legen eine wichtige Funktion der Östrogene bei der Knochenentwicklung nahe (Vandenput et al. 2009). Bei älteren Männern sind die Serumspiegel von Östrogenen und Androgenen gegenläufig assoziiert mit dem Risiko von Knochenbrüchen. Es wird vermutet, dass ein Schwellenwert für Östrogen bei Männern besteht, unterhalb dessen es zu Schäden des Skeletts kommt. Das Risiko von Knochenverlust und Frakturen ist bei Männern mit Östrogenspiegeln unterhalb dieser Schwelle vermutlich erhöht. (Vandenput et al., 2009)

Auch hinsichtlich der Entstehung von Demenzerkrankungen werden Östrogenen protektive Effekte zugeschrieben (Behl, 2001). So konnte bei Frauen mit frühzeitiger Ovariectomie ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Alzheimer-Demenz gezeigt werden (Musicco et al. 2009). Auch die in Tabelle 1.1 aufgeführten Prävalenzdaten für die Alzheimer-Demenz weisen auf eine mögliche hormonelle Beeinflussung der Krankheitsentstehung hin, da Frauen insgesamt häufiger erkranken als Männer. In Interventionsstudien konnte bisher jedoch kein eindeutig protektiver Effekt durch eine postmenopausale Hormonersatztherapie bewiesen werden (Musicco, 2009). Hogervorst et al. untersuchten die Effekte von transdermaler Gabe von Diestradiol bei postmenopausalen Frauen mit bekannter Alzheimer-Demenz. Bei umfangreichen psychometrischen Testungen wurden signifikante Unterschiede zwischen Patientinnen mit vs. ohne Hormonsubstitution lediglich für den Word Recall Test gefunden. (Hogervorst et al. 2009) Der Nutzen der Hormonersatztherapie für die Gedächtnisleistung ist weiterhin Gegenstand vieler Studien. Zum einen werden protektive Effekte gegen Demenz durch physiologische Östrogene oder Hormonsubstitution untersucht, im Weiteren interessieren auch die Behandlungseffekte mit Hormonsubstitution bei bereits an Demenz erkrankten Patientinnen, sowie die

Effekte der Hormongabe bei gesunden Frauen (vgl. Ryan et al. 2008).

In mehreren Studien wurden **pleiotrope Effekte** der HMG-CoA-Reduktase Hemmstoffe bezüglich Alzheimer-Demenz und Osteoporose beschrieben. Bei diesen Stoffen, auch als Statine bezeichnet, handelt es sich um Pharmaka zur Behandlung von Hyperlipoproteinämien. Zusätzlich zur lipidsenkenden Wirkung besitzen die Statine antithrombotische (Mitsios et al. 2010) und antiinflammatorische Effekte (Bu et al. 2011), aber auch Effekte mit direkter Wirkung an neuronalen Zellen: Studien zeigen, dass Statine die Aktivität von NMDA-Rezeptoren an Neuronen senken und die Zellen vor exzitotoxischen Insulten schützen können. In höheren Dosen verhindern sie allerdings das Wachstum der Neuriten und induzieren sogar neuronale Apoptose (Bösel et al., 2006). Des Weiteren haben Statine einen direkten stimulierenden Einfluss auf die Produktion von Stickoxid (NO) und haben daher einen positiven Effekt bei endothelialen Dysfunktionen. (Davignon et al., 2001)

Statine haben zudem einen Osteoblasten-stimulierenden Effekt (Waldman et al., 2003); In Studien konnte eine geringere Frakturinzidenz unter Statintherapie gezeigt werden (Pedersen et al. 2000). Bei Inkubation humaner Osteoblasten mit Statinen zeigte sich eine erhöhte Expression von Osteocalcin und BMP-2 (bone morphogenetic Protein), was dem pathogenetischen Geschehen einer Osteoporose entgegenwirkt (Ohnaka et al., 2001).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass unter Therapie mit Statinen das Risiko an Alzheimer-Demenz zu erkranken vermindert ist. In diesem Zusammenhang konnte in experimentellen Modellen gezeigt werden, dass Statine die Produktion von A $\beta$  vermindern, in dem sie die Funktion der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Secretase hemmen und Neuroinflammation reduzieren (Pac-Soo et al. 2011). Statine überqueren zu einem geringen Anteil die Blut-Hirn-Schranke und nehmen Einfluss auf den Cholesterinstoffwechsel des Gehirns. Des Weiteren scheint durch Statine die Konzentration des Tau-Proteins im Liquor gesenkt werden zu können (Riekse et al. 2006).

Eine Vielzahl von Studien beschreibt protektive **Auswirkungen von körperlicher Aktivität und Ernährung** auf die Entstehung und den Krankheitsverlauf von Alzheimer-Demenz und Osteoporose.

Eine Studie mit 2148 gesunden, über 65 Jahre alten Probanden, von denen 253 im Verlauf der Studie an Alzheimer-Demenz erkrankten, untersuchte den Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Demenz und Nahrungsmittelkombinationen. Es zeigte sich, dass der Genuss von Salatsoße, Nüssen, Fisch, Tomaten, Geflügel, Kreuzblütlern, Gemüse, Obst, dunkel- und grünblättrigem Gemüse und eine verminderte Aufnahme von stark fetthaltigen Milchprodukten, rotem Fleisch, Innereien und Butter stark mit einem niedrigeren Risiko an einer Alzheimer-Demenz zu erkranken assoziiert ist (Gu et al., 2010). Auch konnte gezeigt werden, dass mediterrane Ernährung mit einem deutlich geringeren Alzheimer-Demenz-Risiko einhergeht (Sofi et al., 2010).

Der Einfluss von Ernährung auf den Knochenstoffwechsel ist schon mit Bezug auf den Calcium- und Vitamin D-Haushalt offensichtlich. Es konnte gezeigt werden, dass sich der adäquate Konsum von Fleisch, Fisch, Obst und Gemüse sowie vor allem fettarmen Milchprodukten positiv auf die Knochengesundheit auswirkt (Peters et al., 2010).

Nichol et al. (2007) konnten im Tierversuch zeigen, dass körperliches Training die Entwicklung kognitiver Defizite bei transgenen Mausmodellen der Alzheimer Demenz reduzieren kann.

In mehreren Reviews wurde der positive Effekt von körperlicher Aktivität auf die Knochendichte bzw. das Auftreten einer Osteoporose herausgestellt (Pigozzi et al., 2009, Iwamoto et al., 2010)

### **1.3 Ziel der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit liegt in der Untersuchung zweier Fragestellungen. Zum einen soll untersucht werden, ob die Quantifizierung biochemischer Marker des Knochenstoffwechsels, Cross Laps als Marker des Knochenkatabolismus sowie Osteocalcin als Knochenaufbau- bzw. Knochenumbau-marker, bei Patienten mit Demenz vom Alzheimer Typ oder Probanden mit Mild Cognitive Impairment im Vergleich zu kognitiv gesunden Kontrollen und Patienten mit primärer Osteoporose auf eine erhöhte Komorbidität der Alzheimer-Demenz und Osteoporose hindeutet. Zudem soll der Hypothese nachgegangen werden, die besagt, dass gemeinsame molekulare Pathogenesefaktoren der erhöhten Komorbidität beider Erkrankungen zugrunde liegen könnten. Dazu erfolgen Plasmaspiegelbestimmungen von Osteoprotegerin, da es sich

hierbei um einen peripher bestimmbaren Marker handelt , der über seine molekularen Wechselwirkungen mit RANKL und TRAIL mit der Pathogenese beider Erkrankungen in Zusammenhang stehen könnte. Osteoprotegerin ist ein parakrines Glykoprotein, das nicht nur von Osteblasten gebildet wird, sondern auch von Bindegewebszellen und dendritischen Zellen. Zusätzlich findet es sich auch im Liquor cerebrospinalis (Hofbauer et al., 2004). Im Hinblick auf neuronale Gewebe wurde Osteoprotegerin bereits in malignen Gliomen (Naumann et al., 2004) und im Rückenmark (Hofbauer et al., 2004), in menschlichem cerebralem Gewebe sowie dem von fetalen Mäusen (Simonet et al., 1997) nachgewiesen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Probandenauswahl**

Für die Durchführung der Bestimmung der Marker des Knochenstoffwechsels wurden folgende vier Probandengruppen gebildet, die nach festgelegten Einschlusskriterien ausgewählt wurden: Eine Gruppe setzte sich aus Probanden mit einer gesicherten leichten bis mittelschweren Demenz vom Alzheimer Typ zusammen, die zweite aus Probanden mit der Diagnose Mild Cognitive Impairment. Für die Patienten aus diesen beiden ersten Gruppen waren jedoch eine manifeste Osteoporose oder relevante Risikofaktoren (gemäß Fragebogenerhebung, Abb. 2.1) Ausschlusskriterien. Die dritte Gruppe umfasste Patienten, die an einer manifesten primären Osteoporose litten, aber keine kognitiven Beeinträchtigungen aufwiesen und nicht an anderen relevanten Erkrankungen, wie z.B. schweren Stoffwechselerkrankungen oder chronischer Niereninsuffizienz, litten. Die letzte Gruppe bildeten gesunde, altersgemachte Probanden, die an keiner der beiden Erkrankungen (Demenz bzw. Osteoporose) litten.

#### **2.1.1 Ethikvotum**

Der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf war unter der Studiennummer 2729 ein Studienprotokoll vorgelegt worden. Mit dem Schreiben vom 25. April 2006 war der Durchführung der Studie zugestimmt worden, ethische oder rechtliche Bedenken gegen die Durchführung bestanden nicht. Die Probanden wurden über den Inhalt der Studie aufgeklärt, die Einwilligung zur Teilnahme wurde mit einem entsprechenden Einwilligungsformular schriftlich fixiert.

#### **2.1.2 Probanden mit Demenz vom Alzheimer Typ**

Die Probanden mit Alzheimer-Demenz wurden in der Gedächtnissprechstunde des LVR-Klinikum Düsseldorf ausgewählt. Dort wurden eine psychiatrische, internistische und neurologische Anamnese erhoben, eine körperliche Untersuchung sowie eine ausführliche Labortestung und Bildgebung in Form eines Schädel -CTs oder -MRTs

durchgeführt. Die ausführliche psychometrische Testung bestand aus dem Test zur Früherkennung von Demenzen und Depressionsabgrenzung (TFDD) (Ihl et al., 2000) sowie aus der CERAD-NP Testbatterie (Thalman et al., 1998) einschließlich der Mini-Mental-Status-Examination (MMSE) (Folstein et al., 1975), dem Clock Drawing Test (CDT) (Shulman et al., 2000), sowie der Wechsler Memory Scale (WMS) (WMS-R-LM Härting et al. 2000) und dem Trail Making Test A und B (TMT-A und -B) (Reitan, 1979). Die Diagnosen wurden in Zusammenarbeit eines Psychiaters, eines Psychologen und eines Radiologen gestellt. Hierbei wurden für die Diagnose Mild Cognitive Impairment die diagnostischen Kriterien nach Petersen (Petersen et al. 1999) und für die Diagnose Alzheimer-Demenz die NINCDS-ADRDA-Kriterien (McKhann et al., 1984) für wahrscheinliche Alzheimer-Demenz zu Grunde gelegt (siehe Tab. 2.1 und 2.2).

Berichte über Gedächtnisstörungen, bevorzugt von unabhängigen Informanten
Objektive Gedächtnisbeeinträchtigung
Normale allgemeine kognitive Funktion
Normale Alltagskompetenz
Keine Demenz

**Tab. 2.1** Kriterien für Mild Cognitive Impairment (Petersen et al., 1999)

Syndromdefinition	Demenz
Verlauf	Fortschreitende Verschlechterung von Gedächtnis und anderen kognitiven Funktionen
Klinisches Bild	Defizite in mindestens 2 kognitiven Funktionen
Ausschlussbedingung	Keine systemischen oder zerebralen Krankheiten, die als Ursache der fortschreitenden Defizite des Gedächtnisses und anderer kognitiver Funktionen in Frage kommen
Stützende Merkmale	Fortschreitende Störung von Sprache, Praxie, Gnosie, Beeinträchtigung von Alltagsfunktionen, Verhaltensänderungen, Sekundärfälle in der Familie, normaler Liquor, normales oder unspezifisch verändertes EEG, Atrophie im CT mit Zunahme bei Wiederholter Untersuchung
Mit der Diagnose vereinbare Merkmale	Plateaus im Fortschreiten der Krankheit, affektive und psychotische Symptome, erhöhter Muskeltonus, Myoklonus und Gangstörung, im fortgeschrittenen Stadium normales CT
Der Diagnose widersprechende Merkmale	Plötzlicher, apoplektischer Beginn, fokale neurologische Befunde, Krampfanfälle oder Gangstörung früh im Krankheitsverlauf
Alter	Beginn zwischen dem 40. und 90. Lebensjahr

**Tab. 2.2** NINCDS-ADRDA Kriterien für wahrscheinliche AD (McKhann et al., 1984)

Zusätzlich füllten die Patienten einen anhand von bekannten Risikofaktoren für Osteoporose entwickelten Fragebogen aus, um ein erhöhtes Osteoporoserisiko zu erfassen. Die Probanden der Alzheimer-Demenzgruppe hatten wenig bis gar keine Faktoren, die für das Risiko einer Osteoporose sprechen. Absolute Ausschlusskriterien waren hierbei das Vorliegen einer klinisch manifesten Osteoporose, eine Langzeittherapie mit Kortikosteroiden und ein ausgeprägter Bewegungsmangel (Wegstrecke pro Tag unter 500m oder kein tägliches Verlassen der Wohnung) (vgl. Abb. 2.1).

### **2.1.3 Probanden mit Mild Cognitive Impairment (MCI)**

Die Probanden dieser Gruppe unterzogen sich den gleichen Untersuchungen wie in Punkt 2.1.1 geschildert.

### **2.1.4 Osteoporosegruppe**

Die Probanden mit klinisch manifester primärer Osteoporose wurden in der Endokrinologischen Ambulanz der Medizinisch-Neurologisch-Radiologischen Klinik (MNR-Klinik) der Universität Düsseldorf ausgewählt. Die Sicherung der Diagnose Osteoporose erfolgte durch eine DXA Messung, die von der WHO als Standardmethode zur Diagnose einer Osteoporose empfohlen wird. Hierbei wurden insgesamt drei Anteile des Skelettsystems einer Messung unterzogen: Die Lendenwirbelsäule (Lendenwirbelkörper 1-4) sowie die Bereiche des rechten und linken Schenkelhalses (collum femoris). Die Messung ergab jeweils den absoluten Wert der Knochendichte sowie den Vergleichswert zur Norm (junge Erwachsene), den sogenannten T-Score, und einen Vergleichswert zum Durchschnitt der Altersgruppe, den sogenannten Z-Score. Insgesamt wurden nur Patienten im Alter über 60 Jahre ausgewählt, um zu große Altersunterschiede zwischen den verschiedenen Probandengruppen zu vermeiden. Die untersuchten Personen wurden nur in die Studie mit eingeschlossen, wenn in mindestens einem Bereich ein T-Wert von  $< -2,5$  und ein Z-Wert von  $< -1$  vorlagen. Dies entspricht den WHO-Kriterien einer Osteoporose (Leib et al., 2004) und zeigt verminderte Knochendichtewerte im Vergleich zur Altersvergleichsgruppe an.

