

Journal für
Mineralstoffwechsel

Zeitschrift für Knochen- und Gelenkerkrankungen
Orthopädie • Osteologie • Rheumatologie

**Dosisabhängiger Anstieg von
Knochenformatinsmarkern in Serum
und Knochen unter
Zink-Supplementation - eine
Untersuchung an der erwachsenen
weiblichen Maus**

Dimai H-P, Farley J, Hall S, Leb G
Stilt-Coffing B

*Journal für Mineralstoffwechsel &
Muskuloskelettale Erkrankungen*
1998; 5 (4), 5-14

Homepage:

**[www.kup.at/
mineralstoffwechsel](http://www.kup.at/mineralstoffwechsel)**

**Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche**

Member of the



Indexed in SCOPUS/EMBASE/Excerpta Medica
www.kup.at/mineralstoffwechsel



Offizielles Organ der
Österreichischen Gesellschaft
zur Erforschung des Knochens
und Mineralstoffwechsels



Österreichische Gesellschaft
für Orthopädie und
Orthopädische Chirurgie



Österreichische
Gesellschaft
für Rheumatologie

Krause & Pachernegg GmbH · VERLAG für MEDIZIN und WIRTSCHAFT · A-3003 Gablitz

P. b. b. G 202 Z 031108 M, Verlagspostamt: 3002 Purkersdorf, Erscheinungsort: 3003 Gablitz

DOSISABHÄNGIGER ANSTIEG VON KNOCHENFORMATIONS-MARKERN IN SERUM UND KNOCHEN UNTER ZINK-SUPPLEMENTATION – EINE UNTERSUCHUNG AN DER ERWACHSENEN WEIBLICHEN MAUS

Summary

Zinc (Zn) is an essential trace element. It is required for a wide range of metabolic functions and normal bone growth and development. The current studies were intended to assess the effect of different doses of Zn on: a) serum and bone alkaline phosphatase (ALP), b) serum osteocalcin, c) tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in bone, and d) bone protein. Female adult Swiss-Webster mice were given 0, 1 x, 2 x, 3 x, 4 x, or 5 x normal dietary Zn for 2, 4, or 6 weeks. We found a positive correlation between dietary Zn and serum-ALP (4 and 6 weeks, $p < 0.001$), tibial ALP (2, 4, and 6 weeks, $p < 0.03$), and tibial protein (2, 4, and 6 weeks, $p < 0.001$). Furthermore, a negative correlation between dietary Zn and tibial

TRAP was found (2, 4, and 6 weeks, $p < 0.001$). Covariant analyses showed that serum ALP, tibial ALP, tibial protein, and tibial TRAP were affected by the dose of Zn ($p < 0.05$) and by the treatment time ($p < 0.03$). Zn also had a significant effect on serum osteocalcin ($p < 0.03$, at 2 x normal Zn). In a supplemental study, Zn increased ALP-activity and cell-layer protein, and decreased TRAP-activity in monolayer cultures of the murine osteoblastic cell line, MC3T3-E1. Together, these data indicate that incremental increases in dietary Zn are associated with ALP-activity in serum and bone. The effect of Zn to decrease TRAP activity in osteoblast-line cells precludes the interpretation of a Zn-dependent decrease in tibial TRAP-activity as evidence of decreased bone resorption.

und der Serum-ALP (4 und 6 Wochen, $p < 0,001$), der tibialen ALP (2, 4 und 6 Wochen, $p < 0,03$), sowie dem tibialen Protein (2,4 und 6 Wochen $p < 0.001$); weiters zeigte sich eine negative Korrelation zwischen Zn und tibialer TRAP (2, 4 und 6 Wochen, $p < 0,001$). Kovarianzanalysen zeigten überdies, daß die Aktivität der Serum-ALP, der tibialen ALP und der tibialen TRAP, sowie die Menge des tibialen Proteins sowohl durch die Zn-Dosis ($p < 0,005$), als auch die Dauer der Therapie ($p < 0,03$) beeinflussbar sind. Zn zeigte auch einen signifikanten Einfluß auf den Serum-Osteocalcin-Spiegel ($p < 0,03$ bei 3 x höher Zn-Menge als in der Normaldiät). In einer ergänzenden Studie zeigte sich auch, daß Zn zu einem dosisabhängigen Anstieg der ALP und des Proteins, und zu einem signifikanten Abfall der TRAP in murinen osteoblasten-ähnlichen MC3T3-E1 Zellen führt. Insgesamt kann aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie geschlossen werden, daß eine schrittweise Erhöhung des Zn-Gehaltes der Nahrung zu einem entsprechenden Anstieg der ALP-Aktivität von Serum und Knochen führt. Da in dieser Studie klar gezeigt werden konnte, daß Zn auch zu einem Abfall der TRAP-Aktivität in osteoblastenähnlichen Zellen führt, sollte künftighin ein Absinken der TRAP-Aktivität im Knochen nicht als Zeichen einer Knochenresorptions-Hemmung interpretiert werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Zink (Zn) ist ein essentielles Spurenelement. Es spielt eine wichtige Rolle in zahlreichen metabolischen Prozessen und wird auch für das normale Knochenwachstum benötigt.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, den Effekt von Zn auf a) die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) in Serum und Knochen, b) das Serum-Osteo-

calcin, c) die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) im Knochen, sowie d) den Proteingehalt des Knochens darzustellen. Erwachsene weibliche Swiss-Webster-Mäuse erhielten entweder eine Zn-freie Diät, oder eine Diät, welche einen normalen, oder einen 2-, 3-, 4-, oder 5-fach höheren Zn-Gehalt als die Normaldiät hatte. Die Diät wurde für 2, 4, oder 6 Wochen verabreicht. Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Menge des mit der Nahrung aufgenommenen Zn

EINLEITUNG

Zink (Zn) ist ein essentielles Spurenelement. Es spielt eine wichtige Rolle in zahlreichen metabolischen Prozessen und ist essentieller Co-Faktor für eine Reihe von Enzymen wie etwa der Alkohol-Dehydrogenase, der Carboanhydrase, dem Cytochrom C sowie der alkalischen Phosphatase (ALP) [1, 2]. Das Serum eines gesunden erwachsenen Menschen enthält normal 40–100 µg/L Zn, wovon wiederum ein Großteil an Eiweiß gebunden vorliegt. Der tägliche Zn-Bedarf wird auf etwa 10,1–11,5 mg pro Tag geschätzt. In der jüngeren Bevölkerung beträgt die mit der Nahrung durchschnittlich konsumierte Zn-Menge etwa 10–15 mg täglich, in einer älteren Population jedoch nur etwa 7–10 mg / Tag [3]. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß rund 40% aller Frauen über 65 Jahre erniedrigte Serum-Zn Spiegel aufweisen [4]. Zn-Mangel kann zu Wachstumsstörungen, Akrodermatitis, zentralnervösen Dysfunktionen, Haarausfall, und gestörter Wundheilung führen [3]. Akute Toxizität wurde bei einer Zufuhr von mehr als dem 50-fachen der Normaldosis, und chronische Toxizität bei längerer Zufuhr von mehr als dem 10–20-fachen der Normaldosis beobachtet.

