

Die Panostitis beim Hund – eine kryptogenetische Skeletterkrankung im Blickwinkel einer neuen ätiopathogenetischen Hypothese.

Teil 2: Biochemische Aspekte und Untersuchungen

P. Schawalder¹, K. Jutzi¹, H.U. Andres¹, J. Blum²

¹Abteilung Chirurgie und Orthopädie, Departement für klinische Veterinärmedizin und ²Institut für Genetik, Ernährung und Haltung von Haustieren der Universität Bern

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Pilotstudie wurden in den Seren von Hunden mit Panostitis ionisiertes Kalzium, Kupfer, Zink, Hormone und Aminosäuren-Profile analysiert. Integriert wurden zudem Proteinauftrennungen aus Knochenbiopsien. Aus diesen Untersuchungen gehen folgende Ergebnisse hervor: Ionisierte Kalziumwerte, Kupfer-, Zink- und Hormonresultate (Parathormon, IGF-1, T3 und T4) befanden sich im Referenzbereich. 11 von 23 Aminosäuren im Serum der Panostitis-Hunde zeigten signifikant ($P=0.05$) erhöhte Werte. Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese konnte im Überstand der mit SDS vorbehandelten Knochenbiopsien sämtlicher Panostitispatienten eine Doppelbande mit einem MG von 39000 D aufgetrennt und dargestellt werden. Alle Referenzhunde zeigten an dieser Stelle nur eine Einfachbande. Vermutlich auf Grund einer chemischen Blockierung des N-terminalen Endes war es nicht möglich, die Proteine der Doppelbande vom N-terminalen Ende her bezüglich ihrer Aminosäuren zu sequenzieren. Die Natur dieser Doppelbande ist uns bis jetzt unbekannt. Die Ätiologie der Panostitis konnte somit im Rahmen dieser Arbeit nicht restlos verifiziert werden. Der Protein- bzw. Aminosäuren-Stoffwechsel der an Panostitis erkrankten Hunde aber scheint tatsächlich verändert zu sein.

Schlüsselwörter: Panostitis – Hund – Ätiopathogenese – Labordiagnostik – Proteinstoffwechsel

Canine panosteitis: an idiopathic bone disease investigated in the light of a new hypothesis concerning pathogenesis. Part Two: Biochemical aspects and investigations

The pilot study included serum analysis of ionized calcium, copper, zinc, various hormones and amino acid profiles from dogs affected with panosteitis, as well as protein electrophoresis performed on bone biopsies. Results of these analyses are as follows: ionized calcium, copper, zinc and hormones (parathyroid hormone, IGF-1, T3 and T4) were within reference ranges. Eleven of 23 serum amino acids from panosteitis-affected dogs were found to be significantly increased ($P=0.05$). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis performed on bone biopsies, which were pretreated with SDS, resulted in a double band of 39,000 D molecular weight in all panosteitis-affected dogs. Similar studies in control dogs resulted in a single band in this region. Attempts at amino acid sequencing from the N-terminal of the proteins in this double band region were unsuccessful. A chemical interference at the N-terminal end of these proteins was suspected. The composition of this double band is as yet unknown. The etiology of panosteitis could therefore not be definitively verified. However, it does appear that protein- or amino acid metabolism is affected in dogs with panosteitis.

Key words: panosteitis – dog – pathogenesis – laboratory diagnosis – protein metabolism

Einleitung

Seit Gratzl 1951 die Panostitis des Hundes erstmals beschrieb, wurden grosse Anstrengungen unternommen, das Wesen dieser kryptogenetischen Skeletterkrankung zu erforschen. Dennoch ist bis zum heutigen Tag die Aetiopathogenese nicht geklärt. Die Panostitis, eine kryptogenetische Skeletterkrankung beim Junghund, wurde im Blickwinkel einer eigenen empirischen ätiopathogenetischen Hypothese untersucht. Auf Grund langjähriger klinischer Beobachtungen muss das Auftreten der Krankheit in engem Zusammenhang stehen mit dem kommerziellen Aufkommen der verschiedenen «eiweissangereicherten Hochenergiefutter». Diese Mutmassung lässt sich hypothetisch auch erklären und die Krankheit demzufolge mit dem Begriff «Ossäres Kompartimentsyndrom» umschreiben. Unsere Hypothese moniert, dass ein Proteinüberschuss durch seine osmotische Wirkung ein intraossäres Ödem verursacht, das im starren, nicht dehnbaren Kompartiment Knochen zu einer medullären Druckerhöhung und zur Kompression der Blutgefässe führt. Die resultierende ossäre Ischämie verursacht eine gestörte Trophik, unzulängliche metabolische Verhältnisse (ungenügende Sauerstoffversorgung, mangelhafte Nährstoffzufuhr, lokale Azidose, unzureichender Metabolitenabtransport, lokal entgleiste biochemische Vorgänge usw.), führt zu lokal entzündlichen Prozessen und leitet somit einen Circulus vitiosus ein. Gleichzeitige physische Überbeanspruchung des Junghundes und ein dadurch erhöhter Metabolismus verschärft darüberhinaus das Krankheitsgeschehen.

Im Rahmen einer vorgängigen klinischen Studie wurden Panostitispatienten und gesunde Hunde mit modernen diagnostischen Methoden untersucht, um die Ätiopathogenese dieser kryptogenetischen Junghundeerkrankung wissenschaftlich zu ergründen (Andres et al., 1996; Schawalder et al., 1996; Schawalder et al., 2002).

So konnte mittels Osteomedullographie bei sämtlichen untersuchten Panostitispatienten die ödem- und druckbedingte Inkommodierung der medullären Blutzirkulationsverhältnisse aufgezeigt und darüberhinaus auch voluminöse, extraossäre, subperiostale Hohlraumfüllungen beobachtet werden. Mit der MRI-Untersuchungen konnten bei 2 Patienten das Knochenmarks- und gleichzeitig vorhandene Periostoedem aufgezeigt werden. Mittels Gadolinium und gleichzeitiger Fettsuppression konnte demonstriert werden, dass das

Kontrastmittel bei Panostitis-Hunden die Blutgefässe verlässt und sich diffus im Extrazellulärraum verteilt (Andres et al., 1996; Schawalder et al., 1996; Stoupis et al., 1995). Die gemessenen intraossären Drucke (IOP) waren bei sämtlichen Panostitispatienten pathologisch erhöht.