<b>1. Allgemeines:</b>	
Ist bei Ihnen Osteoporose (Knochenschwund) bekannt?	ja / nein
Sind in Ihrer Familie Osteoporose-Erkrankungen bekannt?	ja / nein
Wenn ja, bei wem?	
Zahl und Art der Knochenbrüche in den letzten 5 Jahren:	
<b>2. Medikamenteneinnahme</b>	
Nehmen Sie:	<input type="checkbox"/> Östrogen <input type="checkbox"/> Kortison <input type="checkbox"/> Andere Hormonpräparate <input type="checkbox"/> $\beta$ -Blocker <input type="checkbox"/> Lipidsenker <input type="checkbox"/> Vitamin D / Kalzium <input type="checkbox"/> Blutverdünnende Medikamente (z.B. Marcumar) <input type="checkbox"/> Antiepileptika (z.B. Carbamazepin) <input type="checkbox"/> Psychopharmaka
<b>3. Körperliche Bewegung</b>	
Besteht bei Ihnen eine Geh-Einschränkung?	ja / nein
Verlassen Sie täglich ihre Wohnung?	ja / nein
Wie weit laufen Sie ca. pro Tag?	<input type="checkbox"/> <500m <input type="checkbox"/> 500 – 1000m <input type="checkbox"/> 1000 – 4000m <input type="checkbox"/> > 4000m
Waren Sie in Ihrer Kindheit jemals auf Grund einer Fraktur lange Zeit bettlägerig?	ja / nein
Waren Sie jemals auf Grund anderer Erkrankungen lange Zeit bettlägerig?	ja / nein
Welche Sportarten betreiben Sie regelmäßig?	
Wie oft pro Woche treiben Sie Sport?	
Wie groß und wie schwer sind Sie ungefähr?	
<b>4. Nur bei Frauen</b>	
Hatten Sie die erste Menstruation nach dem 15. Lebensjahr?	ja / nein
Hatten Sie die letzte Menstruation vor dem 45. Lebensjahr?	ja / nein
Wurden Ihnen die Eierstöcke operativ entfernt?	ja / nein
Wie viele Kinder haben Sie?	
Haben Sie gestillt?	ja / nein
Sind Sie an Brustkrebs erkrankt?	ja / nein
<b>5. Nur bei Männern</b>	
Ist bei Ihnen ein niedriger Testosteronspiegel bekannt?	ja / nein
Ist bei Ihnen eine Unterfunktion der Hoden bekannt?	ja / nein
Sind Sie an Prostatakrebs erkrankt?	ja / nein
<b>6. Ernährung</b>	
Essen Sie regelmäßig Milch, Käse und andere Milchprodukte?	ja / nein
Haben Sie eine Milchzucker-Unverträglichkeit?	ja / nein
Essen Sie regelmäßig frisches Gemüse?	ja / nein
<b>7. Genussmittel</b>	
Sind Sie Raucher?	ja / nein
Wenn ja, wie viel rauchen Sie?	
Haben Sie jemals geraucht?	ja / nein
Wenn ja, wie lange?	
Trinken Sie Alkohol?	ja / nein
Wenn ja wie viel, wie oft?	
<b>8. Sonstige Erkrankungen</b>	
Haben oder hatten Sie jemals	<input type="checkbox"/> Asthma bronchiale <input type="checkbox"/> eine rheumatische Erkrankung <input type="checkbox"/> entzündliche Darmerkrankungen (z.B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) <input type="checkbox"/> eine Magen- oder Darmoperation <input type="checkbox"/> eine Depression <input type="checkbox"/> eine Überfunktion der Schilddrüse <input type="checkbox"/> eine Nieren- oder Lebererkrankung

**Abb. 2.1** Fragebogen zur Erfassung des Osteoporoserisikos

Zum Ausschluss kognitiver Defizite wurden mit allen Osteoporosepatienten zwei Demenz-Screening-Tests durchgeführt. Hierbei handelte es sich um die Mini Mental State Examination (MMSE) in der CERAD Version und den Test zur Früherkennung von Demenzen und Depressionsabgrenzung (TFDD). Probanden mit Testergebnissen unter 28 Punkten im MMSE und/oder unter 40 Punkten im TFDD wurden wegen messbarer kognitiver Beeinträchtigungen von der Studie ausgeschlossen. Zusätzlich wurden soziobiographische und anamnestische Daten zu den Patienten erfasst, hierzu zählen Angaben über Alter, Schul- und Berufsausbildung, Dauer von Arbeitsverhältnissen, Familienstand, Kinder, Krankheitsanamnese und Medikamentenanamnese. Nach Studienaufklärung und Einwilligung der Probanden erfolgte dann direkt vor Ort die Blutentnahme.

### 2.1.5 Kontrollprobanden

Diese Probanden wurden in gleicher Weise untersucht wie in 2.1.1 beschrieben, jedoch waren messbare kognitive Störungen oder ein Anhalt für eine demenzielle Erkrankung bei dieser Gruppe ein Ausschlusskriterium. Die Probanden wurden ebenfalls gebeten den oben erwähnten Fragebogen zu den Osteoporose-Risikofaktoren auszufüllen, um auch diese von der oben beschriebenen dritten Gruppe abgrenzen zu können.

Die Tabelle 2.3 fasst nochmals die in den einzelnen genannten Gruppen durchgeführte Diagnostik zusammen.

	CN	MCI	AD	OP
Labor	obligat	obligat	obligat	fakultativ
Bildgebung	cCT/cMRT	cCT/cMRT	cCT/cMRT	-
EEG	obligat	obligat	obligat	-
Testpsychologie	TFDD, CERAD-NP	TFDD, CERAD-NP	TFDD, CERAD-NP	TFDD, MMSE
Knochendichte	-	-	-	Obligat
Fragebogen OP	obligat	obligat	obligat	-

**Tab 2.3** Innerhalb der einzelnen Probandengruppen durchgeführte Diagnostik.

## **2.2 Probengewinnung und Lagerung**

Zur Gewinnung der Blutproben wurde eine Venenpunktion durchgeführt. Bei den Probanden der Alzheimer-Demenz-, MCI- und Gesundengruppe fand diese im Rahmen der Routinediagnostik im LVR-Klinikum Düsseldorf statt. Die Blutproben der Osteoporose-Probanden wurden im Anschluss an die kognitive Testung in der Endokrinologischen Ambulanz der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie der Universität gewonnen. Die Probenentnahmen erfolgte im Zeitraum zwischen 9:00 und 11:00 Uhr, die Patienten waren dabei nicht nüchtern. Die Blutentnahme nicht nüchtern durchzuführen ergab sich aus Gründen der Praktikabilität für das Setting einer Ambulanz mit Patienten fortgeschrittenen Lebensalters.

Für die Venenpunktion wurden handelsübliche Blutabnahmesysteme mit Monovetten oder Vacutainern (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) verwendet. Hierbei wurden zur Gewinnung von Plasma EDTA beschichtete Röhrchen und zur Gewinnung von Serum Röhrchen ohne gerinnungshemmenden Zusatz bzw. geeignete Trenngelröhrchen verwendet.

Die Blutproben wurden bei 3000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, um korpuskuläre Anteile und Serum bzw. Plasma zu trennen.

Das Plasma bzw. Serum wurde mit Pasteur- oder Eppendorffpipetten in 250µl-Portionen bei -80°C eingefroren und gelagert.

Für die im Folgenden beschriebenen Testverfahren wurden ausschließlich Plasmaproben verwendet.

## **2.3 Biochemische Testverfahren**

Für die Bestimmung der Knochenstoffwechselfparameter CTX (CrossLaps, c-terminale Fragmente von Kollagen I), Osteocalcin und Osteoprotegerin sowie 25-(OH)-Vitamin-D wurden kommerzielle ELISA-Test-Kits verwendet. Den Test-Kits waren jeweils 6 Lösungen mit Standardkonzentrationen des zu messenden Parameters, bzw. lyophilisierte Stoffe zur Herstellung eben dieser, beigelegt, um eine Standardkurve zur Bestimmung der Konzentrationen in den Plasmaproben errechnen zu können. Die Tabelle 2.4 bietet einen Überblick über die gemessenen Marker.

Marker	Einheit
CrossLaps	ng/ml
Osteocalcin	ng/ml
Osteoprotegerin	pmol/l
25 (OH) Vitamin D	nmol/l

**Tab. 2.4** Die bestimmten biochemischen Marker des Knochenstoffwechsels

### 2.3.1 Bestimmung von CrossLaps

Serum CrossLaps Elisa von Nordic Bioscience Diagnostics, Dänemark. In diesem Assay können Cross Laps Konzentrationen ab 0,02 ng/ml detektiert werden. Der durchschnittliche Wert für postmenopausale Frauen liegt nach Herstellerangaben bei 0,439 ng/ml. Für Männer liegt der durchschnittliche Wert bei 0,294 ng/ml.

Der Serum CrossLaps Elisa basiert auf der Verwendung von zwei hochspezifischen monoklonalen Antikörpern, die mit den zu messenden Proben vermischt und dadurch an diese gebunden werden. Angriffspunkt des Fängerantikörpers ist ein Aspartatrest in der Aminosäuresequenz des Kollagenfragments.

Die notwendigen Standards und Kontrollen waren bereits gebrauchsfertig im Kit enthalten. Es wurden jeweils 50 µl der Standardproben A-F, sowie der Kontrollproben CO1 und CO2 bzw. der Plasmaproben der ausgewählten Patienten auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht. Es wurde des Weiteren eine Antikörperlösung vorbereitet, die aus einem biotinylierten Antikörper in gepufferter Lösung mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmitteln sowie einem Peroxidase-konjugierten Antikörper in gleicher Lösung und einem Inkubationspuffer im Verhältnis 1+1+100 gemischt wurde. Je 150 µl der Antikörperlösung wurden in die einzelnen

Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde nun mit einem Klebestreifen bedeckt und bei 18-22°C auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler bei 300 rpm für 120 Minuten inkubiert.

Anschließend wurde die Platte mit dem beigefügten Waschpuffer (Puffer mit Detergentien und Konservierungsmitteln im Verhältnis 1+50 mit Aqua destillata gemischt) 5 mal gewaschen. Dann wurde jedem Well eine Menge von 100 µl Substratlösung, bestehend aus Tetramethylbenzidin- Substrat in einem sauren Puffer

hinzugefügt. Die Platte wurde erneut bei 300 rpm auf dem Mikrotiterplatten-Schüttler für 15 Minuten inkubiert. Die Platte musste in dieser Zeit vor Licht geschützt werden!

Danach wurden in jedes Well 100 µl der gebrauchsfertigen Stopplösung, bestehend aus 0,18 mol/l Schwefelsäure pipettiert. Es zeigte sich eine gelbe Farbreaktion.

Die Absorption wurde direkt im Anschluss im Bereich von 450 nm mit 630 nm als Referenz in einem Photometer gemessen.

### **2.3.2 Bestimmung von Osteocalcin**

N-MID Osteocalcin Elisa von Nordic Bioscience Diagnostics, Dänemark. In diesem Assay können Osteocalcin Konzentrationen ab 0,5 ng/ml detektiert werden. Der durchschnittliche Wert für EDTA-Plasma von gesunden Probanden liegt nach Herstellerangaben bei postmenopausalen Frauen bei 28,4 ng/ml und bei Männern bei 21,4 ng/ml.

Im N-MID Osteocalcin Elisa kommen zwei spezifische monoklonale Antikörper zur Anwendung. Der erste dient als Molekülfänger-Antikörper und bindet das Osteocalcin in der mittleren Region des Moleküls. Der zweite Antikörper ist mit einer Peroxidase konjugiert und bindet an die N-terminale Region des Osteocalcins.

Zu Beginn wurden die verschiedenen nötigen Lösungen der Versuchsanleitung entsprechend vorbereitet. Die Kontrollproben (CO1 und CO2), bestehend aus lyophilisiertem, synthetischem, humanem Osteocalcin in PBS-gepufferter Lösung mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmitteln, wurden in 0,5 ml Aqua destillata aufgelöst. Die Standardprobe A (Osteocalcinkonzentration 0 ng/dl), bestehend aus lyophilisierter PBS-gepufferter Lösung mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmitteln, wurde in 5,0 ml Aqua destillata aufgelöst. Die Standardproben B bis F (Osteocalcinkonzentration B = 4,2 ng/dl, C = 7,6 ng/dl, D = 19,4 ng/dl, E = 35,4 ng/dl, F = 56,1 ng/dl) wurden in je 0,5 ml Aqua destillata aufgelöst. Die nicht verwendeten Kontroll- und Standardlösungen wurden portioniert und bei -80°C eingefroren.

Zu Beginn der Messreihe wurden der Peroxidase-konjugierte Antikörper (monoklonaler Mausantikörper in gepufferter Lösung mit Proteinstabilisatoren, Detergentien und Konservierungsmitteln) und der biotinylierte Fängerantikörper (monoklonaler

Mausantikörper in gepufferter Lösung mit Proteinstabilisatoren, Detergentien und Konservierungsmitteln) mit je 10 ml einer Konjugatverdünnungslösung (PBS-gepufferte Lösung mit Proteinstabilisatoren, Detergentien und Konservierungsmitteln) vermischt. Die benötigte Menge Antikörperlösung wurde im Verhältnis 1:1 gemischt.

Auf die streptavidinbeschichtete Mikrotiterplatte wurden pro Well jeweils 20 µl Kontrolllösung (CO1 und CO2), Standardlösung (A-F) bzw. Plasmaprobe der ausgewählten Patienten gegeben. Zusätzlich wurden in jedes Well 150 µl der gemischten Antikörperlösung pipettiert. Die Wellplatte wurde mit einem Klebestreifen bedeckt und inkubierte ohne Schütteln für 120 min bei Raumtemperatur.

Danach wurde die Wellplatte 5 mal mit dem beigefügten Waschpuffer (konzentrierter Waschpuffer mit Detergentien und Konzentrationsmittel im Verhältnis 1 + 50 in Aqua destillata verdünnt) gewaschen.

Als nächstes wurden 100 µl der beigefügten Substratlösung (Tetramethylbenzidin in einem sauren Puffer) in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde wieder mit einem Klebestreifen verschlossen und inkubierte für 15 min im Dunkeln ohne Schütteln. Im Anschluss wurden 100 µl der beigefügten Stopplösung (0,18 mol/l Schwefelsäure) in jedes Well pipettiert. Es zeigte sich eine gelbe Farbreaktion.

Die Absorption wurde direkt im Anschluss im Wellenlängenbereich von 450 nm mit 630 nm als Referenz in einem Photometer gemessen.

### **2.3.3 Bestimmung von Osteoprotegerin**

Metra OPG EIA Kit von BioVendor Laboratory Medicine, Inc., Czeck Republic für Quidel Corporation. In diesem Assay können Osteoprotegerin-Konzentrationen ab 0,13 pmol/l detektiert werden. Der durchschnittliche Wert für EDTA-Plasma von gesunden Probanden liegt nach Herstellerangaben bei 8,12 pmol/l.

Auch bei diesem ELISA werden zwei Antikörper verwendet: Ein spezifischer Antikörper, der gegen humanes Osteoprotegerin gerichtet ist und ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat, das die Reaktion mit dem hinzugefügten Substrat katalysiert.

Zunächst wurde der mitgelieferte Standard (lyophilisiertes humanes Osteoprotegerin) in 0,75 ml Puffer gelöst. Die fertige Lösung enthielt humanes Osteoprotegerin in einer Konzentration von 60 pmol/l. Diese Lösung wurde dann nach einem vorgegebenen

Schema verdünnt, um definierte Standardlösungen mit verschiedenen Konzentrationen zu erhalten. Die nicht verwendete Standardlösung wurde bei - 80°C tiefgefroren.