Weiters konnte gezeigt werden, daß Zn für das normale Knochenwachstum benötigt wird [5–7]. Diesbezüglich führt ein Zn-Mangel zu einer Verminderung der Osteoblastenzahl im Rattenknochen [8], während in Kulturen mit osteoblastenähnlichen MC3T3-E1-Zellen eine Zn-Supplementation eine Zunahme der Zellzahl be-

wirkt [9]. Auch konnte gezeigt werden, daß Zn die Kollagen-Produktion und die ALP-Aktivität im Ratten-Femur *in vivo* [10] sowie in der Ratten-Calvaria *in vitro* steigert [11]. Auch konnte kürzlich demonstriert werden, daß Zn die Knochenresorption hemmen kann [12, 13]. Schließlich scheint die Ausscheidung von Zn im Harn osteoporotischer, postmenopausaler Frauen signifikant erhöht zu sein, sowie mit der Serum-Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) zu korrelieren [14].

In der vorliegenden Studie wurde nun insbesondere der Effekt von Zn auf ein osteoblastäres Enzym, nämlich die ALP, untersucht. Die Knochen-ALP zählt zur Gruppe der Metalloenzyme, welche zwei Moleküle Zn pro Enzym-Monomer enthalten [15]. Dieses enzymgebundene Zn ist essentiell für die Aktivität der ALP, und eine Entfernung des Zn aus dieser Bindung, z. B. durch Chelatbindung, resultiert in einem irreversiblen Verlust der ALP-Aktivität. In einer kürzlich durchgeführten Untersuchung konnten Farley et al. zeigen, daß Zn die Aktivität der ALP in humanen osteoblastenähnlichen Zellen (*in vitro*) durch Verlängerung der Halbwertszeit erhöhen kann [16]. Obwohl die biochemische Bedeutung der ALP noch nicht vollständig geklärt ist, so gibt es zumindest Hinweise darauf, daß dieses Enzym essentiell für die Knochen-Formation ist [17–19]. Außerdem konnte wiederholt gezeigt werden, daß die im Serum vorkommende ALP einen zuverlässigen Marker für das Ausmaß der Knochen-Formation darstellt [20, 21].

Anhand der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, ob der

in vitro beobachtete dosisabhängige Effekt von Zn auf die ALP-Aktivität humaner osteoblastenähnlicher Zellen auch *in vivo* beobachtet werden kann [16]. Zu diesem Zweck wurde die Beantwortung folgender 5 Fragen angestrebt:

1. Gibt es einen zeit- und/oder dosisabhängigen Effekt von Zn auf die ALP-Aktivität im Serum und/oder Knochen?
2. Ist der Effekt von Zn auf die ALP Isoenzym-spezifisch, d. h. betrifft er nur die Knochen-ALP oder auch die hepatische, intestinale, oder renale ALP-Aktivität?
3. Steht ein eventuell dosisabhängiger Effekt von Zn auf die ALP stellvertretend für eine Zunahme der Osteoblastenzahl und/oder -Aktivität?
4. Ist ein evtl. dosisabhängiger Anstieg der Knochen-ALP vergesellschaftet mit einem entsprechenden Abfall der Aktivität der TRAP, einem Marker der Knochenresorption [22–24]?
5. Für den Fall, daß die Aktivität der TRAP im Knochen mit zunehmender Zn-Menge in der Nahrung abnehmen würde: Läßt sich ein entsprechender Effekt auch an Osteoblastenzell-Kulturen darstellen? Wenn ja, so wäre das Absinken der TRAP-Aktivität im Knochen nicht mit einer Resorptionshemmung gleichzusetzen, da das Absinken dann offensichtlich auf ein Absinken der osteoblastären TRAP-Aktivität zurückzuführen wäre.

MATERIALIEN UND METHODEN

P-Nitrophenolphosphat (PNPP), Triton X-100 und fetales Rinderserum stammten von Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Die Petrischalen wurden von Corning (Corning, NY, USA), Trypsin-EDTA und Delbeccos Minimum Essential Medium (DMEM) von GIBCO (Grand Island, NY, USA) bezogen. Materialien für den Maus-Osteocalcin-Assay stammten von Biomedical Technologies, Inc. (Stoughton, MA, USA). Die MC3T3-E1 Zellen waren freundlicherweise von der Josai Dental University, Sakado (Saitama, Japan) zur Verfügung gestellt worden.

Mäuse und spezielle Diäten

Erwachsene weibliche Swiss-Webster Mäuse wurden von Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, IN, USA) bezogen. Die Zn-freie Diät (TD 85419) und die Kontroll Diäten (TD 85420) wurden in Pellet-Form von Harlan-Teklad (Madison, WI, USA) geliefert. Die Zn Kontroll-Diät war identisch mit der Zn-freien Diät mit Ausnahme von 0,0893 g Zn/kg und einem verminderten Zelluloseanteil von 29,9107 g/kg gegenüber 30,0 g/kg. Erwachsene Mäuse der von uns verwendeten Altersklasse konsumieren täglich etwa 5 g Futter und 6 ml Wasser. Daher wurde die durchschnittliche Zufuhr von Zn-Carbonat mit der Nahrung mit 0,45 mg/Maus/Tag angenommen. Dies entspricht einer täglichen Zufuhr von etwa 0,24 mg verfügbarem Zn/Maus/Tag. Diese Zn-Dosis wurde daher im Rahmen der vorliegenden Studie als normal angenommen.