Kontrollierte Therapieversuche mit Benzopyron (Cumartrin[®], 2–4 mg/kg) haben bei allen untersuchten Hunden eindrücklich das Verschwinden des Knochenmarkoedems nach Behandlung mit Benzopyron veranschaulichen können.

Die Tatsache, dass durch die alleinige proteolytische Wirkung des Wirkstoffs Benzopyron (Petho, 1981) die Panostitis in der Regel innerhalb von Tagen klinisch zur Abheilung gebracht werden konnte, schien für die Richtigkeit unserer Eiweiss-Hypothese zu sprechen. Zumindest zeigten die Therapieerfolge auf, dass «Eiweisse» eine wesentliche Rolle in der Aetiopathogenese der Panostitis spielen müssen. Aus diesem Grund wurden auch biochemische Aspekte zum Problembereich «Panostitis» untersucht.

Biochemische Aspekte im Umfeld der Panostitis

Der Kalziumgehalt im Futter und dessen Aufnahme ist für eine normale Entwicklung der enchondralen Ossifikation wichtig (Hazewinkel et al., 1991). Ein erhöhter Kalziumgehalt im Futter allerdings beeinträchtigt diesen Prozess und begünstigt die Ausbildung von Osteochondrosen bei jungen Hunden der grossen Rassen (Hazewinkel et al., 1985). Der Kalziumstoffwechsel wird endokrin reguliert – vor allem durch Parathormon, Vitamin D und Calcitonin – und steht mit anderen Spurenelementen wie z.B. Kupfer und Zink in starker Wechselwirkung. Um den Kalziumstoffwechsel als Ursache einer Panostitis ausschliessen zu können, ist vor allem das ionisierte, freie Kalzium von Interesse. Kupfer ist wichtig bei der Synthese von Elastin und Kollagen (inter- und intramolekulare Vernetzungen). Deshalb kann ein Kupfermangel zu Skelettdeformationen führen. Durch Interaktionen können hohe Molybdän-, Sulfat- oder Kalziumkonzentrationen einen Kupfermangel bewirken. Es handelt sich hier um eine negative Wechselwirkung zwischen Kalzium, Molybdän, Sulfat und Kupfer (Scheunert und Trautmann, 1987). Ebenfalls existiert eine negative Interaktion zwischen Kalzium, Cadmium und Zink. Höhere Kalziumkonzentrationen können den Zinkmangel verschärfen. Ein hoher Cadmium-Gehalt kann die Zink-Resorption hemmen und Bindungsstellen

¹ Der Wirkstoff Benzopyron ist als Cumartrin[®], (Firma Diavet, CH-8806 Bäch) im Handel erhältlich.

im Zink-Transportsystem besetzen oder auch zinkhaltige Enzyme aktivieren (Scheunert und Trautmann, 1987).

Jungtiere weisen generell eine höhere Sekretionsrate der Schilddrüsenhormone auf als erwachsene Tiere. Dies kann mit einer erhöhten Stoffwechselforderung während des Wachstums in Zusammenhang gebracht werden. Ebenso bewirkt ein hoher Proteingehalt im Futter eine erhöhte Ausscheidung von Schilddrüsenhormonen und führt zu einer vermehrten Wärmeabgabe der Tiere (Scheunert et al., 1987). Eine erhöhte Energieaufnahme während der Wachstumsphase von Doggen erhöht die Konzentration der zirkulierenden Schilddrüsenhormone, die bekannterweise auch eine essentielle Rolle im Protein- und Energiestoffwechsel spielen, signifikant (Blum et al., 1992). Das Parathormon vermehrt und stimuliert die Osteoklasten an der Knochenoberfläche und führt zur Osteolyse (Scheunert et al., 1987; Brody, 1994; Berger et al., 2001). Bei Hunden mit Panostitis geschieht gerade der gegenteilige Effekt; es kommt zu Knochenzubildungen im Knochen, wobei es sich selten um reifen Lamellenknochen, sondern um zellreichen Geflechtknochen und Fibroplasien handelt (Baumann et al., 1951; Cotter et al., 1968; Hardy et al., 1969; Boehning et al., 1979; Burt et al., 1972; Clauss, 1991). Diese Tatsache könnte durch erniedrigte PTH-Konzentrationen im Blut erklärt werden oder durch den anabolen Effekt, den PTH in niedriger Menge ausüben kann.

Unter dem Einfluss von Wachstumshormonen werden in der Leber Somatomedine (speziell der insulinähnliche Wachstumsfaktor-1, IGF-1) produziert, die eine wachstumsfördernde Wirkung auf Knorpel und Knochen ausüben. Die Konzentration von IGF-1 ist gemäss NAP et al. (1993b) während des Wachstums jedoch konstant und ohne Korrelation zum Wachstumshormon. IGF-1 ist der wichtigste Mediator des Wachstumshormons (Hazewinkel et al., 1985). Neben der Leber wird IGF-1 in der Epiphysenfuge synthetisiert und stimuliert dort die Chondrozytenproliferation und -differenzierung. Bei ad libitum gefütterten jungen Doggen wird eine erhöhte Konzentration an zirkulierendem IGF-1, T3 und T4 beobachtet und ein kausaler Zusammenhang mit Osteochondrosen vermutet (Blum et al., 1992). Nap et al. (1993a) haben dargestellt, dass eine proteinreiche Fütterung bezüglich der Entwicklung von Osteochondrosen keine Rolle spielt, dass aber verschiedene Proteingehalte im Futter einen signifikanten Unterschied von IGF-1 und Wachstumshormon bei Welpen der Deutschen Dogge bewirken. Die Proteinaufnahme beeinflusst jedoch via IGF-1 sowohl den Kalzium-Metabolismus als auch die Wachstumsgeschwindigkeit (Hazewinkel et al., 1985). Die Untersu-

chung der Aminosäureprofile drängt sich auf, weil bei übermässiger Fütterung von Proteinen eine Störung des Protein- bzw. Aminosäuremetabolismus denkbar ist.