Auf die mitgelieferte Mikrotiterplatte wurden pro Well 100 µl der angefertigten Standardlösungen sowie der fertigen Kontrolllösungen (high und low) und der zu messenden Proben gegeben. Die Platte wurde mit einem Klebestreifen bedeckt und auf einem Schüttler (300 rpm) für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Platte 3 mal mit dem gebrauchsfertigen Waschpuffer gewaschen und jedes Well wurde mit 100 µl der fertigen Antikörperlösung (biotinylierter Antikörper gegen humanes Osteoprotegerin) versehen. Erneut wurde die Platte für eine Stunde auf dem Mikrotiterplattenschüttler bei 300 rpm inkubiert und im Anschluss 3 mal gewaschen. Im nächsten Schritt wurde je 100 µl Streptavidin-Peroxidase-Konjugatlösung hinzugefügt und für weitere 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde mit einer Substratlösung im Dunkeln für 10 Minuten inkubiert und letztlich mit je 100 µl Stopplösung die Reaktion beendet.

Innerhalb von 5 Minuten wurde die Absorption in einem Referenzbereich von 450 nm und 630 nm gemessen.

#### **2.3.4 Bestimmung von 25 (OH) Vitamin D**

25-OH-Vitamin D direct ELISA Kit von Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D-64625 Bensheim. Der Test detektiert Vitamin D-Konzentrationen ab 2,0 nmol/l, er basiert auf einer kompetitiven ELISA-Technik, bei der ein ausgewählter monoklonaler Antikörper, der 25-OH-Vitamin D erkennt, verwendet wird.

Alle Kontrollproben und Reagenzien wurden den Anleitungen des ELISA entsprechend angesetzt und vorschriftsgemäß gelagert. Bei der Durchführung wurden jeweils 30 µl der Kontroll- und Kalibrierlösungen sowie der entsprechenden Proben in eine Mikrotiterplatte gegeben, hinzu kamen jeweils 300 µl eines Freisetzungsreagenz. Nun wurde die Platte für eine Stunde im 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 600 µl Probenverdünnungspuffer sowie anschließend die Zugabe von je 150 µl der entsprechenden Antikörperlösung. Die Platte wurde nun über Nacht (min. 18 – max. 22 Stunden) im Dunkeln inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Platte fünfmal mit dem mitgelieferten Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden je 200 µl Konjugatlösung hinzugefügt. Es erfolgte das

erneute Inkubieren bei Raumtemperatur für eine Stunde. Nach einem erneuten Waschzyklus wurden je 200 µl Substratlösung hinzugefügt. Eine weitere Inkubationszeit von 20 Minuten wurde abgewartet, danach wurden je 50 µl Stopplösung in die Wells pipettiert. Zuletzt wurde die Absorption im Referenzbereich von 405nm und 690 nm gemessen.

## **2.4 Auswertung der biochemischen Bestimmungen**

Die Auswertung der gemessenen Extinktionswerte wurde wie folgt vorgenommen: Die vorgegebenen Konzentrationen der Standardlösungen und die dazugehörigen gemessenen Extinktionen wurden zur Ermittlung einer Regressionsgeraden (Ausgleichsgerade durch eine Punktwolke) verwendet. Der Verlauf der Geraden wurde durch die als  $y = m * x + b$  bezeichnete Geradengleichung für lineare Funktionen berechnet. Die Werte für  $y$  entsprechen den gemessenen Extinktionen aufgetragen auf der Ordinate, die Werte für  $x$  entsprechen den vorgegebenen Konzentrationen der Standardlösungen aufgetragen auf der Abszisse. Der Wert für  $m$  ist die Steigung der Gerade und  $b$  bezeichnet den Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse.

Durch Einsetzen der Mittelwerte der gemessenen Extinktionen und der gegebenen Konzentrationen der Standardlösungen für  $y$  und  $x$ , sowie der gemessenen Extinktion für die Probe mit der Konzentration von 0 für  $b$ , konnte die Steigung der Standardkurve berechnet werden.

Danach konnten alle beliebigen gemessenen Extinktionswerte für  $y$  eingesetzt werden, um die entsprechenden Markerkonzentrationen in den Plasmaproben zu berechnen.

Zum Vergleich der biochemischen Daten der einzelnen Gruppen untereinander erfolgte die Durchführung zweiseitiger T-Tests. Im Weiteren wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson hinsichtlich einer eventuellen Korrelation von biochemischem Marker und Alter durchgeführt. Varianzanalysen wurden mittels einfaktorieller ANOVA hinsichtlich der biochemischen Marker in allen vier Gruppen mit Geschlecht als kategorialer Variable berechnet. Außer beim MMSE (T-Test) wurde bei Vergleichen der Gruppen hinsichtlich der psychometrischen Tests innerhalb der CERAD-NP Testbatterie der Mann-Whitney U Test verwendet. Die Daten wurden nach Alter und Bildungsgrad in die Kategorien

„durchschnittlich—(score 0), „- 1 SD—(score 1) und „- 1,5 SD—(score 2) eingeteilt worden.  
*P* Werte < 0,05 wurden als signifikant angesehen.

### 3. Ergebnisse

Die folgende Tabelle (Tab. 3.1) zeigt die demografischen Daten, sowie die durchschnittlichen MMSE-Scores der vier untersuchten Gruppen.

	CN	MCI	AD	Op
Gesamt (n)	8	19	20	7
Geschlecht (n)	F (4), M (4)	F (9), M (10)	F (8), M (12)	F (4), M (3)
Alter (Jahre)	72,4 ± 6,1	67,26 ± 10,9	70,35 ± 8,23	69,7 ± 7,6
MMSE –Score	28,3 ± 1,8	26,4 ± 2,4	21,2 ± 4,0 ***	29,4 ± 0,5

**Tab. 3.1** Demografische Daten der Versuchsgruppen, Mittelwerte ± Standardabweichung  
\*\*\*  $P < 0,001$  bei CN vs. AD

Das durchschnittliche Alter der verschiedenen Gruppen ist aufgrund des Matchings nicht signifikant unterschiedlich. Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Probanden ist bis auf das in der Alzheimer-Demenz-Gruppe, in der 60% der ausgewählten Probanden Männer sind, annähernd ausgewogen. Die MMSE-Scores für die Kontrollgruppe sowie für die Osteoporosegruppe liegen im oberen normalen Bereich, während die Werte erwartungsgemäß in der MCI-Gruppe tendenziell und in der Gruppe der Probanden mit Alzheimer-Demenz signifikant erniedrigt und somit deutlich pathologisch verändert sind.

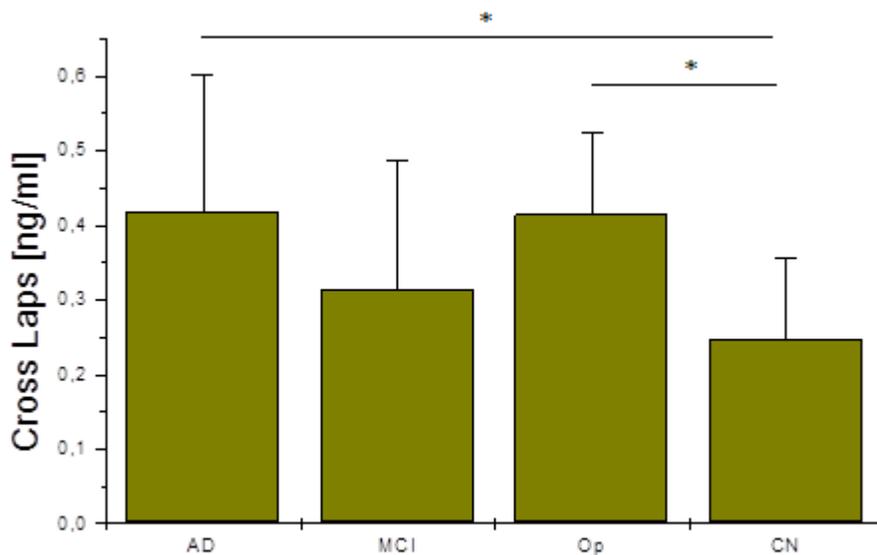
	MCI (n = 19)	AD (n = 20)	MCI vs. AD
Verbale Flüssigkeit	0,95 ± 1,03	0,95 ± 0,97	n.s.
Boston Naming Test	0,58 ± 0,90	0,74 ± 0,93	n.s.
Wortliste Lernen	0,53 ± 0,84	1,58 ± 0,77	***
Wortliste Abrufen	0,84 ± 0,96	1,68 ± 0,67	**
Konstruktive Praxis	0,11 ± 0,46	1,00 ± 1,00	**
Konstr. Parxis Abrufen	0,79 ± 0,98	1,68 ± 0,75	**
WMS sofortiger Abruf	0,95 ± 0,97	1,89 ± 0,32	***
WMS verzögerter Abruf	1,00 ± 0,94	1,89 ± 0,32	***
TMT A	0,00 ± 0,00	1,11 ± 0,99	***
TMT B	0,21 ± 0,54	1,32 ± 0,95	***

**Tab. 3.2** Zusammenfassung der psychometrischen Testergebnisse im Rahmen der Differentialdiagnostik von MCI und AD, Mittelwerte ± Standardabweichung, \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , n.s. = nicht signifikant

Zur weiteren Differenzierung der Gruppen AD und MCI wurden eine differenzierte Auswertung der CERAD-Subtests sowie der Ergebnisse der Wechsler Memory Scale –immediate“ und –delayed“ und der Trail Making Tests A und B herangezogen. Außer in den Untertests –Verbale Flüssigkeit“ und –Boston Naming Test“ zeigten sich in der Tests der CERAD Testbatterie durchweg signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Ebenso waren die Ergebnisse für WMS –immediate“ und –delayed“ sowie TMT A und B signifikant unterschiedlich. Diese Ergebnisse werden in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

### 3.1 Ergebnisse für Cross Laps

Abbildung 3.1 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung von Cross Laps.

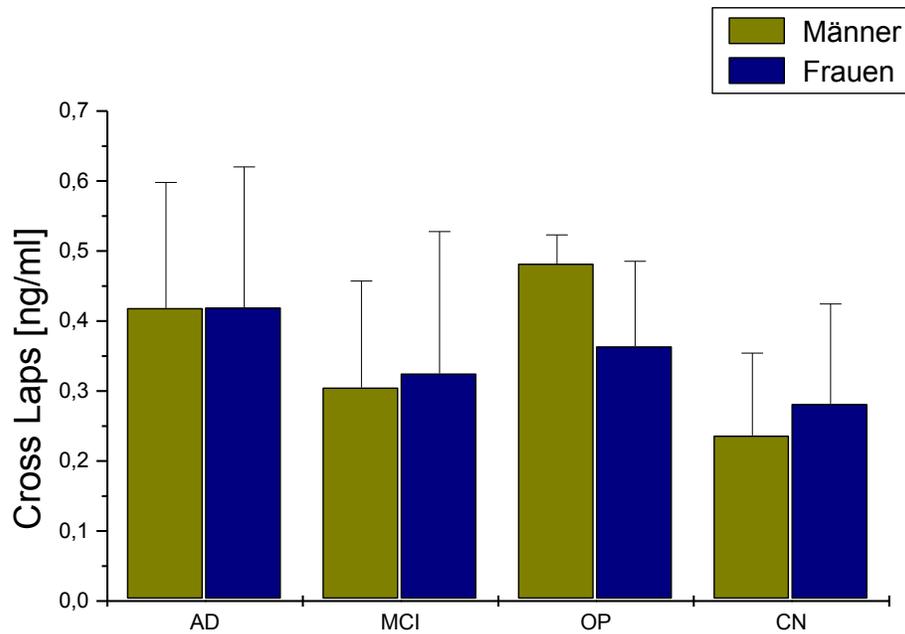


**Abb. 3.1** Plasmakonzentrationen von Cross Laps bei Patienten mit Alzheimer Demenz (AD), Mild Cognitive Impairment (MCI), Osteoporose (Op) und kognitiv unauffälligen Kontrollen (CN), Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.\*  $P < 0,05$

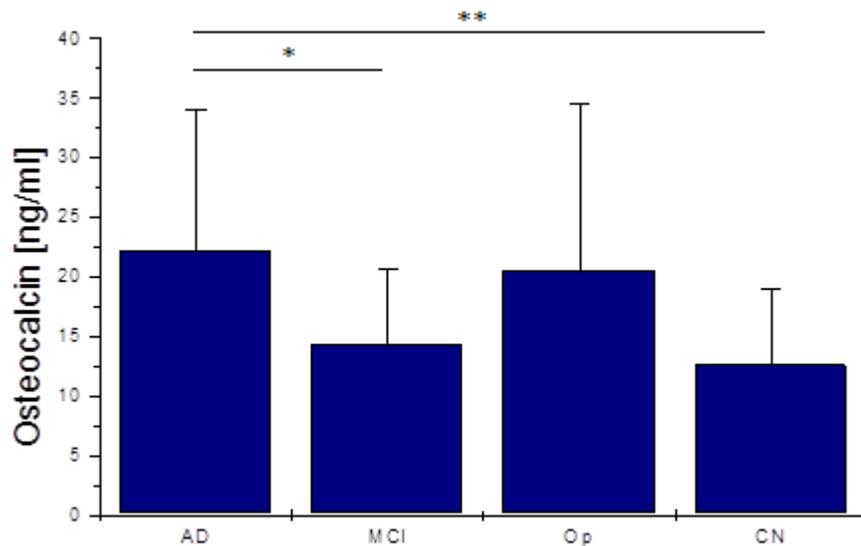
Die Plasmakonzentrationen für Cross Laps waren bei Alzheimer-Demenz und Osteoporose im Verhältnis zu den Kontrollen gleichermaßen um 68 % erhöht. Im Vergleich hierzu unterscheiden sich die Werte bei MCI nur gering von denen der Kontrollen. Der Unterschied der Konzentrationen bei Alzheimer-Demenz und Osteoporose gegenüber den Kontrollen war signifikant ( $P < 0,05$ ).

In Abbildung 3.2 sind die Ergebnisse für Cross Laps nach Geschlechtern getrennt

dargestellt. Innerhalb der Gruppen gab es zwischen den einzelnen Geschlechtern keine signifikanten Unterschiede bei den Cross Laps Konzentrationen.