Die Verwendung der Mäuse war durch das Animal Subjects Review Board des J.L. Pettis Memorial Veterans Medical Center genehmigt worden, und die Versuchstiere wurden in den speziell zu diesem Zweck adaptierten Räumlichkeiten des J.L. Pettis Memorial Veterans Medical Center gehalten.

Design der Studie 1

15 Gruppen (n = 8/Gruppe) erwachsener weiblicher Swiss-Webster Mäuse wurden verwendet, und zwar 3 Sets (entsprechend den Euthanasie-Zeitpunkten 2, 4, und 6 Wochen) zu je 5 Behandlungs-Gruppen (entsprechend dem unterschiedlichen Zn-Gehalt der verwendeten Nahrung). Die unterschiedlichen Behandlungsgruppen erhielten entweder: a) eine Zn-freie Diät (Harlan Teklad TD 85419), b) eine Zn-normale Diät (Harlan-Teklad TD 85420), welche ca. 0,24 mg verfügbares Zn/Maus/Tag liefert, c) eine Zn-normale Diät mit 116 mg Zn-Azetat/Liter Trinkwasser, was bei einem geschätzten Wasserkonsum von 6 ml/Maus/Tag einer zusätzlichen Menge von 0,24 mg Zn/Maus/Tag, oder einer 2-fach normalen Zn-Dosis entspricht, d) eine Zn-normale Diät mit 232 mg Zn/Liter Trinkwasser, entsprechend einer 3-fach normalen Zn-Dosis, oder e) eine Zn-normale Diät mit 349 mg Zn/Liter Trinkwasser, entsprechend einer 4-fach normalen Zn-Dosis. Die Tiere wurden in Plastik-Käfigen gehalten (4 Mäuse / Käfig, 2 Käfige pro Gruppe). Trinkwasser wurde mit 100 ml Fläschchen bereitgestellt, und der Wasserverbrauch pro Käfig wurde alle 3–5 Tage kontrolliert. Hinsichtlich des Wasserkonsums konnten keine

quantitativen Unterschiede zwischen den einzelnen Käfigen festgestellt werden. Die Mäuse wogen durchschnittlich 26,5 g zu Beginn der Untersuchung, und 30,1 g nach 6 Wochen. Es gab keine signifikanten Gewichtsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Um sowohl einen zeit- als auch dosisabhängigen Effekt darstellen zu können, wurde jeweils eine bestimmte Gruppe (n = 8) aus den 5 Diät-Regimen nach 2, 4, bzw. 6 Wochen euthanasiert. Die jeweiligen Sera wurden zur Bestimmung der ALP gewonnen. Um Interassay-Varianzen zu vermeiden, wurden aliquote Serumanteile bei -20°C gelagert und anschließend in einem ausgewertet. Unmittelbar nach der Euthanasie wurden jeweils die Calvaria sowie eine Tibia entfernt und zur Bestimmung von Proteingehalt und Enzym-Aktivität weiterverarbeitet (wie unten beschrieben). Die hintere Extremität der anderen Seite wurde entfernt und bei -20°C gelagert, um nach Abschluß des Experimentes daraus ebenfalls die Tibiae zu entfernen und in einem weiterzuverarbeiten (zur Vermeidung von Interassay-Varianzen). Um die Isoenzym-Spezifität der ALP zu demonstrieren, wurden in der 6-Wochen Gruppe auch vergleichbare Anteile von Leber, Niere, und Dünndarm gewonnen.

Design der Studie 2

In einer zweiten Studie erhielten 6 Gruppen von Mäusen eine Zn-freie Diät, eine Zn-normale Diät, oder eine 2-, 3-, 4-, oder 5-fache Zn-Dosis für insgesamt 4 Wochen (n = 8 Mäuse/Gruppe außer in der 0-Zn Gruppe mit n = 11). Zn wurde mittels Futter bzw. Trink-

wasser wie bereits für Studie 1 näher beschrieben zur Verfügung gestellt. Sera und Knochen wurden zur Bestimmung von Serum-ALP, Calvaria-ALP, Tibia-ALP und Tibia-TRAP Aktivität weiterverarbeitet. Zusätzlich wurde das Serum-Osteocalcin mittels kommerziellem RIA gemessen. Das Gewicht der Mäuse in dieser Studie betrug 23,5 g zu Beginn und 28,3 g am Ende der Studie. Es gab hinsichtlich des Gewichtes keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

MC3T3-E1 Zellen

Die Zellen wurden in 24-Loch Kultur-Schalen gezüchtet, und zwar in DMEM und 10%-igem fetalen Rinderserum, und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Diese Kulturen waren homogen und enthielten keine Zellen der Monozyten/Makrophagen Linie. Um kontaminierendes Serum zu entfernen, wurden die Zellen nach 24 Stunden zweimal mit Serum-freiem DMEM gespült und anschließend in Serum-freiem DMEM (0,5 mL/Vertiefung) für 48 Stunden inkubiert, wobei 8 verschiedene Zn-Konzentrationen (nämlich 0/0,03/0,1/0,3/1/3/10 bzw. 30 mmol Zn/L) verwendet wurden. Für jede dieser Konzentrationen wurden 6 Kulturen verwendet. Die Zellen wurden mit phosphate-buffered-saline (PBS) gespült und in jeweils 0,25 ml 0,01%-igem Triton X-100 extrahiert. In jedem Extrakt wurden die Protein-Konzentration [25], sowie die ALP und die TRAP-Aktivität gemessen.

Biochemie

Die Knochen bzw. Gewebstücke wurden über Nacht in PBS bei

4°C von kontaminierendem Serum gereinigt (1,5 ml für Calvariae und Tibiae, 3 ml für die übrigen Organe). Anschließend erfolgte die Extraktion mittels Triton X-100 über 72 h. Um unlösliches Material zu entfernen, wurde das Extrakt anschließend noch zentrifugiert (15 min bei 1500 g). Die ALP-Aktivität wurde in allen Extrakten bestimmt, die Aktivität der TRAP jedoch nur im Knochen-Extrakt. Die Tibiae sowie Calvariae wurden nach erfolgter Extraktion in 70%-igen Ethanol (1 ml/Knochen) transferiert, für 24 h bei 37°C inkubiert, danach aus dem Ethanol entfernt und für 18 h bei 37°C getrocknet. Anschließend wurde das Trockengewicht der einzelnen Knochen gemessen (Cahn Microbalance Model 7500, Cahn Instruments, Ceritos, CA, USA).