Tiere, Material und Methoden

Tiere

Das mehrschichtige Patientengut und die durchgeführten Untersuchungen sind der Übersichtlichkeit halber in Tabelle 1 zusammengestellt. Als Referenzwerte wurden Seren von 34 (je nach Untersuchung bis 92) zufällig ausgewählten, gesunden Hunden der mittelgrossen bis grossen Rassen im Alter ab 5 Monaten mit einer Geschlechtsverteilung von annähernd 1:1 analysiert.

Laboruntersuchungen

Im Rahmen der durchgeführten biochemischen Untersuchungen wurden auch Laboruntersuchungen wie Chemieprofil, Hämatologie, Lactat-Bestimmung im Serum, Eiweisselektrophorese, Lactat, pH-Messungen im Knochenmarksaspirat und auch histologische Untersuchungen der Knochenbiopsien durchgeführt (Jutzi, 1996). Für die Analysen der Mengen- und Spurenelemente, der Hormone und der Aminosäuren wurde Serum benötigt. Das Vollblut wurde vor der für die intraossäre Druckmessung erforderlichen Narkose entnommen. Die Hunde waren somit mindestens 12 Stunden gefastet. Als Kontrolle wurden in Seren von 50 Referenzhunden und sieben Panostitis-Hunden Aminosäure-Profile analysiert und einander gegenübergestellt. Ebenfalls wurde an einem Patienten nach Beendigung der 100-tägigen Therapie mit Benzopyron ein Aminosäure-Profil als Kontrolle durchgeführt.

Untersuchungen am Knochen

Knochenbiopsien wurden bei 4 Panostitis-Hunden mit dem Straumann Medical-Biopsie-Set[®] mit einer Hohlfräse im Bereich der proximalen Metaphyse des Femurs oder des Humerus entnommen. Die Knochenbiopsien wiesen einen Durchmesser von 4 mm auf.

Biochemische Untersuchungen

Zur SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden im Rahmen dieser Arbeit die Kammern, Geräte und Chemikalien von BioRad verwendet. Die Methodik wurde von Laemmli (1970) entwickelt. Es wurden Gele aus 12%iger Polyacrylamid-Lösung gegossen (BioRad). Neben

Tabella 1: Zusammenstellung des Patientenguts und der durchgeführten Untersuchungen sowie der unterschiedlich grossen, gesunden Referenz-Hunde-Populationen in den Alters- und Rassekategorien wie die Panostitis-Patienten ^{(1),(2),(3),(4),(5)}. Bei den Mengen- und Spurenelementen wurden unterschiedlicherweise Calcium (hellgrau), ionisiertes Calcium (mittelgrau) sowie Kupfer und Zink (dunkelgrau) bestimmt.

| Nr. | Signalement | Laboruntersuchungen | | | | | | | | Knochenmarksaspiration | | | Knochenbiopsie | | | |
|-----|------------------------------|---------------------|-------------------|----------------------------|--|-------------------|-------------------|------------------------------------|------------------|--|--------|----|----------------|----------|-----------------------|---|
| | | Chemieprofil | Hämatologie | Eiweiss- elektrophorese | Mengen- und Spurenelemente (Ca, Ca-ion., Cu, Zn) | | Lactat | Hormone (PTH, IGF-1, T3, T4) | Aminosäureprofil | Totalprotein & Eiweisselektro- phorese | Lactat | pH | Histologie | SDS-PAGE | Semi-dry- Transfer | Aminosäuren- sequenzierung (Edmann) |
| 1 | DSH, m., 9 Mte. | X | X | X | X | | | | | | | | | | | |
| 2 | Jugosl.Schäferh., m., 1 J. | X | X | X | X | | | | | | | | | | | |
| 3 | I'Setter, m., 7 Mte. | X | X | X | X | | | | X | | X | | | | | |
| 4 | Appenz.bastard, w., 7 Mte. | X | X | X | X | X | | | | | | | | | | |
| 5 | Appenz.bastard, w., 9 Mte. | X | X | X | X | | | | | | | | | | | |
| 6 | Neufundländer, w., 9 Mte. | X | X | X | X | X | X | | X | X | X | | | | | |
| 7 | Bernhardiner, m., 1 J. | X | X | X | X | X | | | | | | X | | | | |
| 8 | BSH, w., 7 Mte. | X | X | X | X | X | X | | | | X | | | | | |
| 9 | DSH, m., 13 Mte. | X | X | X | X | X | | | | | | | | | | |
| 10 | DSH, m., 14 Mte. | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | | | |
| 11 | Labrador, w., 7,5 Mte. | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | |
| 12 | Labrador, m., 14 Mte. | X | X | X | X | X | | X | X | | | | | | | |
| 13 | DSH, m., 8 Mte. | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | |
| 14 | DSH, w., 11 Mte. | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | X | | |
| 15 | DSH, m., 12 Mte. | X | X | X | X | X | X | X | 2X | | | | X | X | | |
| 16 | Leronberger, m., 12 Mte. | X | X | X | 2X | X | X | X | X | 2X | | | X | X | X | X |
| | gesunde Referenzhunde | 17 ⁽¹⁾ | 17 ⁽¹⁾ | 34 ⁽¹⁾ | 34 ⁽²⁾ | 14 ⁽³⁾ | 92 ⁽⁴⁾ | 50 ⁽⁵⁾ | | | | | 2 | | | |

den Hunden mit Panostitis wurden ein genau definierter Standard und auch Untersuchungsmaterial mindestens eines Referenzhundes aufgetragen, um einen eventuellen Unterschied zwischen einem Hund mit Panostitis und einem gesunden Hund feststellen zu können.