**Abb. 3.2** Cross Laps Konzentrationen der Gruppen im Geschlechtervergleich

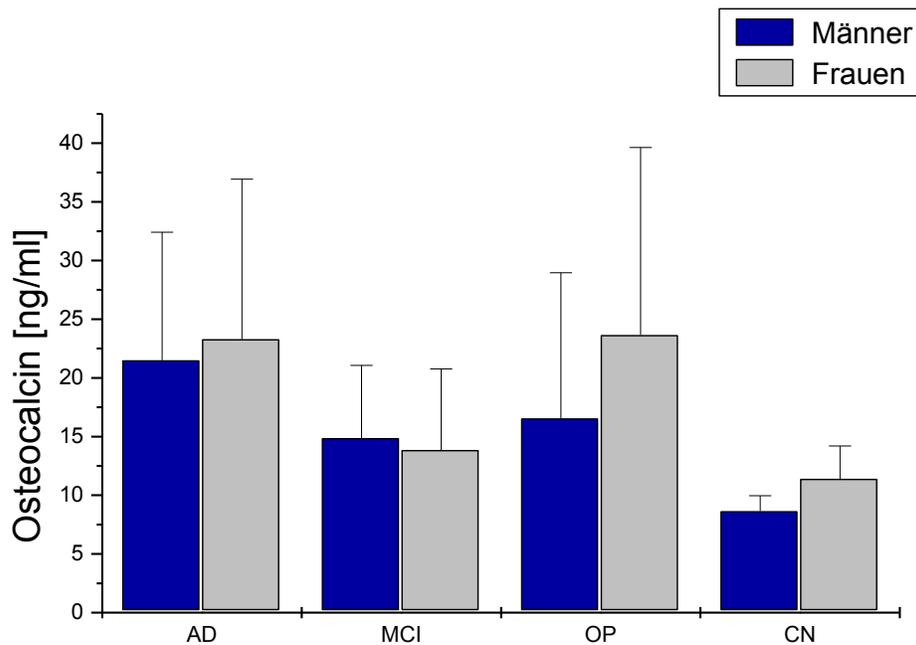


**Abb. 3.3** Plasmakonzentrationen von Osteocalcin bei Patienten mit Alzheimer Demenz (AD), Mild Cognitive Impairment (MCI), Osteoporose (Op) und kognitiv unauffälligen Kontrollen (CN), Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$

### 3.2 Ergebnisse für Osteocalcin

Das Diagramm 3.3 zeigt die Ergebnisse für die Bestimmung von Osteocalcin. Bei Alzheimer-Demenz und Osteoporose zeigte sich eine Erhöhung der Plasmakonzentrationen von Osteocalcin. Die Werte bei Alzheimer-Demenz waren gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht ( $P < 0,01$ ). Gegenüber den Kontrollen waren die Werte bei MCI nicht signifikant erhöht. Die Osteocalcinwerte waren bei Alzheimer-Demenz signifikant höher als bei MCI ( $P < 0,05$ ). Bei Osteoporose zeigte sich gegenüber den Kontrollen ein erhöhtes Osteocalcin als statistischer Trend.

In Abbildung 3.4 werden die Plasmakonzentrationen für Osteocalcin für beide Geschlechter miteinander verglichen.



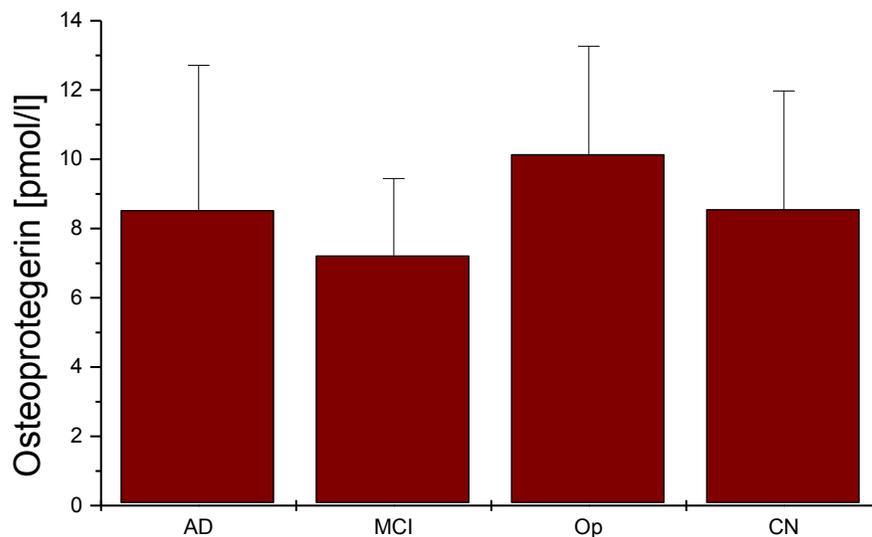
**Abb. 3.4** Osteocalcinkonzentrationen der Gruppen im Geschlechtervergleich

Die Plasmakonzentrationen für Männer und Frauen unterscheiden sich in allen vier Gruppen nicht signifikant.

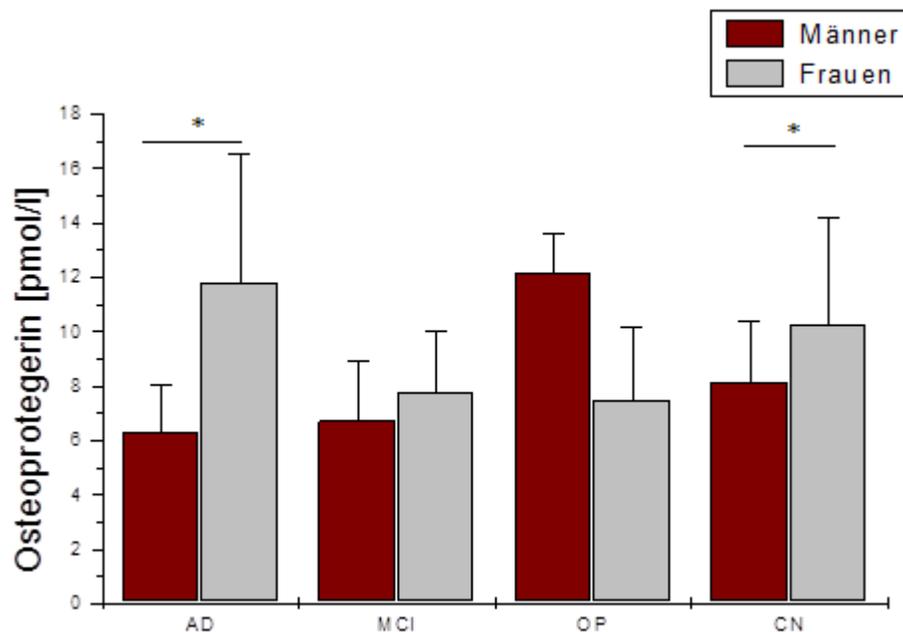
### 3.3 Ergebnisse für Osteoprotegerin

Abb. 3.5 zeigt die Ergebnisse für die Bestimmung von Osteoprotegerin. Hier bestanden zwischen den einzelnen Diagnosegruppen keine signifikanten Unterschiede. Es zeigte sich jedoch insgesamt ein Trend zu höheren Werten bei Alzheimer-Demenz und Osteoporose im Vergleich zu MCI und Kontrollprobanden.

Beim Vergleich der Werte zwischen Männern und Frauen zeigten sich signifikant höhere Osteoprotegerinwerte bei Frauen in der Alzheimer-Demenz Gruppe und bei Männern in der Osteoporose Gruppe (Abb. 3.6).



**Abb. 3.5** Plasmakonzentrationen von Osteoprotegerin bei Patienten mit Alzheimer Demenz (AD), Mild Cognitive Impairment (MCI), Osteoporose (Op) und kognitiv unauffälligen Kontrollen (CN), Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.



**Abb. 3.6** Osteoprotegerinkonzentrationen der Gruppen im Geschlechtervergleich. \*  $P < 0,05$

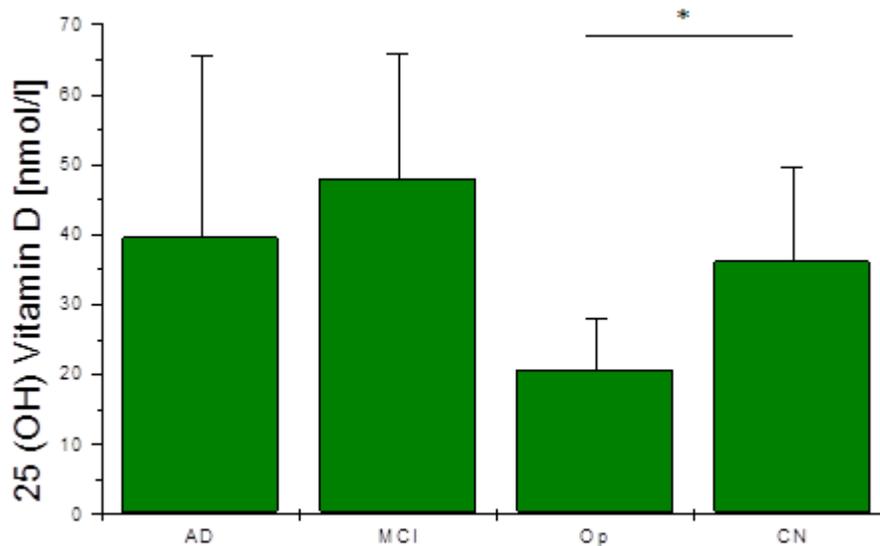
Insgesamt zeigten sich in allen untersuchten Diagnosegruppen außer der Osteoporose-Gruppe höhere Osteoprotegerin-Werte bei Frauen als bei Männern. Die durchschnittliche Osteoprotegerinkonzentration war bei Frauen um den Faktor 1,5 höher als bei Männern. Dieser Sachverhalt wird in Tabelle 3.3 dargestellt.

Geschlecht (n)	Osteoprotegerin (pmol/l)
M (28)	6,8 ± 2
W (24)	10.16 ± 3,76

**Tab. 3.3** Osteoprotegerinkonzentrationen im Plasma von männlichen (M) und weiblichen (W) Studienteilnehmern, Mittelwert ± Standardabweichung, ANOVA: gender effect  $P < 0,0005$

### 3.4 Ergebnisse für 25 (OH) Vitamin D

Abbildung 3.7 zeigt die Ergebnisse für die Bestimmung von 25 (OH) Vitamin D

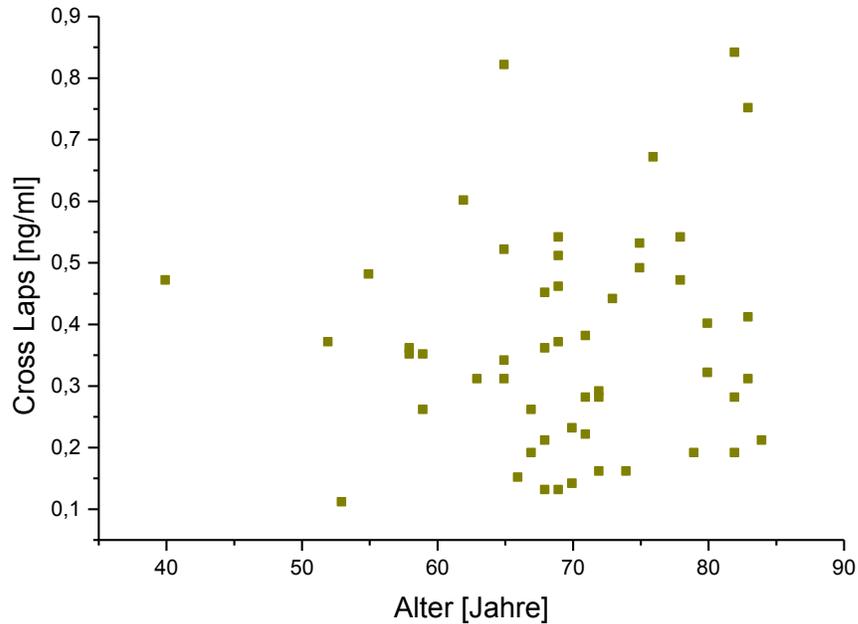


**Abb. 3.7** Plasmakonzentrationen von 25 (OH) Vitamin D bei Patienten mit Alzheimer Demenz (AD), Mild Cognitive Impairment (MCI), Osteoporose (Op) und kognitiv unauffälligen Kontrollen (CN), Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \*  $P < 0,05$

Die durchschnittliche Vitamin-D-Konzentration der Osteoporose-Gruppe war signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe und unterschritt die Schwelle für einen Vitamin-D-Mangel (25 nmol/l nach McKenna und Freaney, 1998). Die Durchschnittswerte der anderen Gruppen lagen deutlich über dem Schwellenwert und befanden sich somit im niedrig normalen Bereich sowohl bei den gesunden Kontrollen, als auch bei den Probanden mit Alzheimer-Demenz und MCI. Dies entspricht typischen Werten für Europäer in fortgeschrittenem Lebensalter (Ovesen et al., 2003).

## 3.5 Korrelationsberechnungen

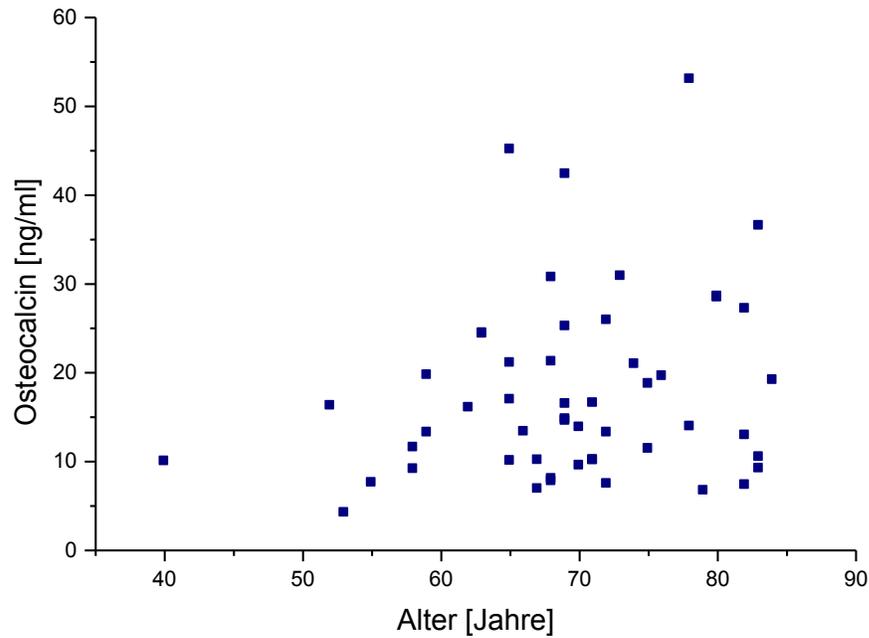
### 3.5.1 Cross Laps



**Abb. 3.8** Grafische Darstellung des korrelativen Zusammenhangs zwischen Cross Laps Konzentration im Plasma und Alter mit Hilfe eines Scatterplots.

In Abb. 3.8 wird der korrelative Zusammenhang zwischen Cross Laps-Konzentration im Plasma der Probanden und Alter grafisch dargestellt. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson ergab einen Wert von  $r = 0,08$ . Die Abweichung des Korrelationskoeffizienten von 0 war für die untersuchte Population nicht signifikant.

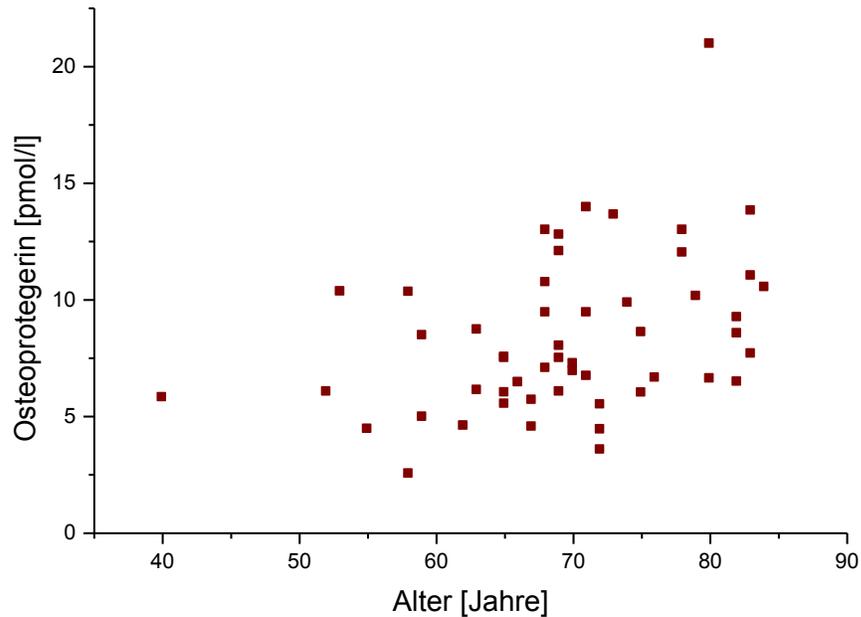
### 3.5.2 Osteocalcin



**Abb. 3.9** Grafische Darstellung des korrelativen Zusammenhangs zwischen Osteocalcin-Konzentration im Plasma und Alter mit Hilfe eines Scatterplots.