Die ALP-Aktivität wurde mittels Bildung von PNP (p-Nitrophenolat, welches Licht bei 405 nm absorbiert) aus PNPP (p-Nitrophenolphosphat) bestimmt [26, 27]. Dabei wurden jeweils 5 ml Serum bzw. 25 ml Gewebsextrakt in einem Gesamtvolumen von 0,3 ml eines Cocktails inkubiert, welcher bei einem pH von 10,3 10 mmol/L PNPP sowie 1 mmol/L MgCl₂ in 150 mmol/L Karbonat-Puffer enthielt (für die Serum-Proben waren zusätzlich 10 mmol/L Phenylalanin hinzugefügt worden, um die intestinale ALP zu hemmen). Für diese Untersuchung wurden 96-Loch Mikrotiterplatten verwendet. Jede Probe wurde doppelt bestimmt. Die Reaktion wurde jeweils durch Zugabe des Substrates gestartet, und die zeitabhängige Zunahme der Absorption bei 405 nm wurde mittels Spectrophotometer (EAR 400/300 AT, Labinstruments, Wien, Austria) gemessen. Die ALP-Aktivität im Serum wurde als U/L

berechnet, die ALP-Aktivität im Knochen als mU/mg Protein, oder als mU/mg Trockengewicht, wobei 1 U als 1 mmol Reaktionsprodukt gebildet/Minute definiert ist.

Die TRAP-Aktivität wurde ebenfalls mittels Hydrolyse von PNPP bestimmt. Dabei wurden jeweils 10 ml Probe (z. B. Gewebsextrakt) in 0,2 ml einer Lösung inkubiert, welche 10 mmol/L PNPP, 80 mmol/L Tartrat und 100 mmol/L Azetat-Buffer (pH 5,5) enthielt. Die Reaktionslösungen wurden in den einzelnen Vertiefungen von 96-Loch Mikrotiter-Platten bei 37°C über 60 min inkubiert. Die Aktivität der gesamten sauren Phosphatase (d. h. ohne Tartrat) wurde parallel dazu als Kontrolle inkubiert. Die Reaktion wurde jeweils durch Zugabe von 0,1 ml einer 0,1 normalen NaOH Lösung gestoppt und unmittelbar danach die spektrophotometrische Messung durchgeführt. Die TRAP-Aktivität wurde als µU/mg Trockengewicht des Knochens und als µU/mg Zellprotein berechnet, wobei 1 U als 1 µmol Reaktionsprodukt gebildet/Minute definiert ist.

Statistische Methoden

Die Daten wurden als Mittelwert ± mittlere Standardabweichung (mean ± SEM) angegeben. Die analytischen Methoden umfaßten Ein- und Zweiweg Varianzanalysen (ANOVA), lineare Regressionen, und Pearson Korrelationen. Die Berechnung erfolgte auf einem IBM-kompatiblen PC unter Verwendung einer Systat-Software (Systat Inc, Evanston, IL, USA). Die Korrelationen wurden entweder für die Einzelwerte oder die Mittelwerte der einzelnen Gruppen berechnet.

Tabelle 1: Pearson-Korrelationen zwischen Zn-Menge in der Nahrung und den angegebenen Parametern nach 2 (n = 37), 4 (n = 39), und 6 Wochen (n = 44). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,002$; *** = $p < 0,001$. Tg = Trockengewicht.

Studie #1: Korrelationen nach 2, 4, bzw. 6 Wochen				
Parameter	Einheit	Korrelations-Koeffizient		
		2 Wochen	4 Wochen	6 Wochen
Serum-ALP	U/L	0,314	0,591***	0,629***
Tibia ALP/Tg	mU/mg	0,386*	0,589***	0,342*
Calvaria ALP/Tg	mU/mg	-0,338*	0,291	0,040
Tibia Protein/Tg	mg/mg	0,774***	0,580***	0,536***
Tibia TRAP/Tg	mU/mg	-0,498**	-0,713***	-0,513***

RESULTATE

Die Resultate der ersten Studie sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Nach 2-wöchiger Behandlung zeigte sich deutlich, daß die Menge des mit der Nahrung zugeführten

Zn mit der ALP-Aktivität in Calvaria und Tibia, sowie mit dem Proteingehalt der Tibia korreliert. Außerdem korrelierte die TRAP-Aktivität der Tibiae negativ mit dem Zn-Gehalt der Nahrung. Ein Vergleich der Mittelwerte einzelner Gruppen (mittels ANOVA)

zeigte einen signifikanten, Zn-abhängigen Anstieg des tibialen Proteins in der Gruppe der 3- und 4-fach höheren Zn-Dosis (jeweils $p < 0,005$), sowie einen signifikanten Abfall der tibialen TRAP in der Gruppe der 4-fach höheren Zn-Dosis.

Nach 4-wöchiger Behandlung korrelierte die in der Nahrung enthaltene Zn-Menge positiv mit der ALP-Aktivität von Serum und Tibia-Extrakt. Das tibiale Protein zeigte einen dosisabhängigen Anstieg, während die tibiale TRAP-Aktivität dosisabhängig sank. Der Effekt einer 4-wöchigen Behandlung mit verschiedenen

Abbildung 1: Dosis-abhängiger Effekt von Zn auf die Aktivität der tibialen ALP-Aktivität (mU/mg Trockengewicht des Knochens) nach 4-wöchiger Behandlung. Werte als Mittelwerte \pm mittlere Standardabweichung für die einzelnen Diät-Gruppen (eine Gruppe umfaßt jeweils 8 erwachsene weibliche Mäuse). ** bedeutet einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Zn-Mangel Gruppe (mittels ANOVA, $p < 0,05$). Tab. 2 zeigt den Korrelations-Koeffizienten für die individuellen Werte als Funktion der in der Nahrung enthaltenen Zn-Menge. Tg = Trockengewicht.