Zum Semi-Dry-Transfer

Das Untersuchungsmaterial eines Panostitis-Patienten (Patient Nr. 4) wurde konzentriert (7× 20 µl) auf ein 12% Mini-Gel aufgetragen und bei ca. 30 mA eine Stunde aufgetrennt und anschliessend mit der Semi-Dry-Transfer-Methode transferiert. Die zwei Banden der Doppelbande (MG ca. 40000 D) wurden einzeln mit einer scharfen Klinge ausgeschnitten. Anschliessend wurde eine Aminosäuren-Sequenzierung nach Edman durchgeführt.

Aminosäuren-Sequenzanalyse nach Edman

Mittels Aminosäuren-Sequenzanalyse nach Edman (1956) konnten die Aminosäuren der doppelt erscheinenden Proteinbande aufgeschlüsselt wer-

den. Der N-terminale Abbau eines Proteins mit der Edman-Methode kann heute routinemässig und vollständig automatisiert durchgeführt werden. Für jede abgespaltene Aminosäure konnte ein eigenes HPLC-Chromatogramm erhalten werden (Lengweiler, 1995). Analysiert wurden die zehn ersten N-terminalen AS der zwei Banden der Doppelbande vom Patienten Nr. 4.

Die Aminosäuren in 1. Wahl konnten als die wahrscheinlichste Reihenfolge angesehen werden. Anhand der 10 N-terminalen Aminosäuren konnte mittels einer Datenbank versucht werden, das Protein zu identifizieren.

Statistik

Mit Hilfe der multiplen Varianzanalyse und dem t-Test (SAS System, mit Programm «General Linear Models Procedure») wurden die Einflüsse Panostitis, Geschlecht, Rassen, Alter, (Altersklassen 5–8 Mt., 9–12 Mt., ab 13 Mt.) und Interaktionen zwischen Alter und Rasse getestet. Ausgewertet wurden Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler (SEM). Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde bei P= 0.05 festgelegt.

Ergebnisse

Laboruntersuchungen im peripheren Blut

Chemieprofile, hämatologische Untersuchungen und Eiweisselektrophorese

Diese Untersuchungen erbrachten keine Resultate, die zur Untermauerung unserer Hypothese von Relevanz gewesen wären. Die Panostitishunde vermochten sich statistisch nicht von der gesunden Kontrollgruppe zu unterscheiden.

Mengen- und Spurenelemente

Bei den Mengen- und Spurenelementen interessierte vor allem das ionisierte Calcium. Die Ergebnisse von 6 Panostitis-Patienten zeigten im Vergleich zu gesunden Hunden keine signifikanten Unterschiede ($P=0.071$).

Auch die Konzentrationen von Kupfer (Cu) und Zink (Zn) wiesen zwischen Patienten und gesunden Hunden keine signifikanten Einflüsse von Alter, Rasse und Geschlecht auf. (vgl. Tab. 3).

Tabelle 2: ionisiertes Kalzium. Die bei Panostitis-Patienten gewonnenen Werte werden mit den gesunden Kontrollen verglichen. Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant.

| | Kontrolle (n=34) | | Panostitis (n=6) | | einf. Varianzanalyse |
|-------------------|------------------|------|------------------|------|----------------------|
| | Mittelwert | SEM | Mittelwert | SEM | P-Werte |
| Ca ion. (mmol/l) | 1.35 | 0.04 | 1.52 | 0.08 | 0.07 |
| Ca ion/Ca tot (%) | 50 | 1.18 | 54.7 | 2.18 | 0.17 |

Tabelle 3: Kupfer- und Zink-Resultate. Die bei Panostitis-Patienten gewonnenen Werte werden mit den gesunden Kontrollen verglichen. Die Unterschiede sind für Cu und Zn statistisch nicht signifikant.

| | Kontrolle (n=88) | | Panostitis (n=9) | | Varianzanalyse (P-Werte) | | | |
|--------------------------|------------------|------|------------------|-----|--------------------------|------|-------|-------|
| | Mittelwert | SEM | Mittelwert | SEM | Panostitis | Sex | Alter | Rasse |
| Cu ($\mu\text{mol/l}$) | 8.7 | 0.21 | 8.6 | 0.6 | 0.88 | 0.13 | 0.30 | 0.54 |
| Zn ($\mu\text{mol/l}$) | 12.5 | 0.21 | 11.9 | 0.8 | 0.40 | 0.10 | 0.78 | 0.20 |

Hormone

Bei IGF-1 und T3, nicht aber bei PTH und T4, konnten statistisch signifikante Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Hunden festgestellt werden. Während IGF-1 einen statistisch signifikanten Einfluss bezüglich Geschlecht, Rasse und Alter zeigte, konnte bei T3 nur ein solcher in

Bezug auf das Alter aufgezeigt werden (siehe Tab. 3). Die IGF-1- und T3-Mittelwerte waren altersabhängig. Je jünger die Hunde desto höher waren die ermittelten Werte. Bezüglich IGF-1 zeigten die Rüden signifikant höhere Werte als die Hündinnen. Im Vergleich zu den DSH zeigten die Retriever höhere IGF-1-Mittelwerte.