In Abbildung 3.9 wird der Zusammenhang zwischen der Osteocalcin-Konzentration im Plasma der Probanden und ihrem Alter grafisch dargestellt. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson ergab einen Wert von  $r = 0,22$ . Die Abweichung des Korrelationskoeffizienten von 0 war für die untersuchte Population nicht signifikant.

### 3.5.3. Osteoprotegerin



**Abb. 3.10** Grafische Darstellung des korrelativen Zusammenhangs zwischen Osteoprotegerin-Konzentration im Plasma und Alter mit Hilfe eines Scatterplots.

In Abbildung 3.10 wird der Zusammenhang zwischen der Osteoprotegerin-Konzentration im Plasma der Probanden und Alter grafisch dargestellt. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson ergab einen Wert von  $r = 0,38$ . Die Abweichung des Korrelationskoeffizienten von 0 war für die untersuchte Population signifikant ( $P < 0,01$ ).

## 4. Diskussion

Die vorliegende Untersuchung basierte auf den folgenden Überlegungen: Biomarker des Knochenstoffwechsels könnten auf eine erhöhte Komorbidität von Alzheimer-Demenz und Osteoporose bereits in präklinischen Stadien hinweisen. Die Annahme einer Komorbidität ist aufgrund einiger pathogenetischer Parallelen der Krankheitsbilder (siehe Kapitel 1) naheliegend und durch eine Anzahl klinisch-epidemiologischer Studien belegt (siehe Tab. 4.1). Beiden Erkrankungen ist zudem eine Anzahl biologischer Einflussfaktoren gemein, wie z.B. kumulative Östrogeneffekte (siehe Kapitel 1 und unten).

In dem gewählten Untersuchungsansatz sollten zudem mögliche gemeinsame molekulare Mechanismen in der frühen Entstehungsphase beider Erkrankungen näher beleuchtet werden. In diesem Zusammenhang war insbesondere die Bestimmung der Osteoprotegerinkonzentrationen von Interesse, da Osteoprotegerin einerseits durch seine RANKL-Interaktion den Knochenkatabolismus antagonisieren kann, andererseits aber auch möglicherweise über TRAIL-Wechselwirkung eine antiapoptotische Wirkung im Gehirn von an Alzheimer-Demenz erkrankten Patienten entfalten könnte (Uberti et al., 2004).

Obwohl sich bereits einige Studien mit der Komorbidität von Osteoporose und Alzheimer-Demenz beschäftigt haben, gibt es gemäß pubmed Recherche noch keine Veröffentlichung anderer Arbeitsgruppen hinsichtlich der biochemischen Marker der Osteoporose bei Mild Cognitive Impairment und Alzheimer-Demenz in direktem Vergleich mit Osteoporose Patienten und gesunden Kontrollen. Zumeist wurde in den bisherigen Studien die Diagnose Osteoporose anhand klinischer Zeichen wie Frakturraten oder durch radiologische Untersuchungen gestellt. Die Untersuchung der biochemischen Marker im Blut könnte gegenüber den klinischen Osteoporosesymptomen und möglicherweise auch gegenüber der Knochendichtemessung jedoch ein sensitiverer Parameter sein, mit dem sich bereits leichte präklinische Veränderungen des Knochenstoffwechsels detektieren lassen.

Komorbiditätsstudien mit Querschnittsdesign gaben keinen Hinweis dafür, dass bei leichtgradiger Demenz im Gegensatz zu gesunden Kontrollen die Knochendichte

reduziert war (Kipen et al. 1995). Bei leicht- oder höhergradiger Demenz fand sich zwar ein Vitamin-D-Mangel (Sato et al. 1998), jedoch konnte lediglich für Frauen mit höhergradiger Demenz eine Assoziation mit einer reduzierten Knochendichte gefunden werden (Johansson et al. 1996). Eine aktuelle Studie zeigte eine signifikante Verminderung der Knochendichte bei postmenopausalen Patientinnen mit kognitiver Beeinträchtigung, hier wurden drei Gruppen mit Patientinnen mit subjektiver kognitiver Störung, Mild Cognitive Impairment und Alzheimer-Demenz untersucht (Lee et al. 2012). In prospektiven Studien mit wesentlich höheren Fallzahlen konnte zudem herausgearbeitet werden, dass eine geringere basale Knochendichte und eine erhöhte Abnahme der Knochendichte mit einem höheren Risiko für kognitiven Abbau assoziiert sind (Lui et al. 2003). Bei Frauen war die geringere basale Knochendichte assoziiert mit erhöhter Inzidenz der Alzheimer-Demenz (Tan et al. 2005). Insgesamt ist die Mehrzahl der Studienergebnisse an weiblichen Kollektiven erhoben worden. In diesem Zusammenhang muss daher die ohnehin bestehende höhere geschlechtsspezifische Inzidenz der Altersosteoporose bei Frauen bedacht werden, sodass möglicherweise nur bei Frauen ein Komorbiditätszusammenhang gegeben oder beobachtbar ist.

In der Studie von Nilsson et al. (2005) wurden ebenfalls Biomarker des Knochenstoffwechsels untersucht. Hierbei fanden sich erhöhte Werte für Cross Laps und Osteocalcin bei Demenzpatienten, ohne dass hinsichtlich der Form der Demenz (Alzheimer Typ, vaskulär etc.) unterschieden wurde. Schließlich liegt mit der Studie von Loskutova et al. (2010) eine Arbeit vor, die den Zusammenhang zwischen für die Alzheimer-Demenz typischen hirmmorphologischen Veränderungen und einem Verlust der Knochendichte untersucht. Hierbei konnte gefunden werden, dass eine Verringerung des hypothalamischen Volumens (gemessen mittels voxelbasierter Morphometrie) bei Patienten mit Alzheimer-Demenz mit einer verminderten Knochendichte assoziiert ist.

Als Kovariaten der beschriebenen Assoziationen sind unter anderem die kumulative Östrogendosis und der Komplex Mangelernährung und verminderte Sonnenlichtexposition zu berücksichtigen. Bezüglich der Frage des Östrogeneinflusses weist die Querschnittsstudie von Zhang et al. darauf hin, dass eine erhöhte kumulative Östrogendosis einen Verlust der Knochendichte verhindert und damit die Inzidenz der Osteoporose senkt (Zhang et al. 2001). Zudem könnte sich diese auch neuroprotektiv

auswirken und damit die Inzidenz der Alzheimer-Demenz senken (vgl. Jacobs et al. 1998, Maki et al. 2000, Resnick et al. 1998). Weiterhin zeigt sich, dass eine fortschreitende Demenz vermehrt mit geringer Sonnenlichtexposition und mitunter Mangelernährung einher geht. Hierbei kann Vitamin-D-Mangel ein Grund für eine erhöhte Inzidenz der Osteoporose sein und ein Mangel von Folsäure, Vitamin B 12 und Vitamin E ein Grund für die erhöhte Inzidenz der Alzheimer Demenz (Kipen et al. 1995, Sato et al. 1998).

	Diagnose Demenz	Diagnose Osteoporose	Intervenierende Variablen	Ergebnis
Kipen et al. JAGS, 1995 n = 60 Querschnittserhebung	Mild dementia (DSM-II-R), probable AD (NINCDS-ADRDA)	Knochendichte (DXA) LWS, Femurhals, P-CA, P-Phos, Vitamin D, PTH	Alter der Patienten > Alter Kontrollen, kein Unterschied bzgl. Größe, Gewicht, tägl. Ca Zufuhr, Menopausenalter	Kein Unterschied in BMD, kein Unterschied bei P-Ca und P-Phos, Vitamin reduziert, PTH erhöht
Johansson et al. Aging Clin Exp Res, 1996 n = 485 Querschnittserhebung	Dementia (DSM-III-R), probable AD (NINCDS-ADRDA), VD (Erkinjuntti)	Knochendichte (DXA) Calcaneus	Demenzkranke häufiger im Heim wohnend und häufiger mit psychotroper Medikation	Geringere Knochendichte ♀ vs. ♂, kein Unterschied demenz vs. nicht demenz
Sato et al. Bone, 1998 n = 186 Querschnittserhebung	Dementia (DSM-III-R), probable AD (NINCDS-ADRDA)	Knochendichte (DXA) metacarpal, P-CA, Vitamin D, PTH, OH-Prolin	Sonnenlicht-Exposition, Ca und Vitamin D Zufuhr	Knochendichte bei Demenz reduziert, P-Ca und Vitamin D reduziert, PTH und Prolin erhöht
Yaffe et al. JAGS 1999 n = 8333 Prospektive Studie	Cognitive decline (Trails B, digit Symbol, MMSE)	Knochendichte Calcaneus (SXA), Hüfte (DXA)	Adjustierung für Alter, Behinderung im Alltag, körperliche Aktivität, BMI, Alkohol	Niedrige baseline BMD, BMD Abnahme oder Fraktur korreliert mit erhöhtem kognitivem Abbau
Zhang et al. J Epidemiol, 2001 n = 4304 Prospektive Studie	Verbal memory impairment Delayed item recall test	Knochendichte (DXA) Hüfte	Adjustierung für Alter, Bildung, Alkohol, Nikotin, Stroke, Bluthochdruck	Niedrige BMD bei ♀ und ♂ assoziiert mit verbal memory impairment

Lui et al. J Am Geriatr, 2003 n = 4464 Prospektive Studie	Cognitive decline mMMSE	Knochendichte (DXA) Hüfte	Adjustierung für Alter, Bildung, Stroke, Behinderung im Alltag, Östrogengebrauch, Sport	Hohe Abnahmerate der Knochendichte assoziiert mit kognitivem Abbau unabhängig vom ApoE-Genotyp
Tan et al. Arch Neurol, 2005 n = 987 Prospektive Studie	Developing Alzheimer disease DSM IV, NINCDS-ADIRDA, CDR	Knochendichte Femurhals und Trochanter (DXA), Radius (SXA)	Adjustierung für Alter, Geschlecht, Östrogengebrauch, körperliche Bewegung	Niedrige baseline Knochendichte assoziiert mit höherem Risiko für AD bei Frauen, nicht bei Männern
Nilsson et al. Scand J Clin Lab Invest, 2005 n = 152 Querschnittserhebung	Demenz Klinische Untersuchung, cCT, Doppler, EEG psychometrische Testung	Osteocalcin, Cross Laps, alkalische Phosphatase	Calcium und Vitamin D Zufuhr, keine Unterscheidung verschiedener Demenzformen	Cross Laps und Osteocalcin bei Demenz erhöht, hinsichtlich alkalischer Phosphatase kein Unterschied
Loskutova et al. J Alzheimers Dis 2010 n = 118 Querschnittserhebung	Early Alzheimer disease Clinical dementia rating, MMST	Knochendichte (DXA), whole body BMD	Sonnenlicht-Exposition, Bewegung, kein Unterschied bzgl. Ca und Vitamin D Zufuhr	Hypothalamisches Volumen reduziert bei AD und assoziiert mit niedriger BMD
Lee et al. Menopause 2012 n=120 Querschnittserhebung	SMI, MCI, AD neuropsychological tests: MMST, CDR	Knochendichte DXA		Knochendichte bei kognitiver Beeinträchtigung signifikant vermindert

**Tab. 4.1** Übersicht über Komorbiditätsstudien zu Demenzerkrankungen und Osteoporose

Mehrere prospektiven Studien, die durchschnittlich wesentlich größere Fallzahlen aufweisen, zeigen jedoch eine positive Assoziation von geringerer Knochendichte mit kognitivem Abbau auch nach Adjustierung für multiple intervenierende Variablen wie Östrogen- und Vitamin-D-Einnahme (Lui et al. 2003). Dies weist darauf hin, dass es gemeinsame Pathogenesefaktoren für Alzheimer-Demenz und Osteoporose unabhängig von Östrogen- oder Vitaminmangel geben könnte.

Die Auflistung der wichtigsten bisherigen Komorbiditätsstudien (Tab. 4.1) zeigt, dass

eine Untersuchung von Biomarkern des Knochenstoffwechsels speziell bei Patienten mit Alzheimer-Demenz und insbesondere bei Patienten mit Mild Cognitive Impairment als Vorstufe einer Demenz noch nicht oder nicht ausreichend erfolgt ist. Oftmals wurde nur der nosologisch undifferenzierte Endpunkt „kognitiver Abbau— untersucht, ohne Entsprechung zu den Kriterien für MCI nach Petersen (1999). Die vorliegende Studie stellt also eine Neuerung dar, da hier Probanden mit Vor- und Frühstadien der Alzheimer-Demenz untersucht werden.

In diesem Zusammenhang wurden Cross Laps und Osteocalcin als Marker des Knochenstoffwechsels für die durchgeführte Untersuchung ausgewählt. Die Bestimmung der sogenannten Cross Laps dient dem Nachweis von Knochenabbau, während Osteocalcin ein Marker für Knochensynthese ist. Zudem wurde die Plasmakonzentration von Osteoprotegerin, einem möglichen Marker krankheitsübergreifender Pathogenesemechanismen, bestimmt. Zusätzlich erfolgte eine Bestimmung von Vitamin D, um eventuelle Störungen des D-Hormon-Haushaltes oder Malnutrition zu erkennen und als Störvariable ausschließen zu können.

Im Folgenden sollen nochmals die einzelnen bestimmen Biomarker in ihren wichtigsten und für die Arbeit relevanten Funktionen beschrieben werden:

### Cross Laps

Bei den Cross Laps handelt es sich um Spaltprodukte, sogenannte Cross-Link-Telopeptide, des Tropokollagens, welche in Blut und Urin quantitativ nachgewiesen werden können und mit dem Grad des Knochenabbaus korrelieren. Diese Telopeptide sind spezifisch für das Kollagen des Knochens und werden nicht weiter metabolisiert.

In den Osteoblasten wird Prokollagen Typ I gebildet und in den Extrazellulärraum abgegeben. Hier werden durch Peptidasen N- und C-terminale Propeptide abgespalten, so dass das aktive Tropokollagen entsteht. Die Moleküle werden nun über Pyridinolin und Desoxypyridinolin mit einander verknüpft und bilden Kollagenfibrillen. Wird durch Osteoklasten der Knochen abgebaut, kommt es durch Abspaltung zu Freisetzung N- und C-terminaler Telopeptide des Typ I Kollagens. Sie erscheinen in Blut und Urin.