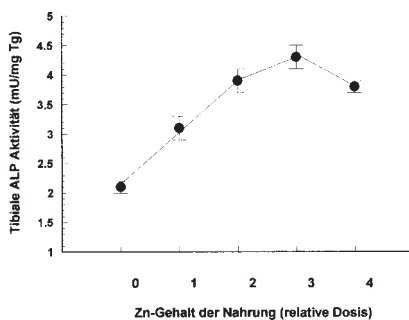


Abbildung 2: Dosis-abhängiger Effekt von Zn auf die Aktivität der tibialen TRAP nach 4-wöchiger Behandlung. Werte als Mittelwerte \pm mittlere Standardabweichung für die einzelnen Diät-Gruppen (eine Gruppe umfaßt jeweils 8 erwachsene weibliche Mäuse). ** bedeutet einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Zn-Mangel Gruppe (mittels ANOVA, $p < 0,05$). Tab. 2 zeigt den Korrelations-Koeffizienten für die individuellen Werte als Funktion der in der Nahrung enthaltenen Zn-Menge. Tg = Trockengewicht.

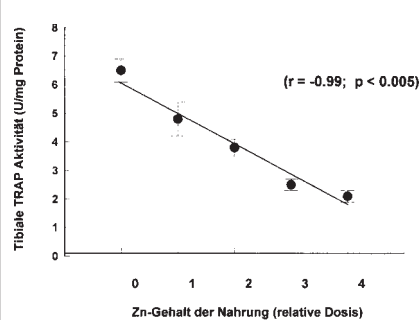
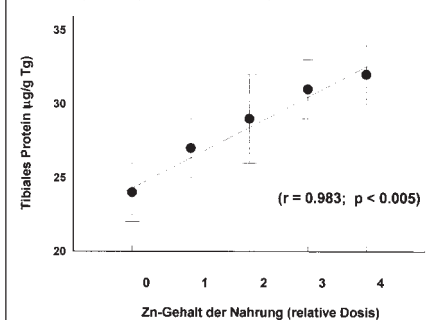
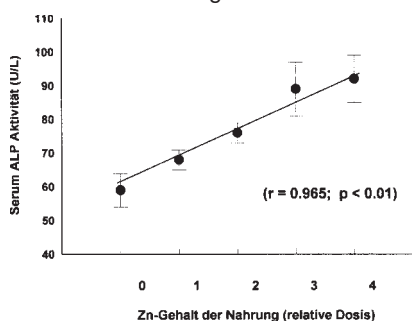


Abbildung 3: Dosis-abhängiger Effekt von Zn auf den tibialen Protein-Gehalt nach 4-wöchiger Behandlung. Werte als Mittelwerte \pm mittlere Standardabweichung für die einzelnen Diät-Gruppen (eine Gruppe umfaßt jeweils 8 erwachsene weibliche Mäuse). * bedeutet einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Zn-Mangel Gruppe (mittels ANOVA, $p < 0,05$). ** steht für $p < 0,005$. Der angeführte Korrelations-Koeffizient ($r = 0,983$, $p < 0,005$) wurde mittels Pearson-Korrelation aus den 5 in der Grafik enthaltenen Datenpunkten ermittelt. Tab. 2 zeigt den Korrelations-Koeffizienten für die individuellen Werte als Funktion der in der Nahrung enthaltenen Zn-Menge. Tg = Trockengewicht.



Zn-Dosierungen in der Nahrung auf tibiale ALP, tibiale TRAP, und tibiales Eiweiß sind in den Abbildungen 1–3 dargestellt. Die Varianzanalyse zeigte – im Vergleich zur Gruppe mit Zn-freier Diät – einen signifikanten Anstieg der Serum-ALP bei normaler, 2-, 3-, und 4-facher Zn-Dosis (jeweils $p < 0,01$), einen signifikanten Anstieg der tibialen ALP bei 2-, 3-, und 4-facher Zn-Dosis (jeweils $p < 0,002$), einen signifikanten Anstieg des tibialen Proteins bei 3- und 4-facher Zn-Dosis ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,005$), sowie einen signifikanten Abfall der tibialen TRAP bei 3- und 4-facher Zn-Dosis ($p < 0,002$).

Abbildung 4: Dosis-abhängiger Effekt von Zn auf die Aktivität der Serum-ALP nach 6-wöchiger Behandlung. Werte als Mittelwerte \pm mittlere Standardabweichung für die einzelnen Diät-Gruppen (eine Gruppe umfaßt jeweils 8 erwachsene weibliche Mäuse). * bedeutet einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Zn-Mangel Gruppe (mittels ANOVA, $p < 0,05$). ** steht für $p < 0,005$. Der angeführte Korrelations-Koeffizient steht ($r = 0,965$, $p < 0,01$) wurde mittels Pearson-Korrelation aus den 5 in der Grafik enthaltenen Datenpunkten ermittelt. Tab. 3 zeigt den Korrelations-Koeffizienten für die individuellen Werte als Funktion der in der Nahrung enthaltenen Zn-Menge.



Nach 6-wöchiger Behandlung korrelierte die in der Nahrung enthaltene Zn-Menge positiv mit der ALP-Aktivität von Serum und tibialem Knochen und negativ mit der Aktivität der tibialen TRAP. Das Ausmaß des Effekts reichte von +64 % für die Serum-ALP-Aktivität bis zu –54 % für die tibiale TRAP-Aktivität (jeweils $p < 0,001$). Der Effekt der 6-wöchigen Behandlung auf die Serum-ALP Aktivität ist in Abbildung 4 dargestellt. Varianzanalysen zeigten signifikante Anstiege der Serum-ALP-Aktivität bei 3- und 4-facher Zn-Dosis ($p < 0,03$ bzw. $p < 0,005$), einen signifikanten Anstieg des tibialen Proteins bei 4-facher ($p < 0,001$), und einen signifikanten Abfall der tibialen TRAP-Aktivität bei 3- und 4-facher Zn-Dosis (jeweils $p < 0,002$).