Tabelle 4: Zusammengestellte Resultate der Hormonanalysen. Nur bezüglich Alter, Rasse und Geschlecht konnten signifikante Interaktionen aufgezeigt werden.

| | Kontrolle (n=92) | | Panostitis (n=7) | | Varianzanalyse (P-Werte) | | | |
|---------------|------------------|------|------------------|------|--------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | Mittelwert | SEM | Mittelwert | SEM | Panostitis | Sex | Alter | Rasse |
| PTH (pmol/l) | 0.46 | 0.03 | 0.63 | 0.2 | 0.28 | 0.48 | 0.74 | 0.54 |
| IGF-1 (ng/ml) | 439 | 27.6 | 428 | 54 | 0.83 | 0.024 | 0.014 | 0.014 |
| T3 (nmol/l) | 1.52 | 0.06 | 1.75 | 0.14 | 0.19 | 0.19 | 0.04 | 0.07 |
| T4 (nmol/l) | 32.4 | 1.1 | 27.4 | 3.2 | 0.14 | 0.25 | 0.82 | 0.26 |

Aminosäuren-Profil

Bei 11 von 23 Aminosäuren konnte mit multipler Varianzanalyse und t-Test ein statistisch signifikanter bis hoch signifikanter Unterschied ($P<0.05$) zwischen Panostitis-Patienten und gesunden Hunden aufgezeigt werden (Tab. 5).

Bei Patient Nr.4 (vgl. Tab. 1) waren während des akuten Panostitis-Krankheitsgeschehens Glycin, Arginin und Threonin im Vergleich zu gleichaltri-

gen Referenzhunden erhöht. Nach einer 100 Tage dauernden Therapie mit Benzopyron wurden wiederum im Vergleich zu den gleichaltrigen Referenzhunden Threonin, Tyrosin, Valin, Methionin, Isoleucin und Leucin in erhöhtem, Taurin und Hydroxyprolin in erniedrigtem Masse ermittelt. Ein signifikanter Einfluss konnte auch bezüglich Alter bei Asparaginsäure, Glutaminsäure und Asparagin und bezüglich Rassen bei Arginin festgestellt

Tabelle 5: Zusammenstellung der ermittelten freien Aminosäuren im Serum bei Panostitis-Patienten und gesunden Kontrolltieren. Die signifikant abweichenden Werte sind markiert und fettgedruckt.

| | Kontrolle | | Panostitis | | Varianzanalyse (P-Werte) | | | |
|------------|-------------|------|-------------|-----|--------------------------|---------------|--------------|--------------|
| | Mittelwert | SEM | Mittelwert | SEM | Panostitis | Alter | Rasse | Interaktion |
| ASP | 46 | 1.9 | 42 | 2.2 | 0.38 | 0.004 | 0.99 | 0.06 |
| GLU | 174 | 6 | 160 | 5.2 | 0.39 | 0.0003 | 0.73 | 0.027 |
| OH-PRO | 1870 | 16 | 223 | 44 | 0.45 | 0.28 | 0.5 | 0.11 |
| ASN | 156 | 6 | 171 | 13 | 0.37 | 0.006 | 0.31 | 0.19 |
| SER | 477 | 19 | 621 | 46 | 0.012 | 0.46 | 0.78 | 0.07 |
| GLN | 3315 | 91 | 3907 | 207 | 0.026 | 0.15 | 0.14 | 0.024 |
| GLY | 970 | 42 | 1264 | 126 | 0.020 | 0.22 | 0.85 | 0.08 |
| HIS | 268 | 8.8 | 317 | 12 | 0.047 | 0.56 | 0.08 | 0.075 |
| TAU | 340 | 16.5 | 304 | 38 | 0.45 | 0.65 | 0.053 | 0.41 |
| ARG | 727 | 23 | 913 | 61 | 0.008 | 0.14 | 0.047 | 0.014 |
| THR | 665 | 30 | 881 | 99 | 0.018 | 0.33 | 0.54 | 0.2 |
| ALA | 1382 | 61 | 1821 | 92 | 0.014 | 0.08 | 0.68 | 0.006 |
| PRO | 769 | 39 | 910 | 68 | 0.21 | 0.32 | 0.58 | 0.087 |
| TYR | 214 | 7 | 276 | 23 | 0.005 | 0.95 | 0.28 | 0.66 |
| VAL | 740 | 16 | 810 | 37 | 0.14 | 0.69 | 0.86 | 0.62 |
| MET | 233 | 8 | 285 | 20 | 0.039 | 0.31 | 0.19 | 0.36 |
| ILE | 282 | 7.4 | 292 | 16 | 0.65 | 0.87 | 0.39 | 0.93 |
| LEU | 581 | 15 | 600 | 39 | 0.66 | 0.72 | 0.62 | 0.84 |
| NH3 | 252 | 9 | 248 | 7.8 | 0.85 | 0.16 | 0.9 | 0.085 |
| PHE | 285 | 9 | 273 | 18 | 0.61 | 0.85 | 0.2 | 0.89 |
| TRP | 351 | 18 | 300 | 38 | 0.33 | 0.27 | 0.99 | 0.67 |
| ORN | 53 | 2 | 65 | 6.6 | 0.050 | 0.39 | 0.44 | 0.82 |
| LYS | 438 | 19 | 644 | 101 | 0.002 | 0.71 | 0.37 | 0.16 |

werden (Tab. 5). Je jünger die Hunde, desto höher waren die Mittelwerte der drei AS. Statistisch signifikante Interaktionen zwischen Alter und Rasse konnten für die AS Glutaminsäure, Glutamin, Arginin und Alanin gefunden werden, wobei die Zahl der Hunde in den einzelnen Gruppen sehr klein war und deshalb auf eine weitere Auswertung verzichtet wurde.

Knochenmarkaspiration

Die bei 5 Panostitishunden im Knochenmark bestimmten Totalprotein-Werte waren durchgehend niedriger als die im peripheren Blut ermittelten. Dabei ist zu bemerken, dass die Knochenaspiration im Anschluss an die medulläre Druckmessung durchgeführt wurde. Da diese Messung dazumal methodisch mit einer Spülung vergesellschaftet war, muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Phänomen um einen Verdünnungsartefakt handelt. Aus dem gleichen Grund dürfen die stark streuenden pH-Werte nicht interpretiert werden.