### Osteocalcin

Osteocalcin ist das häufigste nicht kollagene Protein der Knochenmatrix. Es wird von

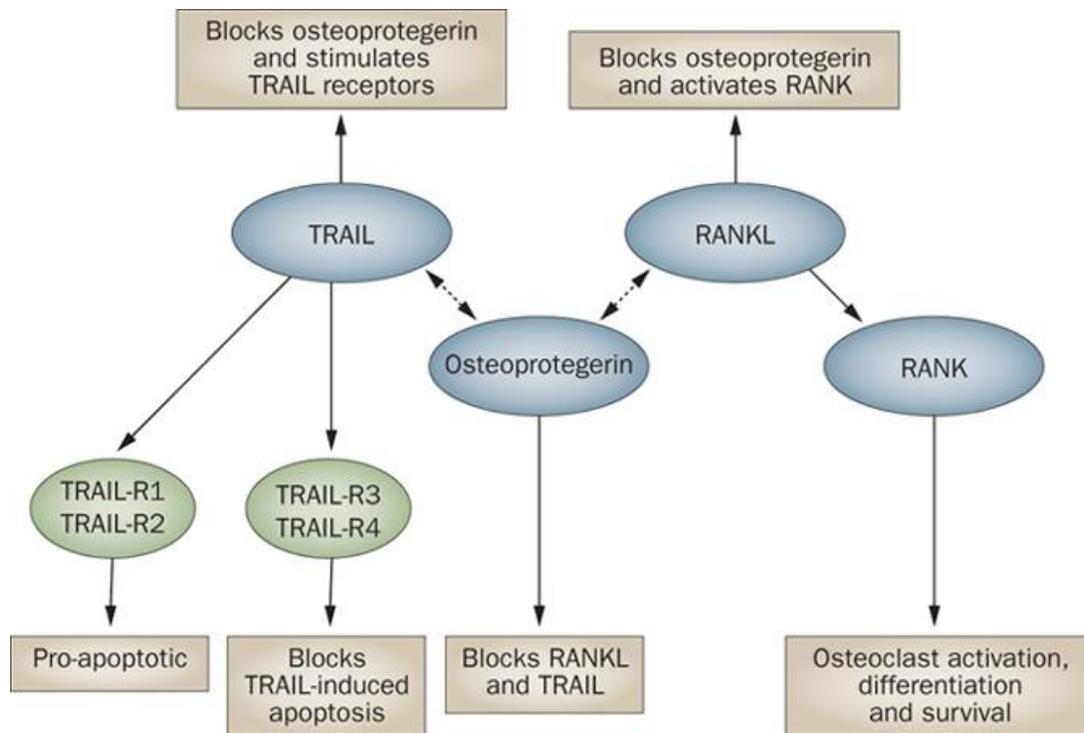
Osteoblasten gebildet, seine Serumspiegel korrelieren mit der Aktivität der Osteoblasten. Osteocalcin ist chemisch sehr labil und wird in der Niere frei filtriert, was zu stark fluktuierenden Serumspiegeln führen kann. Das Protein ist also ein Syntheseparameter der regulären Knochenmatrix und dient unter anderem der Klassifikation von Osteopathien und der Therapieüberwachung z.B. einer Osteoporosebehandlung. Des Weiteren wird Osteocalcin herangezogen, um unklare Erhöhungen der Alkalischen Phosphatase (Knochen AP) zuzuordnen.

### Osteoprotegerin

Osteoprotegerin wird von Osteoblasten gebildet und greift in den Reifungsprozess der Osteoklasten antagonistisch ein. Die Bindung von RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand) an den zellulären Rezeptor RANK bewirkt eine Wachstumsstimulation der Osteoklastenvorstufen. Aus den Vorstufen bilden sich reife Osteoklasten. Osteoprotegerin ist befähigt RANKL zu binden und somit die Aktivierung von RANK und die davon abhängige Differenzierung der Osteoklastenvorstufen zu reifen Osteoklasten zu inhibieren.

Des Weiteren ist Osteoprotegerin ein Rezeptor für den zytotoxischen Liganden TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand). Durch Bindung kann Osteoprotegerin die durch TRAIL induzierte Apoptose hemmen (Emery et al., 1998). Die erhöhte Expression von TRAIL konnte auch in Gehirnen von an Alzheimer-Demenz Erkrankten nachgewiesen werden, hier insbesondere im Cortex oder in der Nähe amyloider Plaques (Uberti et al., 2004).

Abb. 4.1 zeigt die Funktion und Interaktionen von Osteoprotegerin mit RANKL und TRAIL in einer schematischen Darstellung. Über die Bindung von RANKL kann somit eine Hemmung des Knochenkatabolismus induziert werden. Durch die Bindung von TRAIL kann dessen Apoptose-induzierende Wirkung, die möglicherweise auch ein Pathomechanismus bei der Entstehung der Alzheimer-Demenz ist, gehemmt werden.



**Abb. 4.1** Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Osteoprotegerin, RANK und TRAIL (Flyvbjerg 2010).

### D-Hormon (Vitamin D)

Das D-Hormon Calcitriol, auch Vitamin D genannt, kann über einen komplexen Syntheseweg vom Organismus selbst produziert werden. Dies entspricht streng genommen nicht dem Begriff eines Vitamins, welcher beinhaltet, dass der menschliche Körper auf die Zufuhr eben dieses Stoffes angewiesen ist. Bei Vitamin D ist dieser Sachverhalt nur bei Lichtmangel in vollen Umfang gegeben.

Vitamin D entsteht aus der Vorstufe 7-Dehydrocholesterol durch UV-Bestrahlung in der Haut mit nachfolgender enzymatischer Veränderung in Leber und Niere. Das in der Niere gebildete Calcidiol stellt die Speicherform des Vitamin D im Blut dar und besitzt eine Halbwertszeit von ca. 15 Tagen. Die Umformung zu Calcitriol in der Niere wird unter anderem durch das in den Epithelkörperchen gebildete Parathormon reguliert.

Die Wirkung von Vitamin D wird über den im Zellkern lokalisierten Vitamin-D-Rezeptor aus der Familie der Steroidhormonrezeptoren vermittelt. Es erfolgt hierüber eine Regulation der Calciumhomöostase, mit Auswirkungen auf den Stoffwechsel von insbesondere Gastrointestinaltrakt und Knochen. Im Gastrointestinaltrakt fördert das D-

Hormon die Resorption von Calcium und Phosphat. Im Knochen kommt es zu einer Aktivierung von Osteoblasten, die Proteine bilden, welche Calciumionen binden können und dadurch einen Bestandteil der Knochenmatrix bilden.

Zur Beurteilung der kognitiven Leistung der Probanden wurde in der vorliegenden Arbeit bei jedem Studienteilnehmer der Mini Mental Status Test durchgeführt. Es handelt sich hierbei um einen weit verbreiteten Demenz-Screening-Test, der allerdings für geringe kognitive Defizite, wie bei MCI, einen Deckeneffekt aufweist. Es konnte erwartungsgemäß gezeigt werden, dass lediglich in der Gruppe der an Alzheimer-Demenz erkrankten Probanden gegenüber der Kontrollgruppe ein signifikant niedriger Wert zu verzeichnen war (Tab. 3.1). Mit einem Durchschnittswert von 21,2 Punkten lag diese Gruppe im deutlich pathologischen, dennoch leicht dementen Bereich. In der Gruppe MCI zeichnete sich, ebenfalls erwartungsgemäß, gegenüber der Osteoporose-Gruppe und den Kontrollprobanden lediglich ein Trend hin zu niedrigeren Testwerten ab, ohne dass sich ein signifikanter Unterschied ergab.

Zusätzlich wurde daher zur weiteren genaueren Unterscheidung der Gruppen Alzheimer-Demenz und Mild Cognitive Impairment die CERAD-Testbatterie durchgeführt und eine genaue Auswertung der CERAD-Untertests vorgenommen (Tab. 3.2). Bis auf die Subtests „Verbale Flüssigkeit—und „Boston Naming Test—wurden in der Alzheimer-Demenz-Gruppe signifikant höhere und damit deutlicher im pathologischen Bereich liegende Scores erreicht. Auf neuropsychologischer Ebene war also eine ausreichende Differenzierung dieser beiden Gruppen möglich.

Um Hochrisikopatienten für Osteoporose bzw. bereits manifeste Osteoporosefälle in den Probandengruppen Alzheimer-Demenz und MCI ausschließen zu können, wurde ein Fragebogen zum Osteoporoserisiko entworfen, der die wichtigsten Risikofaktoren für Entstehung von Knochenverlust erfasst. Zum Ausschluss führten hierbei das Vorliegen einer klinisch manifesten Osteoporose, andauernde Immobilität oder eine tägliche Gehstrecke von weniger als 500 Metern sowie eine langfristige Therapie mit Glucocorticoiden. Hierbei handelt es sich zwar nicht um ein Messinstrument, mit dem sich das Vorhandensein einer Osteoporose sicher ausschließen lässt. Vergleichbare Fragebögen werden jedoch auch bereits im klinischen Alltag zum Abschätzen des

Osteoporoserisikos eingesetzt (vgl. Bartel, 2004). Auf die Messung der Knochendichte bei allen Probanden musste aus Gründen der Praktikabilität verzichtet werden.

Wie bereits in Kapitel 2 beschrieben erfolgte die Messung der genannten biochemischen Marker bei den Probanden in nicht nüchternem Zustand. Dies erfolgte aus Gründen der Praktikabilität. Bei den Probanden handelte es sich um Menschen in fortgeschrittenem Lebensalter, bei denen eine konsequent nüchterne Blutentnahme bei ihren Ambulanzbesuchen nicht sicher gewährleistet werden konnte. Christgau et al. (2000) untersuchten die Effekte des nüchternen vs. nicht nüchternen Zustands auf die Konzentrationen von Cross Laps und Osteocalcin im Blut postmenopausaler Frauen. Es zeigte sich, dass die Cross Laps-Konzentrationen einem circadianen Rhythmus folgen, der durch den Nüchtern-Status beeinflusst wird. Bei nüchternen vs. nicht nüchternen Patientinnen war der circadiane Rhythmus dahingehend geändert, dass sie tagsüber deutlich niedrigere und nachts deutlich höhere Cross Laps-Spiegel aufwiesen. Zudem lag die durchschnittliche intraindividuelle Schwankung der Werte im Tagesverlauf für die Gruppe der nüchternen Probanden bei  $\pm 8,8\%$ , während die Werte in der nicht nüchternen Gruppe um  $\pm 35\%$  schwankten. Der nicht nüchterne Status der Probanden zum Zeitpunkt der Blutentnahme bedingt demnach, dass der natürliche Rhythmus der Konzentrationen von Cross Laps nicht verändert wird. Christgau et al. konnten zudem zeigen, dass die Probenentnahme bei nüchternen bzw. nicht-nüchternen Probanden auf die Konzentration von Osteocalcin keinen signifikanten Einfluss hat. Die durchschnittlichen intraindividuellen Schwankungen lagen bei nüchternen Patienten bei  $\pm 7,1\%$ , bei nicht nüchternen Patienten bei  $\pm 8,8\%$ . Da die Blutentnahmen im Rahmen der vorliegenden Arbeit in einem konstanten Zeitfenster (9-11h) erfolgten, wurde ein unsystematischer Fehler infolge des Nicht-nüchtern-Status und der damit assoziierten höheren circadianen Schwankungen weitgehend vermieden.

Schwere Malnutrition oder Hypovitaminose konnten durch die Bestimmung der Vitamin D-Spiegel ausgeschlossen werden, weil alle in der Studie gemessenen Werte oberhalb der Schwelle zum Vitamin-D-Mangel von 25 nmol/l (McKenna und Freany, 1998) lagen. Die durchschnittlichen Messwerte waren zudem in den Gruppen Alzheimer-Demenz, MCI und Kontrollprobanden nicht signifikant unterschiedlich. Vitamin-D-Mangel kann

daher als mögliche Kovariate für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden.

Biomarker des Knochenstoffwechsels wurden bereits in Bezug auf Geschlechtsunterschiede und Hormoneffekte untersucht: Sowohl die Serumkonzentrationen für Cross Laps als auch für Osteocalcin sind bei postmenopausalen Frauen erhöht (Seifert-Klauss et al., 2005). Dies entspricht unseren Befunden. Unter Hormonersatztherapie in der Menopause kommt es zu einer Reduktion der erhöhten Spiegel für Cross Laps (Bhattoa et al., 2004). Auch für Osteocalcin wurde beschrieben, dass es unter Hormonersatztherapie zu einem Absinken der Spiegel kommt (Popp et al., 2006).

Weiterhin war die Untersuchung der Konzentrationen von Biomarkern des Knochenstoffwechsels bei Probanden mit psychiatrischen Erkrankungen Gegenstand verschiedener Studien: Kahl et al. (2005) untersuchten die Konzentration von Markern des Knochenstoffwechsels und die Knochendichte bei Patientinnen mit emotional instabiler Persönlichkeitsstörung vom Borderline Typ und Depression. Hierbei fanden sich nur tendenziell geringere Knochendichtewerte bei Patientinnen mit Borderline-Störung und komorbider Depression im Vergleich zu Patientinnen, bei denen lediglich eine Borderline-Persönlichkeitsstörung vorlag, und zu gesunden Kontrollprobandinnen. Die gemessenen Serumspiegel für Cross Laps waren bei Patientinnen mit Borderline-Persönlichkeitsstörung tendenziell, bei Patientinnen mit komorbider depressiver Störung signifikant höher als bei den gesunden Kontrollen, was für eine höhere Sensitivität der Biomarkerbestimmung gegenüber dem radiologischen Verfahren spricht. Auch der Osteoblastenmarker Osteocalcin war bei Patientinnen mit Borderline-Persönlichkeitsstörung und komorbider depressiver Störung signifikant erhöht; man interpretierte dies als mögliches Zeichen dafür, dass der Knochenverlust vornehmlich auf eine Osteoklastenaktivierung zurückgeht und weniger durch eine Inhibierung der Osteoblasten entsteht.

In einer anderen, bereits oben erwähnten Studie wurden Marker des Knochenstoffwechsels bei gerontopsychiatrischen Patienten mit vorliegender demenzieller Erkrankung gemessen (Nilsson et al., 2005). Primäres Studienziel dieser Studie war allerdings die Untersuchung von Homocystein in Zusammenhang mit

Markern des Knochenstoffwechsels bei gerontopsychiatrischen Patienten. Nebenbefundlich zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Serumwerte für Cross Laps sowie eine leichte Erhöhung der gemessenen Werte für Osteocalcin bei Patienten mit Demenz im Vergleich zu einem Patientenkollektiv ohne vorliegende demenzielle Erkrankung. Hierbei handelte es sich jedoch nicht um eine Population gesunder Kontrollprobanden, sondern eine Gruppe von Patienten mit depressiven Störungen, weiteren psychischen Störungen, aber auch Patienten mit MCI und subjektiver kognitiver Störung (SCI). In der Gruppe der Demenzpatienten fanden sich Patienten mit Alzheimer-Demenz, vaskulärer Demenz, anderen Demenzformen, aber auch Demenzen unklarer Ätiologie. Im Rahmen der durchgeführten Assoziationsberechnungen wurden lediglich die diagnostisch undifferenzierten Gruppen - Patienten mit Demenzerkrankung vs. Patienten mit nicht demenziellen Erkrankungen - verglichen. Die in dieser Arbeit bei Demenz erhöht gemessenen Spiegel für Cross Laps und Osteocalcin können somit bereits als Hinweise für eine erhöhte Komorbidität mit subklinischer Osteoprose gewertet werden. Die gemessenen Werte für beide Marker korrelierten zudem deutlich mit den Variablen Alter und Geschlecht, letzteres zeigte sich durch die Tatsache, dass die Werte bei Frauen gegenüber männlichen Patienten deutlich angehoben waren. In dieser Studie wurden die möglichen demenzassoziierten Kovariaten Malnutrition und Mobilitätseinschränkungen nicht erfasst, so dass nicht auszuschließen ist, dass diese Faktoren die Studienergebnisse beeinflusst haben.