Eine ergänzende Studie (zusammengefaßt in Tabelle 2) zeigte, daß nach 6-wöchiger Behandlung die in der Nahrung enthaltene Zn-Menge nicht nur mit der Serum-ALP-Aktivität, bzw. mit der ALP-Aktivität in Calvaria und Tibia korrelierte, sondern auch mit der ALP-Aktivität im Leberextrakt. Eine entsprechende Korrelation

konnte jedoch nicht für die ALP-Aktivität in Niere und Darm gefunden werden. Weitere Analysen zeigten, daß in der gleichen Versuchsgruppe die Serum-ALP-Aktivität mit der ALP-Aktivität in Calvaria- und Tibiaextrakt, jedoch nicht mit der ALP-Aktivität aus Leber, Niere, oder Darmextrakt korreliert. Wie in Tabelle 3 zusammengefaßt, zeigten Kovarianzanalysen voneinander unabhängige Effekte von Zn-Dosis und Behandlungsdauer auf die Serum-ALP, Calvaria-ALP, tibiale ALP, tibiales Protein, und tibiale TRAP. Außerdem zeigte sich auch, daß beide Faktoren, d. h. Dosis und Zeit gemeinsam, einen signifikanten Effekt auf die genannten Parameter haben. Lediglich das tibiales Protein war von diesem gemeinsamen Effekt ausgenommen.

Da die TRAP sowohl osteoklastären als auch osteoblastären Ursprungs sein kann, und ein Absinken der TRAP im Knochenextrakt daher auch auf den osteoblastären Effekt zurückgeführt werden könnte, wurden MC3T3-E1 Zellen mit steigenden Zn-Dosen für 48 h inkubiert. Wie in Tabelle 4 dargestellt, kam es

Tabelle 2: Pearson-Korrelationen zw. Zn-Menge in der Nahrung bzw. der Serum ALP und der spezifischen ALP-Aktivität (i.e. U/mg Organ-Protein) verschiedener Organe. Die Werte stammen von 40 Mäusen, welche über 6 Wochen behandelt worden waren. Die ALP-Aktivität wurde im Triton X-100 Extrakt der jeweiligen Organe gemessen. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$.

Studie #1: Korrelationen zwischen Zn-Menge in der Nahrung bzw. der Serum-ALP mit der ALP-Aktivität verschiedener Organe

Organ	U/mg Protein	Korrelation mit der Zn-Menge	Korrelation mit der Serum-ALP Aktivität
Tibia	34,7 – 143,7	0,317*	0,483**
Calvaria	71,7 – 491,2	0,323*	0,371*
Niere	6,9 – 73,2	0,130	–0,046
Leber	0,03– 5,73	0,323*	0,262
Darm	16 – 4981	–0,024	–0,099

neben einem Anstieg der ALP-Aktivität und des Proteins tatsächlich zu einem Absinken der TRAP-Aktivität. Eine zweite Studie wurde durchgeführt, um eine noch höhere Zn-Dosis (d. h. eine 5-fach höhere Zn-Dosis als in der Normal-Diät enthalten) zu testen und den Effekt auf dieselben Parameter wie in Studie 1, und zusätzlich das Serum-Osteocalcin zu evaluieren. Wie in Tabelle 5 zusammengefaßt, zeigte auch diese Studie signifikante Effekte von Zn auf alle gemessenen Parameter. Der dosisabhängige Effekt von Zn auf die Serum-ALP Aktivität war proportional dem dosisabhängigen Effekt von Zn auf die Aktivität der Calvaria-ALP ($p < 0,001$), sowie der tibialen ALP ($p < 0,01$). Alle

Ergebnisse standen im Einklang mit denen der ersten Studie. Varianzanalysen zeigten darüber hinaus bei 2-facher Zn-Dosis einen signifikanten Anstieg des Serum-Osteocalcins ($p < 0,028$) gegenüber der Zn-freien Gruppe.

DISKUSSION

Die Daten dieser Studie zeigen, daß ein steigender Zn-Gehalt in der Nahrung zu einem proportionalen Anstieg der Aktivität der Serum-ALP und der Knochen-ALP erwachsener weiblicher Mäuse führt. Diese *in vivo* Beobachtung steht im Einklang mit Ergebnissen früherer *in vitro* Untersuchungen, in welchen mikromolare Dosen

von Zn zu einem Anstieg der Aktivität der ALP in humanen Osteoblasten-ähnlichen Zellen führte [16]. Weiters scheint unsere Beobachtung die Ergebnisse früherer *in vivo* Untersuchungen zu bestätigen und zu ergänzen. Der Effekt steigender Nahrungszn-Mengen im Sinne eines Anstiegs der Knochen-ALP war in der vorliegenden Untersuchung zeit- und dosisabhängig, jedoch nicht gänzlich Isoenzym-spezifisch. Im Gegensatz zu früheren Studien [28] konnte in der vorliegenden Untersuchung kein Einfluß von Zn auf die intestinale oder renale ALP gezeigt werden. Es zeigte sich jedoch eine positive Korrelation zwischen dem Nahrungs-Zn und der hepatischen ALP. Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse also, daß der Anstieg der Serum-ALP einen Zn-abhängigen Anstieg der Knochen-ALP reflektiert, wenngleich dieser Effekt nicht ausschließlich auf einen Anstieg der Knochen-ALP zurückzuführen ist.

Um festzustellen, ob der dosisabhängige Effekt von Zn auf die Knochen-ALP bei weiblichen erwachsenen Mäusen einen Anstieg der Osteoblasten-Aktivität (-Zahl) reflektiert, haben wir den Effekt von Zn auf einen weiteren Marker der Osteoblastenfunktion, nämlich das Serum-Osteocalcin gemessen. Dabei konnten wir zeigen, daß eine 4-wöchige Behandlung mit Zn nicht nur zu entsprechenden Veränderungen der Serum-ALP und der Knochen-ALP, sondern auch zu einer gleichsinnigen Veränderung des Serum-Osteocalcins führt. Obwohl unsere Daten mit der allgemeinen Hypothese im Einklang stehen, daß Zn zu einer Zunahme der Osteoblastenzahl bzw. zu einem Anstieg der Osteoblastenaktivität führt, bedarf es

Tabelle 3: Kovarianz-Analysen basierend auf Daten aus Tabelle 1–3 (d. h. fünf unterschiedliche Zn-Dosen, Behandlungsdauer 2, 4, und 6 Wochen; $n = 120$ Mäuse). Insgesamt war jeder der einzelnen Parameter (mit Ausnahme des Tibia-Proteins) sowohl von der Zeitdauer der Behandlung als auch vom Zn-Gehalt der Nahrung beeinflusst. N.s. = nicht signifikant. Tg = Trockengewicht.