Knochenbiopsie

Histologie

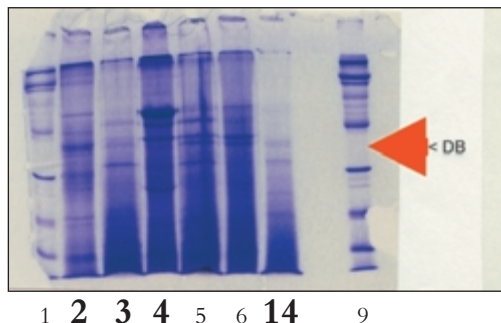
Die histologischen Resultate der entkalkten und

unkalkten Knochenschnitte entsprachen den Beschreibungen in der einschlägigen Literatur und sollen deswegen an dieser Stelle nicht erörtert werden.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Sämtliche 4 Panostitis-Hunde (Nr. 13, 14, 15, 16) zeigten im Überstand der mit SDS-vorbehandelten Knochenbiopsie eine Doppelbande, die mit Zuhilfenahme des «Standards» einem Molekulargewicht zwischen 31000 und 45000 Dalton zugeordnet werden konnte. Den beiden Referenzhunden fehlte diese Doppelbande. Sie zeigten an derselben Stelle lediglich eine Einfachbande (Abb. 1). Das Molekulargewicht der Doppelbande konnte mit Hilfe einer Graphik (relative Standardlänge auf dem Gel versus 10er-Logarithmus der Molekulargewichte der einzelnen Komponenten des «Standards») eingengt und mit 39000 Dalton bestimmt werden. Nach einer nachfolgenden Reduzierung mit 1%igem Mercaptoethanol blieb die Einfachbande der Referenzhunde erhalten, die Doppelbande mit dem kleineren Molekulargewicht von 39 kD allerdings war verschwunden. Es blieb ebenfalls nur eine Einfachbande zurück. Dies bedeutete, dass das Protein reduzierbar war.

Abbildung 1: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Im Überstand der mit SDS-vorbehandelten Knochenbiopsien konnte bei allen Panostitis-Hunden eine Doppelbande (DB) aufgezeigt werden (Säulen 2, 3, 4, 14), während bei den Referenzhunden (Säulen 5, 6) lediglich eine Einfachbande vorlag. Säulen 1 und 9 sind der «Standard».



Semi-Dry-Transfer

Wiederum war die Doppelbande auf allen sieben Säulen gut sichtbar. Die Trennung der beiden Banden war allerdings nicht ganz scharf.

Aminosäuren-Sequenzierung nach Edman

Die Ergebnisse der einzeln sequenzierten beiden doppelt erscheinenden Banden und die Erfassung der N-terminalen Aminosäuren wichen kaum voneinander ab, sodass mit grosser Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann, dass es sich bei den beiden Banden um dasselbe Protein handelt. Um dies zu bestätigen, führten wir deshalb die gesamten Aminosäuren-Analysen der Proteine dieser Banden durch. Es wurden somit alle Aminosäuren der zwei Banden analysiert; auf eine Reihenfolge musste jedoch verzichtet werden. Auch durch das Einlesen der Aminosäuren-Sequenz der 2. Bande in die Datenbank konnte kein Protein identifiziert werden.

Diskussion

Die Panostitis-Patienten unterschieden sich nach unseren durchgeführten Untersuchungen bezüglich der hämatologischen Resultate, wie auch des Chemieprofils statistisch nicht signifikant von den untersuchten gesunden Tieren. Die Tatsache, dass lediglich bei 2 Panostitis-Hunden eine absolute Eosinophilie aufgezeigt werden konnte, zeigt auf, dass gerade dieses Phänomen, das in der Literatur immer wieder als nahezu pathognomonische Krankheitserscheinung und als Leitsymptom (Panostitis eosinophila) hervorgehoben wird, diagnostisch überbewertet wird. Es darf davon ausgegangen werden, dass die Eosinophilie die «Morgenröte der Genesung», die in der Abheilphase jeder längerdauernden Entzündung zu erkennen ist, widerspiegelt.

Im Hinblick auf unsere ätiopathogenetische Hypothese sind einerseits der erkannte signifikante Einfluss der Panostitis auf das Aminosäuren-Profil im Serum und die entdeckte abnormale Doppelbande, die in der SDS-PAGE der Knochenbiopsie bei allen Panostitishunden ersichtlich wurde, von zentralem Interesse.

Der Diskussion des Aminosäurenprofils muss vorangestellt werden, dass die Futtermittel bezüglich ihrer Proteine sehr verschieden zusammengesetzt und teilweise sogar mit AS zusätzlich supplementiert sind. Allein eine übermässige und einseitige Fütterung könnte somit durchaus zu einer Protein- bzw. Aminosäuren-Imbalance führen.

Bei der Suche nach einem gemeinsamen ätiopathogenetischen Nenner ist zu bemerken, dass alle 11 bei den Panostitishunden signifikant veränderten AS via Acetoacetyl-CoA oder Succinyl-CoA, wie auch via Glutamat oder α -Ketoglutarat in den Zitronensäurezyklus eingeschleust werden. Der gemeinsame Abbauweg der ermittelten Panostitis-relevanten 11 AS ist daher ausschliesslich im Zitronensäurezyklus zu finden. Eine ätiologische Dysfunktion im Zitronensäurezyklus kann allerdings ausgeschlossen werden, weil die 12 übrigbleibenden AS, die durch die Panostitis unbeeinflusst blieben, gleichermassen über diesen Zyklus abgebaut werden. Auch die chemischen Strukturen der Seitenketten lassen keinen gemeinsamen Nenner zu, da bei den verschiedenen AS zum Teil unpolare, aliphatische, wie auch aromatische oder polare ungeladene, aber auch positiv geladene Seitenketten vorhanden sind. Ein Defekt bezüglich Transaminierung ist ebenfalls kaum vorstellbar, da nur 4 der 11 erhöhten AS transaminiert werden. Ebenso ist eine Dysfunktion in den spezifischen Transportcarriern des Darmepithels relativ unwahrscheinlich. Ein gemeinsamer biochemischer Nenner der 11 AS ist also nicht ersichtlich. Auch in der Humanmedizin ist nichts Vergleichbares bekannt (Wermuth, 1997; Trechsel, 1997).