In unserer Untersuchung waren die Konzentrationen für Cross Laps in den Gruppen Alzheimer-Demenz und Osteoporose auf ein ähnliches Level signifikant erhöht, während in der Gruppe Mild Cognitive Impairment gegenüber den Kontrollen keine Erhöhung zu verzeichnen war. Dies spricht für einen erhöhten Knochenabbau bei milder Alzheimer-Demenz, jedoch nicht bei MCI, einem Risiko- bzw. Vorstadium der Alzheimer-Demenz. Dieser Befund bestätigt die von Nilsson et al. (2005) gefundenen Ergebnisse bei Patienten mit Demenzerkrankung. Hingegen konnte eine Korrelation von höherem Lebensalter und Erhöhung der Cross Laps Konzentration im Gegensatz zur Studie von Nilsson et al. bei vergleichbaren Altersspannen der Studienpopulationen nicht gefunden werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass in der Studie von Nilsson et al. keinerlei Informationen bezüglich Risikofaktoren für eine Osteoporose (z.B. Mobilität)

bei den Patienten erhoben wurden. Die mit dem Alter korrelierenden erhöhten Cross Laps-Konzentrationen könnten somit durch eine altersbedingte zunehmende Immobilität zu erklären sein. Anders als bei Nilsson et al. konnte in der vorliegenden Studie eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Immobilität oder Malnutrition mit Vitamin-D-Mangel ausgeschlossen werden.

Die in Abb. 3.3 dargestellten Ergebnisse für die Bestimmung von Osteocalcin, einen Marker der Knochenmatrix-Synthese, zeigten signifikant erhöhte Werte in der Gruppe der Probanden mit Alzheimer-Demenz. In der Osteoporosegruppe konnte ein Trend zu höheren Werten verzeichnet werden. Auch in der Studie von Nilsson et al. wurde bei Patienten mit demenzieller Erkrankung ein Trend zu höheren Osteocalcinwerten festgestellt.

Die Ergebnisse für Cross Laps und Osteocalcin zeigen zusammen genommen einen erhöhten Knochen-Katabolismus sowie ein gleichzeitig bestehendes Knochen-Remodeling (Anabolismus) bei Patienten mit Alzheimer-Erkrankung, jedoch nicht bei Probanden mit Mild Cognitive Impairment. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Berichte über die Assoziation von Alzheimer-Demenz oder beginnender Alzheimer-Demenz mit verminderter, radiologisch gemessener Knochendichte (Johansson und Skoog 1996, Sato et al. 1998, Tan et al. 2005). Zwei prospektive Studien mit sehr großen Probandenzahlen und langen follow-ups beschrieben darüber hinaus die Assoziation von kognitivem Abbau bei zuvor gesunden älteren Frauen mit der Abnahme der Knochendichte (Yaffe et al. 1999, Lui et al. 2003). In der vorliegenden Untersuchung konnten bei den Probanden mit Mild Cognitive Impairment hingegen keine signifikanten Veränderungen der Plasmakonzentrationen von Cross Laps und Osteocalcin gegenüber der Kontrollgruppe entdeckt werden. Es ist also anzunehmen, dass die Pathomechanismen, welche letztendlich zu einer Veränderung des Knochenmetabolismus führen, erst mit einem Fortschreiten der Pathophysiologie der Alzheimer-Demenz zum Tragen kommen und zu klinisch relevanten Veränderungen von Biomarkern des Knochenstoffwechsels führen. Aufgrund der Tatsache, dass in den oben genannten Studien im Gegensatz zur vorliegenden Studie nur Frauen untersucht wurden, besteht auch die Möglichkeit, dass die Komorbidität von MCI und subklinischer

Osteoporose geschlechtsdifferent nur bei Frauen vorkommt. Jedoch konnte auch in der geschlechtsspezifischen Darstellung von Abb. 3.2 und 3.4 der Biomarkerkonzentrationen kein Trend zu höheren Werten bei Frauen mit MCI aufgezeigt werden. Methodisch muss in Betracht gezogen werden, dass die klinischen Endpunkte „kognitiver Abbau— und Mild Cognitive Impairment nicht deckungsgleich sind.

In der vorliegenden Studie wurden alle Studienteilnehmer nach potentiellen Störfaktoren, wie Bewegungsmangel und Mangelernährung, befragt, zudem beinhaltete die Gruppe der an Alzheimer-Demenz erkrankten Probanden lediglich Probanden mit leichtgradiger Alzheimer-Demenz. Daher sprechen die Ergebnisse der Studie für Ursachen der Komorbidität der beiden Erkrankungen jenseits von Immobilität und sekundärer Hypovitaminose. Hierbei könnte es sich um eine die beiden Erkrankungen verbindende molekulare Pathologie handeln, die bereits in frühen Krankheitsstadien von Relevanz ist.

In diesem Zusammenhang ist insbesondere die Untersuchung der Osteoprotegerinspiegel von Interesse, da dieser lösliche Fangrezeptor (decoy receptor) eine wichtige Rolle bei RANKL/RANK und TRAIL assoziierten Vorgängen spielt, welche die Zelldifferenzierung oder den Zelluntergang in verschiedenen Organsystemen beeinflussen (siehe Abb 4.1). Knochenerkrankungen, maligne Erkrankungen und erbliche Skeletterkrankungen stehen pathogenetisch in engem Zusammenhang mit dem Osteoprotegerin/RANKL/RANK System (Hofbauer und Schoppet 2004). Dysregulationen des Osteoprotegerin/TRAIL Systems sind insbesondere mit malignen Erkrankungen assoziiert, auch mit malignen Gliomen (Naumann et al. 2004).

Eine Untersuchung an weiblichen Probanden ergab, dass mit dem Alter die Serumkonzentrationen für Osteoprotegerin steigen. Die Konzentrationen für RANKL verhalten sich entgegengesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass postmenopausale Frauen höhere Osteoprotegerinwerte aufwiesen als prämenopausale Frauen. Man wertete dies als Kompensationsmechanismus gegen den gesteigerten Knochenabbau des fortgeschrittenen Lebensalters (Liu et al., 2004). Emanuele et al. (2004) untersuchten die Spiegel von Osteoprotegerin im Plasma von Probanden mit vaskulärer Demenz und verglichen diese mit den Werten von Probanden mit Alzheimer-Demenz

sowie einer Kontrollgruppe gleichen Alters. Es zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Werte bei vaskulärer Demenz und eine signifikant geringere Erhöhung bei Probanden mit Alzheimer-Demenz im Vergleich zu den Kontrollen. Es wurde angenommen, dass diese Unterschiede auf die arteriosklerotische Grunderkrankung der vaskulären Demenz zurückzuführen sind, da Osteoprotegerin wahrscheinlich als kompensatorischer endothelschützender Faktor bei progredienten arteriosklerotischen Erkrankungen ansteigt (Schoppet et al. 2002; Corallini et al., 2008). Bei Alzheimer-Demenz scheint hingegen eine kompensatorische Erhöhung der Osteoprotegerinkonzentration in diesem Umfang nicht aufzutreten, wie es durch die Studie von Emanuele et al. und durch die eigenen Daten nahegelegt wird. Dadurch könnten zellapoptotische Prozesse, die die Progredienz der Demenzerkrankung begünstigen, ungehinderter ablaufen.

Der zellprotektive Effekt von Osteoprotegerin könnte Östrogen-vermittelt sein, denn es konnte bei in vitro Versuchen gezeigt werden, dass unter Einfluss von Östrogenen in menschlichen Osteoblasten vermehrt Osteoprotegerin kodierende mRNA exprimiert und mehr Osteoprotegerin gebildet wird (Hofbauer et al., 1999).

In weiteren Versuchen wurde der Effekt von Androgenen auf die Osteoprotegerinbildung untersucht. So konnte gezeigt werden, dass osteoblastenartige Zellen in vitro bei Zugabe von 5-alpha-Dihydrotestosteron weniger Osteoprotegerin-mRNA exprimierten und folglich auch weniger Osteoprotegerin bildeten. Dieser Effekt konnte durch die Zugabe von Androgenrezeptor-Antagonisten aufgehoben werden. Dies wurde als Zeichen dafür gewertet, dass die Effekte direkt durch den Androgenrezeptor vermittelt werden (Hofbauer et al., 2002). Insofern scheinen die Effekte männlicher versus weiblicher Sexualsteroiden hier gegenläufig zu sein. Bei Zugabe von Glukokortikoiden wurde ersichtlich, dass die Osteoprotegerinwirkung inhibiert und die RANKL Synthese in den Zellen stimuliert wird, so dass die Osteoklastogenese und somit die Knochenresorption gefördert wird (Hofbauer et al., 1999).

Kahl et al. (2005) untersuchten in ihrer bereits oben genannten Studie neben Markern des Knochenstoffwechsels auch Osteoprotegerin bei Patientinnen mit emotional-instabiler Persönlichkeitsstörung vom Borderline Typus und Depression. Hier wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede bei Patientinnen mit Borderline-Störung sowie mit Borderline-Störung und komorbider Depression vs. gesunden Kontrollprobandinnen gefunden (Kahl et al. 2005). Dies legt nahe, dass Osteoprotegerin bei den genannten

Erkrankungen keine entscheidende pathogenetische Rolle spielt. Es handelt sich bei der Depression und der Borderline-Persönlichkeitsstörung letztlich auch nicht um degenerative oder primär arteriosklerotisch bedingte Erkrankungen.

Uberti et al (2004) konnten zeigen, dass TRAIL in den Gehirnen von an Alzheimer-Demenz erkrankten Patienten exprimiert wird. Es zeigten sich höhere Konzentrationen von TRAIL in den betroffenen Regionen des cerebralen Cortex insbesondere nahe der kongophilinen amyloiden Plaques. Dies könnte darauf hindeuten, dass TRAIL eine maßgebliche pathophysiologische Rolle in neuronalem Gewebe bei degenerativen Erkrankungen mit Amyloidose und Zellapoptose spielt.

Wie bereits erwähnt, konnte in der hier vorliegenden Studie anders als bei Nilsson et al. keine signifikante Veränderung der Plasmaspiegel von Osteoprotegerin bei Probanden mit Alzheimer-Erkrankung gefunden werden. Jedoch könnte dieser negative Befund aufgrund der relativ geringen Größe unserer Stichprobe auch falsch negativ sein. Auf der anderen Seite konnten trotz limitierter Probandenzahl die Ergebnisse von Emanuele et al. bzgl. höherer Osteoprotegerinspiegel bei weiblichem Geschlecht und fortgeschrittenem Lebensalter (siehe Abb. 3.6, Abb 3.10 sowie Tab. 3.3) bestätigt werden. In jedem Fall schließt unser negatives Ergebnis nicht aus, dass andere Anteile der Ostoprotegerin/RANKL/RANK- und Osteoprotegerin/TRAIL-Systeme im Rahmen der Pathophysiologie der Alzheimer-Demenz beeinflusst werden. Zusätzlich muss in Betracht gezogen werden, dass der Osteoprotegerinspiegel im Blut hauptsächlich durch den Knochenstoffwechsel beeinflusst sein könnte, während sich ZNS-Effekte möglicherweise nicht ausreichend in den Plasmaspiegeln abbilden lassen, sondern eher zu veränderten Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis führen könnten. In diesem Zusammenhang könnten weitere Untersuchungen, insbesondere des Liquor (vgl. Hofbauer et al. 2004), von hohem Interesse sein.

In der Zusammenschau konnten in der vorliegenden Studie bei Probanden mit leichtgradiger Alzheimer-Erkrankung auf der Ebene von Biomarkern weitere Anhaltspunkte für eine Erhöhung der Knochenresorption auf der einen Seite sowie für Knochenumbau und Knochenaufbau auf der anderen Seite aufgezeigt werden, welche jedoch nicht in Zusammenhang mit Immobilität oder einem Mangel an Vitamin D stehen

und sich nicht in klinischen Osteoporosesymptomen äußern. Ob dies der Beginn einer sich später klinisch manifestierenden Osteoporose ist, wäre in follow-up Studien zu untersuchen. Gegebenenfalls sind aufgrund gemeinsamer Pathomechanismen von Alzheimer-Demenz und Osteoporose auch zelldegenerative Prozesse am Knochen wirksam, die nicht den Grad einer manifesten Osteoporose erreichen, wenn nicht zusätzliche krankheitsfördernde Faktoren (z.B. Vitamin-D-Mangel) hinzukommen. Hinsichtlich des Osteoprotegerins, welches bereits frühzeitig ein wesentlicher Faktor in der Pathologie der Osteoporose ist und auch für die Alzheimer-Demenz pathogenetisch relevant sein könnte, konnten im Blut keine signifikanten Veränderungen der Plasmaspiegel entdeckt werden.

Anders als in den meisten vorliegenden Komorbiditätsstudien zu Alzheimer-Demenz und Osteoporose wurden in der vorliegenden Studie Ergebnisse zu beiden Geschlechtern erhoben. In der Vergangenheit waren zumeist Studien an weiblichen Populationen durchgeführt worden. Die vorliegende Arbeit berücksichtigt mögliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern, indem alle Ergebnisse noch einmal geschlechtsspezifisch aufgetrennt wurden.

Die Untersuchung der Knochenstoffwechselmarker bei Patienten mit Mild Cognitive Impairment entsprechend den Diagnosekriterien von Petersen et al. (1999) zeigte für alle drei Marker keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Relevante Veränderungen des Knochenstoffwechsels scheinen also in diesem Risiko- bzw. Vorstadium der Alzheimer-Demenz nicht vorhanden zu sein. Es bleibt herauszufinden, wodurch solche Veränderungen im weiteren Pathogeneseverlauf getriggert werden könnten. Auch in diesem Zusammenhang ist eine Untersuchung von Osteoprotegerin im Liquor wünschenswert und weiter zielführend.

Die vorliegende Studie ist durch relativ niedrige Probandenzahlen in der Osteoporose- und Gesundengruppe in ihrer Aussagekraft limitiert. Auf der anderen Seite erfolgte die Einteilung in die diagnostischen Gruppen nach differenzierten und standardisierten Auswahlkriterien, so dass eine valide diagnostische Trennung der Probandenkollektive angenommen werden konnte. Zudem korrespondieren die bei Osteoporose und bei Gesunden erhobenen Ergebnisse mit der vorbekannten Studienlage.

Weitere Studien, welche Osteoprotegerin sowie weitere Anteile des Osteoprotegerin/RANKL/TRAIL Systems in Zusammenhang mit Alzheimer-Demenz

untersuchen und andere Körperkompartimente (z.B. den Liquor cerebrospinalis) mit einbeziehen, könnten entscheidende Ergebnisse bezüglich seiner pathogenetischen Rolle aufdecken und weitere mechanistische Hinweise auf die Komorbidität mit Osteoporose liefern.

## 5. Danksagung

Diese Zeilen sollen genutzt werden, um denjenigen zu danken, die maßgeblich an dem „Projekt Doktorarbeit–beteiligt waren.

In erster Linie gilt mein Dank natürlich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Christian Luckhaus, der mit Zielstrebigkeit und Ideenreichtum die Verwirklichung der Arbeit möglich gemacht hat. Herzlichen Dank für die beständige Unterstützung, für Ratschläge, Diskussionen und Ihre fortwährende Ausdauer.

Danke an Herrn Prof. Dr. med. Tillmann Supprian aus der Abteilung für Gerontopsychiatrie für die Unterstützung des Projekts.

Vielen Dank an Herrn PD Dr. med. Holger Willenberg in der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie sowie Herrn Prof. Dr. med. Marcus Jäger aus der Klinik für Orthopädie für die Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Probandenauswahl.