Studie #1: Kovarianz-Analysen betreffend Dosis und Zeit

Parameter	Signifikanz (p-Wert)		
	Zn-Dosis	Zeit	Dosis x Zeit
Serum-ALP	0,001	0,001	0,001
Calvaria-ALP/Tg	0,005	0,001	0,01
Tibia-ALP/Tg	0,003	0,03	0,03
Tibia-TRAP/Tg	0,001	0,001	0,005
Tibia Protein/Tg	0,001	0,001	n.s.

Tabelle 4: MC3T3-E1 Zellen ($n = 6$ Kulturen/Gruppe) wurden für 48 Stunden in Serum-freiem DMEM kultiviert, welches entweder 0, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, oder 30 mmol/L Zn enthielt. Zelluläres Protein, ALP-Aktivität, gesamt saure Phosphatase (SP)-Aktivität und TRAP-Aktivität wurden jeweils im Triton X-100 Extrakt der einzelnen Kulturen bestimmt.

Ergänzende Studie: Effekt von Zn auf Osteoblasten-ähnliche (MC3T3-E1) Zellen

Parameter	Werte (von – bis)	Korrelations-Koeffizient	Signifikanz (p-Wert)
Zell-Protein (mg/well)	148–168	0,565	0,001
ALP Aktivität (mU/mg)	0,53–0,63	0,360	0,02
TRAP Aktivität (mU/mg)	26–49	–0,492	0,001
Gesamt SP Aktivität (mU/mg)	0,180–0,267	–0,675	0,001

weiterer Untersuchungen, um diese Beobachtungen zu untermauern.

Nachdem in früheren Untersuchungen bereits gezeigt werden konnte, daß Zn eine Hemmung der Knochenresorption bewirken kann [12, 13], haben wir in unseren beiden Studien auch den Effekt von Zn auf die Aktivität der ossären TRAP untersucht. Wir gingen dabei von der Vermutung aus, daß eine Hemmung der Knochenresorption auch ein paralleles Absinken der osteoklastären TRAP bewirken müßte [22], und daß ein Großteil der gemessenen TRAP Aktivität auch tatsächlich aus den Osteoklasten stammen würde [22–24]. Erwartungsgemäß zeigte sich in unseren Untersuchungen eine dosisabhängige Hemmung der tibialen TRAP-Aktivität, wenngleich dies nicht im Einklang mit den Erkenntnissen einer anderen Studie steht [27]. Wir gingen daher der Frage nach, ob die im Knochenextrakt gemessene TRAP tatsächlich vorwiegend aus den Osteoklasten, oder doch mehr aus den Osteoblasten stammt (Osteoklasten

weisen zwar eine wesentlich höhere TRAP-Aktivität pro Zelle auf als Osteoblasten, aber die Zahl der Osteoblasten ist ungleich viel größer als die Zahl der Osteoklasten). Daher setzten wir murine MC3T3-E1 Zellen unterschiedlichen (mikromolaren) Konzentrationen von Zn über 48 h aus, und fanden dabei heraus, daß neben dem erwarteten Anstieg der ALP-Aktivität und der Protein Menge die TRAP-Aktivität absank. Nachdem diese in vitro Untersuchung nun klar zeigte, daß der Effekt von Zn auf die tibiale TRAP zumindest teilweise Ausdruck eines Effekts auf die Osteoblasten ist, sollte eine Hemmung der tibialen TRAP-Aktivität auch nicht ausschließlich als Hemmung der Knochenresorption interpretiert werden.

Insgesamt konnte anhand der vorliegenden Untersuchung gezeigt werden, daß eine schrittweise Erhöhung des Zn-Anteils in der Nahrung zu einem proportionalen Anstieg der ALP-Aktivität in Serum und Knochen führt. Die Ergebnisse unserer zusätzlich durchgeführten in vitro Untersu-

chungen an murinen Knochenzellen stehen im Einklang mit denen vorangegangener Untersuchungen [16]. Obwohl anhand unserer Studie gezeigt werden konnte, daß die tibiale TRAP dosisabhängig durch Zn gehemmt werden kann, sollte dies dennoch nicht als untrügliches Zeichen dafür gewertet werden, daß Zn in dosisabhängiger Weise die Knochenresorption hemmen kann, da wir einen ähnlichen Effekt von Zn – nämlich eine Hemmung der TRAP-Aktivität – auch in murinen osteoblastenähnlichen Zellen beobachten konnten.

Literatur:

1. Coleman JE. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Ann Rev Biochem* 1992; 61: 897–946.
2. Gurd FRN, Godman DS. Preparations and properties of serum and plasma proteins. The interaction of human serum albumin with zinc ions. *J Am Chem Soc* 1952; 74: 670–4.
3. Mares-Perlman JA, Subar AF, Block G, Greger JL, Luby MH. Zinc intake and sources in the US adult population: 1976–1980. *J Amer Coll Nutr* 1995; 14: 349–57.
4. Herzberg M, Foldes J, Steinberg R, Menczel J. Zinc excretion in osteoporotic women. *J Bone Miner Res* 1990; 5: 251–7.

Tabelle 5: Die Tabelle enthält die Mittelwerte \pm mittlere Standardabweichung für die einzelnen Diät-Gruppen (n = 8 Mäuse/Gruppe; für die Zn-freie Gruppe: n = 11). Im Vergleich mit der Zn-freien Gruppe zeigte die ANOVA einen signifikanten Unterschied von $p < 0,05$ (*) bzw. $p < 0,005$ (**). Die Dosis/Wirkungs Kurve war linear/hyperbol für die Serum ALP-Aktivität ($r = 0,48$, $p < 0,001$) und die Calvaria ALP-Aktivität ($r = 0,414$, $p < 0,01$), biphasisch/konvex für die Tibia ALP-Aktivität und das Serum-Osteocalcin (OC), und biphasisch/konkav für die Tibia TRAP-Aktivität. Tg = Trockengewicht.