Die aufgezeigte generelle Erhöhung der freien Aminosäuren in den Seren der Panostitishunde können somit noch nicht schlüssig interpretiert werden. Es kann allerdings immer noch nicht ausgeschlossen werden, dass durch eine exzessive qualitative und/oder quantitative Proteinfütterung der Aminosäuren- und Proteinstoffwechsel mitbetroffen sein könnte und dass es sich bei der Panostitis um eine periphere Imbalance z.B. des Aminosäurenstoffwechsels mit lokaler Auswirkung in den langen, juvenilen und entsprechend schnell wachsenden Röhrenknochen handeln könnte. Auf Grund dieser Mutmassungen erscheint deshalb eine Durchführung von quantitativen und qualitativen Futtermittelanalysen bezüglich Protein- und Aminosäurezusammensetzung im Rahmen

einer prospektiven Studie geradezu unumgänglich. Die Tatsache, dass bei allen vier Panostitishunden, bei denen eine SDS-Page durchgeführt wurde, eine Doppelbande mit einem Molekulargewicht von ca. 39000 D aufgezeigt werden konnte, die bei keinem gesunden untersuchten Hund auftrat, und die Erkenntnis, dass die Molekulargewichte der einzelnen dieser doppelt erscheinenden Banden nur geringe Schwankungen aufwiesen und dass der Unterschied zwischen den Proteinen dieser Doppelbande klein war, lässt den Schluss zu, dass es sich nur um eine biochemische Modifikation handelt. Interessant allerdings ist die Erkenntnis, dass gerade die heute intensiv diskutierten bekannten Knochenproteine, wie z.B. Osteopontin oder Osteonectin ein Molekulargewicht aufweisen, das sich in einem ähnlichen Rahmen bewegt, wie die entdeckte Doppelbande (Agnihotri et al., 2001). Sie könnten somit in der Aetiopathogenese der Panostitis eine gewisse Rolle spielen.

Die Hypothese, dass eine exzessive Eiweissfütterung ein ätiologischer Kardinalparameter der Panostitis sein könnte, basiert auf empirischen Daten einer früher durchgeführten Pilotstudie (Schawwalder et al., 1989). Dabei wird davon ausgegangen, dass die eiweissinduzierte Osmose im starren, knöchernen Kompartiment «Knochen» einen erhöhten Druck aufbaut und die Mikrovascularisation und damit die gesamte lokale Trophik mit allen Konsequenzen inkommodiert. In diesem Zusammenhang war die Tatsache, dass durch die proteolytische Wirkung von Benzopyron oder Ca-Dobesilat bei klinischen Patienten sehr effektiv und schnell auf das Krankheitsgeschehen Einfluss genommen werden konnte.

Die bis anhin allgemein anerkannten Hypothesen von Wilkens (1987) und Daemrich (1989), welche die Ursache des chronischen, diaphysären Knochenmark-Ödems in der chronischen Stauungshyperämie sahen und diese wiederum auf eine wachstumsbedingte Verengung der corticalen Gefässkanäle (Foramina nutritiva), bzw. auf die trajektorieknöchernen Ummantelung der Markgefässe an den während des Wachstums stark belasteten langen Röhrenknochen zurückführten, kann im Umfeld der Biomechanik noch verstanden werden. Gerade bei grosswüchsigen Hunderrassen kann die durch den anabolen Effekt einer energetisch überschüssigen und proteinreichen Fütterung über vermehrte Muskelbildung zur erhöhten Skelettbelastung und Skelettmalformation führen. Die eigenen Untersuchungsergebnisse, die mittels MRI und Osteomedullographie gewonnen werden konnten (Schawwalder et al., 2002), zeigen allerdings deutlich, dass die Foramina nutritiva nicht Ort und Ursache eines venösen Rückstaus und des daraus resultierenden Oedems sein kön-

nen, sondern dass sich das Krankheitsgeschehen gleichermaßen auch auf die äusseren Knochenge-webe (Periost) ausdehnt.

Die eigene Hypothese konnte im Rahmen dieser durchgeführten Labor-Studie nicht schlüssig bestätigt werden. Jedoch geben bestimmt die 11 signifikant erhöhten Aminosäuren der an Panostitis erkrankten Hunden einen Hinweis auf eine Aminosäuren-Imbalance in der Peripherie, währenddem die Doppelbande in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der Knochenbiopsie eher auf ein lokales Problem des Proteinstoffwechsels des Knochens hinweist.

Zum besseren Verständnis dieser neuen Erkenntnisse sind allerdings weitere umfassende Arbeiten, wie z.B. auf dem Gebiet der Futtermittelanalytik, bezüglich Aminosäuren- und Proteinzusammensetzung, notwendig. Auch diskutierte mögliche Zusammenhänge mit dem Fettstoffwechsel zur Erklärung einer tromboembolischen Einflussnahme bei ischämischen, trophischen Knochen-erkrankung, wie beispielsweise die aseptische Epiphysennekrose oder im noch weiteren Sinn die Osteochondrosen, sowie die nachgewiesene vermehrte Gefässdurchlässigkeit im Umfeld dieses sich abzeichnenden Krankheitskomplexes müssen noch grundlegend untersucht werden.

Ausblick

Zwischenzeitlich konnten wir im Rahmen anderer Studien Erkenntnisse gewinnen, die im Zusammenhang auch mit den erzielten Resultaten der obigen Panostitis-Studie von grösstem Interesse sind (Berger et al., 2001). Die in den Biopaten der Panostitis-veränderten Knochen gewonnenen neuen Erkenntnisse, insbesondere die Doppelbande in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, erhärten unseren Verdacht, dass Knochenproteine, wie Osteopontin, Osteonectin oder Sialoprotein, eine zentrale Rolle im Krankheitsgeschehen der Panostitis spielen könnten.