Ein großer Dank gilt Frau Dr. Karin Fehsel im Forschungslabor Neurobiochemie des LVR-Klinikum Düsseldorf für die tolle Betreuung im Rahmen der praktischen Arbeiten sowie die ständige Möglichkeit zur Psychohygiene.

Vielen Dank an Heike Denck für die tolle Zeit im Labor der Orthopädischen Klinik. Irgendwann werden wir mit den „top-secret Zellen— auch groß rauskommen.

Ein großes Dankeschön an meine Eltern und meine Schwester deren Beharrlichkeit in so manchem Moment all zu große Dekompensationen zu verhindern wusste.

Vielen Dank an alle lieben Freunde für ihre Unterstützung und unermüdliches Korrekturlesen.

## 6. Literatur

Banks E, Beral V, Reeves G (2004) Fracture incidence in the relation to the pattern of use of hormone therapy in postmenopausal women. *JAMA* 291(18):2212-2220

Barrett-Connor E, Kritzer-Silverstein D (1993) Estrogen replacement therapy and cognitive function in older women. *JAMA* 269(20):2637-2641

Bartl R (2004) Osteoporose Prävention – Diagnostik – Therapie. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart

Behl C (2001) Estrogen – Mystery Drug for the Brain?: The Neuroprotective Activities of Female Sex Hormone. Springer Vienna

Bhattoa HP, Bettembuk P, Balogh A et al. (2004) The effect of 1-year transdermal estrogen replacement therapy on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in osteopenic postmenopausal systemic lupus erythematosus patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Osteoporos Int* 15(5):396-404

Binder EF, Schlechtmann KB, Birge SJ et al. (2001) Effects of hormone replacement therapy on cognitive performance in elderly women. *Maturitas* 38(2):137-146

Boada M, Anuntez C, López-Arrieta J (2012) Estrogen receptor alpha gene variants are associated with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33(1):198.e15-24

Bösel J, Endres M (2006) Direct neuronal effects of statins. *Nervenarzt* 77(3):289-90

Bu DX, Griffin G, Lichtmann AH (2011) Mechanisms for the antiinflammatory effects of statins. *Curr Opin Lipidol* 22(3):165-170

Chen SY, Chen TF, Lai LC et al. (2012) Sequence variants of interleukin 6 (IL-6) are significantly associated with a decreased risk of late onset Alzheimer's disease *J Neuroinflammation* 24;9:21

Christgau S, Bitsch-Jensen O, Bjarnason HN et al. (2000) Serum CrossLaps for monitoring the response in individuals undergoing antiresorptive therapy. *Bone* 26:505–511

Contestabile A (2011) The history of the cholinergic hypothesis. *Behav Brain Res* 221(2):334-340

Corallini F, Rimondi E, Secchiero P et al. (2008): TRAIL and osteoprotegerin: a role in endothelial physiopathology. *Front Biosci* 13: 135-147

Coyle JT, Price DL, DeLong MR et al. (1983) Alzheimer's disease: A disorder of cortical cholinergic innervations. *Science* 219(4589):1184-1190

Currò M, Marini H, Alibrandi A et al. (2011) The ESR2 AluI gene polymorphism is associated with bone mineral density in postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127(3-5): 413-417

Czerny B, Kaminski A, Kurzawski M et al. (2010) The association of IL-1beta, IL-2 and IL-6 gene polymorphisms with bone mineral density and osteoporosis in postmenopausal women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 149(1):82-85

Dai L, Liu D, Guo H et al. (2012) Association between polymorphism in the promoter region of Interleukin 6 (-174 G/C) and risk of Alzheimer's disease. *J Neurol* 259(3):414-419

Davignon J, Mabile L (2001) Mechanisms of action of statins and their pleiotropic effects. *Ann Endocrinol (Paris)* 62(1 Pt 2):101-12

Durusu Tanriover M, Bora Tatar G, Uluturk TD et al. (2010) Evaluation of the effects of vitamin D receptor and estrogen receptor 1 gene polymorphisms on bone mineral density in postmenopausal women. *Clin Rheumatol* 29(11):1285-1293

Emanuele E, Peros E, Scioli GA et al. (2004) Plasma osteoprotegerin as a biochemical marker for vascular dementia and Alzheimer's disease. *Int J Mol Med* 13:849–853

Emery JG, Mc Donnell P, Burke MB et al. (1998) Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 273(23):14363-14367

Flyvbjerg A (2010) Diabetic angiopathy, the complement system and the tumor necrosis factor superfamily. *Nat Rev Endocrinol* 6(2):94-101

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12(3):189-198

Franceschi C, Bonafe M, Valensin S et al. (2000) Inflammaging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 908:244-354

Goumidi L, Dahlman-Wright K, Tapia-Paez I et al. (2011) Study of estrogen receptor- $\alpha$  and receptor- $\beta$  gene polymorphisms on Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 26(3):431-439

Gu Y, Luchsinger JA, Stern Y et al. (2010) Mediterranean diet, inflammatory and metabolic biomarkers, and risk of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 22(2):483-492

Härting C, Markowitsch HJ, Neufeld H et al. (eds) (2000) WMS-R Wechsler Gedächtnistest—revidierte Fassung. Deutsche Adaption der Wechsler Memory Scale. Verlag Hans Huber, Bern

Hofbauer LC, Schoppet M (2004) Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 292:490–495

Hofbauer LC, Cepok S, Hemmer B (2004) Osteoprotegerin is highly expressed in the spinal cord and cerebrospinal fluid. *Acta Neuropathol* 107(6):575-577

Hofbauer LC, Hicok KC, Chen D et al. (2002) Regulation of osteoprotegerin production by androgens and anti-androgens in human osteoblastic lineage cells. *Eur J Endocrinol* 147(2):269-273

Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL et al. (1999) Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 140(10):4382-4389

Hogervorst E, Yaffe K, Richards M et al. (2009) Hormone replacement therapy to maintain cognitive function in women with dementia. *Cochrane Database Syst Rev* (1):CD003799

Ihl R, Grass-Kapanke B (2000) Manual—Test zur Früherkennung von Demenzen mit Depressionsabgrenzung. Libri Books on Demand, Hamburg

Iwamoto J, Sato Y, Takeda T et al. (2010) Effectiveness of exercise in the treatment of lumbar spinal stenosis, knee osteoarthritis, and osteoporosis. *Aging Clin Exp Res* 22(2):116-122

Jacobs DM, Tang MX, Stern Y et al. (1998) Cognitive function in nondemented older women who took estrogen after menopause. *Neurology* 50(2):368-373

Johansson C, Skoog I (1996) A population-based study on the association between dementia and hip fractures in 85-year olds. *Aging (Milano)* 8:189–196

Kahl KG, Greggersen W, Rudolf S et al. (2006) Bone mineral density, bone turnover, and osteoprotegerin in depressed women with and without borderline personality disorder. *Psychosomat Med* 68:669–674

Kipen E, Helme RD, Wark JD et al. (1995) Bone density, vitamin D nutrition, and parathyroid hormone levels in women with dementia. *J Am Geriatr Soc* 43:1088–1091

Lee DY, Na DL, Seo SW et al. (2012) Association between cognitive impairment and bone mineral density in postmenopausal women. *Menopause* 19(6):636-641

Leib ES, Lewiecki EM, Binkley N et al. (2004) Official positions of the International Society for Clinical Densitometry. *J Clin Densitom* 7(1):1-6

Li Y, Xi B, Li K (2012) Association between vitamin d receptor polymorphisms and bone

mineral density in Chinese women. *Mol Biol Rep* 39(5):5709-5717

Liu JM, Zhao HY, Ning G et al. (2004) Relationships between the changes of serum levels of OPG and RANKL with age, menopause, bone biochemical markers and bone mineral density in Chinese women aged 20-75. *Calcif Tissue Int* 76(1):1-6

Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni et al. (2000) Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54(11Suppl5):4-9

Loskutova N, Honea RA, Brooks WM et al. (2010) Reduced limbic and hypothalamic volumes correlate with bone density in early Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 20(1):313-322

Luckhaus C, Mahabadi B, Grass-Kapanke B et al. (2009) Blood biomarkers of osteoporosis in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 116:905-911

Lui LY, Stone K, Cauley JA et al. (2003) Bone loss predicts subsequent cognitive decline in older women: the study of osteoporotic fractures. *J Am Geriatr Soc* 51:38-43

Maki PM, Resnick SM (2000) Longitudinal effects of estrogen replacement therapy on PET cerebral blood flow and cognition. *Neurobiol Aging* 21(2):373-383

McKenna MJ, Freaney R (1998) Secondary hyperparathyroidism in the elderly; means to defining hypovitaminosis D. *Osteoporos Int* 8(Suppl):S3-S6

McKhann G, Drachman D, Folstein M et al. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 34:939-944

Mitsios JV, Papathanasiou AI, Goudevenos JA et al. (2010) The antiplatelet and antithrombotic actions of statins. *Curr Pharm Des* 16(34):3808-3814

Musicco M (2009) Gender differences in the occurrence of Alzheimer's disease. *Funct Neurol* 24(2):89-92

Nagy Z, Hindley NJ, Braak H et al. (1999) Relationship between clinical and radiological diagnostic criteria for Alzheimer's disease and the extent of neuropathology as reflected by "stages": a prospective study. *Dement Geriatr Cogn Disord* 10(2):109-114

Naumann U, Wick W, Beschorner R et al. (2004) Expression and functional activity of osteoprotegerin in human malignant gliomas. *Acta Neuropathol* 107(1):17-22

Nichol KE, Parachikova AI, Cotman CW (2007) Three weeks of running wheel exposure improves cognitive performance in the aged Tg2576 mouse. *Behav Brain Res* 184(2):124-132

Nilsson K, Gustafson L, Isaksson A et al. (2005) Plasma homocysteine and markers of bone metabolism in psychogeriatric patients. *Scand J Clin Lab Invest* 65(8):671-680

Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H et al. (2001) Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 287(2):337-342

Ohnaka K, Takayanagi R (2009) Biochemical markers of bone turnover. New aspect. Effects of androgen and estrogen on biochemical markers of bone turnover. *Clin Calcium* 19(8):1118-1124

Ovesen L, Andersen R, Jakobsen J (2003) Geographical differences in vitamin D status, with particular reference to European countries. *Proc Nutr Soc* 62:813–821

Pac-Soo C, Lloyd DG, Vizcaychipi MP et al. (2011) Statins: the role in the treatment of Alzheimer's neurodegeneration. *J Alzheimer's Dis* 27(1):1-10

Pedersen TR, Kjekshus J (2000) Statin drugs and the risk of fracture. 4S Study Group. *JAMA* 284(15):1921-1922

Peters BS, Martini LA (2010) Nutritional aspects of the prevention and treatment of osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 54(2):179-185

Petersen RC, Smith GE, Waring SC et al. (1999) Mild cognitive impairment. Clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 56:303–308

Pigozzi F, Rizzo M, Giombini A et al. (2009) Bone mineral density and sport: effect of physical activity. *J Sports Med Phys Fitness* 49(2):177-183

Polo-Kantola P, Portin R, Polo O et al. (1998) The effect of short-term estrogen replacement therapy on cognition: a randomized, double-blind, cross-over trial in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 178(5):1002-1009

Popp AW, Bodmer C, Senn C et al. (2006) Prevention of postmenopausal bone loss with long-cycle hormone replacement therapy. *Maturitas* 53(2):191-200

Potter H, Wisniewski T (2012) Apolipoprotein E: Essential Catalyst of the Alzheimer Amyloid Cascade. *Int J Alzheimers Dis* 2012:489428 doi: 10.1155/2012/489428

Ransmayr G (2003) Cholesterol and statins in Alzheimer disease. *Wien med Wochenschr* 153(11-12):258-259

Rapp SR, Legault C, Shumaker SA et al. (2003) Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA* 289(20):2651-2662

- Reitan RM (1979) Trail Making Test (TMT). Hogrefe Verlag, Bern
- Resnick SM, Maki PM, Golski S et al. (1998) Effects of estrogen replacement therapy on PET cerebral blood flow and neuropsychological performance. *Horm Behav* 34(2):171-182
- Riekse RG, Li G, Petrie EC et al. (2006) Effects of statins on Alzheimer's disease biomarkers in cerebrospinal fluid. *J Alzheimer's Dis* 10(4):399-406
- Ryan J, Scali J, Carriere I et al. (2008) Hormonal treatment, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr* 20(1):47-56
- Sato Y, Asoh T, Oizumi K (1998) High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in elderly women with Alzheimer's disease. *Bone* 23:555-557
- Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC (2002) RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:549-553
- Seifert-Klauss V, Laakmann J, Rattenhuber J et al. (2005) Bone metabolism, bone density and estrogen levels in perimenopause: a prospective 2-year-study. *Zentralbl Gynäkol* 127(3):132-139
- Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Mrzikiewicz PM et al. (2009) Correlation of Vitamin D receptor gene (VDR) polymorphism with osteoporotic changes in Polish postmenopausal women. *Neuro Endocrinol Lett* 30(4):540-546
- Shulman KI (2000) Clock-drawing: is it the ideal cognitive screening test? *Int J Geriatr Psychiatry* 15:548-561
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR et al. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89(2):309-319
- Sofi F, Abbate R, Gensini GF et al. (2010) Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 92(5):1189-1196
- Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA et al. (2010) Genome-wide Analysis of Genetic Loci Associated with Alzheimer's Disease. *JAMA* 303(18):1832-1840
- Supprian T (2010) Frühdiagnostik von Demenzerkrankungen: Diagnostische Verfahren, Frühsymptome, Beratung. Kohlhammer Verlag Stuttgart
- Tan ZS, Seshadri S, Beiser A et al. (2005) Bone mineral density and the risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 62:107-111

Thalmann B, Monsch AU, Bernasconi F et al. (1998) Die CERAD Neuropsychologische Testbatterie—Ein gemeinsames minimales Instrumentarium zur Demenzabklärung. Memory Clinic, Geriatriische Universitätsklinik, Helbelstraße 10, CH-4031 Basel

Uberti D, Cantarella G, Facchetti F et al. (2004) TRAIL is expressed in the brain cells of Alzheimer's disease patients. *Neuroreport* 15:579–581

Vandenput L, Ohlsson C (2009) Estrogens as regulators of bone health in men. *Nat Rev Endocrinol* 5(8):437-434

Waldmann A, Kritharides L (2003) The pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors: their role in osteoporosis and dementia. *Drugs* 63(2):139-152

Wang M, Song H, Jia J (2010) Interleukin-6 receptor gene polymorphisms were associated with sporadic Alzheimer's disease in Chinese Han. *Brain Res* 1327:1-5

Wildner M, Clark DE (2001) Hip fracture incidence in east and west germany: reassessment ten years after unification. *Osteoporos Int* 12(2):136-139

Xin XY, Ding JQ, Chen SD (2010) Apolipoprotein E Promoter Polymorphisms and Risk of Alzheimer's Disease: Evidence From Meta-Analysis. *Journal of Alzheimer's Disease* 19(4):1283-1294

Yaffe K, Browner W, Cauley J et al. (1999) Association between bone mineral density and cognitive decline in older women. *J Am Geriatr Soc* 47:1176–1182

Yoldemir T, Yavuz DG, Anik G et al. (2011) Vitamin D receptor gene polymorphisms in a group of postmenopausal Turkish women: association with bone mineral density. *Climacteric* 14(3):384-391

Zhang Y, Seshadri S, Ellison RC et al. (2001) Bone mineral density and verbal memory impairment: third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol* 154:795–802

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

05.11.2012, Bijan Mahabadi