Studie #2: Effekt des unterschiedlichen Zn-Gehaltes der Nahrung auf Parameter des Knochenstoffwechsels nach 4-wöchiger Behandlung

Parameter	Werte für die jeweiligen Parameter in Abhängigkeit vom Zn-Gehalt der Nahrung					
	0	1 x	2 x	3 x	4 x	5 x
Serum-ALP (U/L)	27,3 \pm 3,0	53,5 \pm 4,0**	53,0 \pm 5,2**	50,7 \pm 3,6**	48,4 \pm 2,8**	55,6 \pm 4,4**
Serum-OC (ng/mL)	217 \pm 11	267 \pm 16	284 \pm 24	240 \pm 12	246 \pm 12	239 \pm 15
Calv.-ALP (mU/mg Tg)	0,22 \pm 0,03	0,34 \pm 0,03	0,41 \pm 0,08	0,33 \pm 0,03	0,44 \pm 0,07	0,42 \pm 0,05
Tibia ALP (mU/mg Tg)	0,44 \pm 0,05	0,83 \pm 0,1**	0,69 \pm 0,05*	0,82 \pm 0,08*	0,56 \pm 0,06	0,42 \pm 0,03
Tibia TRAP mU/mg Tg	20 \pm 3	13 \pm 1	8 \pm 1**	12 \pm 1	15 \pm 3	22 \pm 1

5. Carter JP, Grivetti LE, Davis JT, Nasiff S, Mansour A, Mousa MA, Atta A, Patwardhan VN, Moneim MA, Abdou A, Darby WJ. Growth and sexual development of adolescent Egyptian village boys. Effects of Zn, iron, and placebo supplementation. *Am J Clin Nutr* 1969; 22: 59–65.
6. Hurley LS. Congenital malformations resulting from zinc deficiency in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966; 123: 692–6.
7. Nishi Y. Zinc and growth. *J Am Coll Nutr* 1992; 15: 340–4.
8. Diamonde I, Hurley LS. Histopathology of zinc-deficient rats. *J Nutr* 1970; 100: 325–9.
9. Matsui T, Yamaguchi. Zn modulation of insulin-like growth factor's effect on osteoblastic MC3T_e1 cells. *Peptides* 1987; 16: 4007–12.
10. Yamaguchi M, Takahashi K. Role of zinc as an activator of bone metabolism in weanling rats. *Japan J Bone Min Res* 1986; 2: 186–91.
11. Yamaguchi M, Oishi H, Suketa Y. Stimulatory effect of Zn on bone formation in tissue culture. *Biochem Pharm* 1987; 36: 4007–17.
12. Moonga BS, Demster DW. Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 453–7.
13. Holloway WR, Colier FM, Herbst RE, Hodge JM, Nicholson GC. Osteoblast-mediated effects of zinc on isolated rat osteoclasts: inhibition of bone resorption and enhancement of osteoclast number. *Bone* 1996; 19: 137–42.
14. Relea P, Revilla M, Ripoll E, Arribas I, Villa LF, Rico H. Zinc, biochemical markers of nutrition, and type I osteoporosis. *Age-Aging* 1995; 24 (4): 303–7.
15. McComb RB, Bowers GN Jr, Posen S. Alkaline Phosphatase. In: Plenum Press, New York, 1979; 115–35.
16. Hall S, Farley J. Phosphate increases the half-life of skeletal alkaline phosphatase activity in SaOS-2 cells by preventing the dissociation of an active center zinc. *J Bone Miner Res* 1995; 10 (Abstract Suppl): 208.
17. Youn K, Golub E, Rodan GA. Alkaline phosphatase cDNA transfected cells promote calcium and phosphorus deposition. *Connect Tiss Res* 1989; 22: 17–25.
18. Fallon MD, Whyte MP, Teitelbaum SL. Stereospecific inhibition of alkaline phosphatase by L-tetramisole prevents in vitro cartilage calcification. *Lab Invest* 1980; 43: 489–94.
19. Weiss MV, Cole DEC, Ray K, Whyte MP, Lafferty MA, Mulivor RA, Harris H. A missense mutation in the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene causing a lethal form of hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 7666–9.
20. Lauffenburger T, Olah AJ, Dambacher J, Guncaga J, Lentner C, Haas H. Bone remodeling and calcium metabolism: a correlated histomorphometric, calcium kinetic, and biochemical study in patients with osteoporosis and Paget's disease. *Metabolism* 1977; 26: 589–97.
21. Van Straalen JP, Sanders E, Prummel MF, Sanders GTB. Bone alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clin Chim Acta* 1991; 201: 27–31.
22. Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 1982; 34: 285–90.
23. Miler SC. The appearance of acid phosphatase activity at the developing ruffled border of parathyroid hormone activated medullary bone osteoclasts. *Calcif Tissue Int* 1985; 37: 526–9.
24. Andersson GN, Marks SC Jr. Tartrate-resistant acid ATPase as a cytochemical marker for osteoclasts. *J Histochem Cytochem* 1989; 37: 115–7.
25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram amounts of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–55.
26. Farley JR, Kyeyune-Nyombi E, Tarbaux NM, Hall SL, Strong DD. ALP activity from human osteosarcoma cell line SaOS-2: an isoenzyme standard for quantifying skeletal ALP activity in serum. *Clin Chem* 1989; 35: 223–9.
27. Farley JR, Hall SL, Herring S, Tarbaux NM. Two biochemical indices of mouse bone formation are increased, in vivo, in response to calcitonin. *Calcif Tissue Int* 1990; 50: 67–73.
28. Cui L, Takagi Y, Nezu R, Liboshi Y, Yoshida H, Kiya S, Okada A. Prolonged zinc-deficient diet alters alkaline phosphatase and disaccharidase activities and induces morphological changes in the intestines of rats. *J Trace Elements in Exp Med* 1995; 8: 249–61.
29. Farley JR. Phosphate regulates the stability of skeletal alkaline phosphatase activity in human osteosarcoma (SaOS-2) cells without equivalent effects on the level of skeletal alkaline phosphatase immunoreactive protein. *Calcif Tissue Int* 1995; 57: 371–8.
30. Yamaguchi M, Yamaguchi R. Action of zinc on bone metabolism in rats. *Biochem Pharm* 1986; 35: 773–7.

Korrespondenzadresse:*Univ. Ass.**Dr. med. Hans Peter Dimai
Medizinische Universitätsklinik
Graz**A-8036 Graz,**Auenbruggerplatz 15**e-mail:**hans.dimai@kfunigraz.ac.at*

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

[Bilddatenbank](#)

[Artikeldatenbank](#)

[Fallberichte](#)

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)