Vor dem Hintergrund der «Lehre der funktionellen Anpassung» des Knochens (Roux, 1895) oder des Wolff'schen Knochentransformationsgesetzes (Wolff, 1892) untersuchen wir zur Zeit den Einfluss einer fehlerhaften, übermässigen fokalen mechanischen Belastung eines Gelenksabschnitts, wie er beispielsweise bei einer vorliegenden Dysplasie, einer Gelenksinkongruenz anderer Genese (fehlerhafte Gelenksgeometrie), einer Gelenksinstabilität oder auch einer generellen skelettären Überbelastung infolge eines frühjuvenilen beschleunigten Wachstums im Zusammenhang mit den konsequenten Entzündungsprozessen vor- kommt.

Die sich abzeichnende Erkenntnis, dass der Fluss der Knochengewebssäure (Strömungsverläufe) und veränderte Spannungsverläufe im Knochen die adaptive Knochen-Transformation (Osteosklerose zu Ungunsten der Mikrovaskularisation) und die intraossären Flüssigkeits-Druckverhältnisse zu einer gestörten Trophik führen und auch biochemische Reaktionen hervorrufen, könnte der gemeinsame Nenner oder die «nosokomiale Einheit» einer breiten orthopädischen Krankheitspalette, wie Osteochondrosis dissecans, aseptische Epiphysennekrosen (aseptische Femurkopf- und Humerusnekrose), atraumatische Epiphysiolysen, Dysplasieformen mit deren Konsequenzen (Fragmentierter Processus Coronoideus, Isolierter Processus anconaeus), Panostitis, Craniomandibuläre Osteoarthropathie, Hypertrophe Osteodystrophie, u.a.m., bedeuten.

Dank

Es ist uns ein Bedürfnis, allen zu danken, die einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. Insbesondere gilt unserer Dank: Herrn Dr. R. Bruckmeier, Abteilung für Ernährungspathologie des Institutes für Tierzucht der Universität Bern, für die freund-

liche Zusammenarbeit in Zusammenhang mit Hormonanalysen, für die Unterstützung in statistischer Auswertungen. Herrn Dr. H.J. Häni, Institut für Tierpathologie, für die kompetente histologische Beurteilung der Knochenbiopsien. Frau Dr. G. Neiger-Aeschbacher, Abteilung für Anästhesie des Tierspitals Bern, für die Mithilfe bei mehreren Narkosen und für die Blutentnahmen. Herrn Dr. S. Spycher, Institut für Molekularbiologie der Universität Bern, für all die Zeit, die er für unsere Probleme bezüglich Proteinaufreinigung zur Verfügung stellte. Herrn Dr. J. Schaller und Herrn U. Kämpfer, Institut für Biochemie der Universität Bern, für die grosszügige Unterstützung bezüglich Aminosäuren-Analytik, Herrn Dr. F. Käppeli, Labor Medica in Zürich, für die zahlreichen und unentgeltlich bestimmten Analysen im Bereich Spurenelemente- und Hormonanalysen und Dr. Judith Howard für Übersetzungsarbeiten.

Die Durchführung dieses Projekts wurde ermöglicht dank der Finanzierung der Doktorandenstelle von Frau K. Jutzi durch die Waltham-Forschung Deutschland, dem finanziellen Zuschuss an Herrn H.U. Andres durch die Firma Diavet, CH 8806 Bäch und dank der Unterstützung durch die Albert Heim-Stiftung.

La panostéite du chien – une maladie cryptogénétique du squelette vue sous l'angle d'une nouvelle hypothèse sur l'étiopathogénèse.

Partie 2: Aspects biochimiques et autres examens

Dans le cadre de cette étude pilote, le calcium ionisé, le cuivre, le zinc ainsi que les profils des hormones et des acides aminés ont été analysés dans les sérums de chiens atteints de panostéite. De plus, des protéines obtenues de biopsies d'os ont été séparées. Les examens ont révélés les résultats suivants: le calcium ionisé, le cuivre, le zinc et les hormones (hormone parathyroïdienne, IGF-1, T3 et T4) se trouvaient dans le domaine de référence. Onze parmi 23 acides aminés dans le sérum des chiens atteints de panostéite étaient caractérisés par des valeurs élevées. À l'aide d'électrophorèse (dodécylsulfate de sodium et gel polyacrylamide), une bande double avec un poids moléculaire de 39000 D a pu être isolée et identifiée dans le surnageant d'os traités avec du dodécylsulfate de sodium chez tous les chiens atteints de panostéite. Les chiens de référence avaient à cet endroit uniquement une bande simple. Il n'a pas été possible de déterminer la séquence des acides aminés des protéines de l'extrémité N-terminale de la bande double, probablement à cause d'un blocage chimique de l'extrémité N-terminale. La nature de cet bande double demeure inconnue. L'étiologie de la panostéite n'a donc pas pu être totalement vérifiée dans le cadre de ce travail. Le métabolisme des protéines et des acides aminés des chiens atteints de panostéite semble réellement être altéré.

La panostite nel cane: una malattia criptogenetica dello scheletro dal punto di vista di una nuova ipotesi etiopatogenetica.

Parte 2: aspetti ed esami biochimici

Nel contesto di questo studio pilota sono stati analizzati in sieri di cani affetti da panostite i profili del calcio ionizzato, del rame, dello zinco, di ormoni e aminoacidi. A queste analisi sono state integrate scissioni di proteine derivate da biopsie ossee. Da questi esami sono derivati i seguenti risultati: i valori del calcio ionizzato, del rame, dello zinco ed i risultati degli ormoni (ormone paratiroide IGF-1, T3 e T4) si trovavano nella zona di referenza. I valori di 11 aminoacidi su 23 nel siero di cani affetti da panostite sono aumentati in maniera significativa ($p < 0.05$). Con l'aiuto della SDS-gelelettroforesi poliacrilamide è stato possibile separare e rappresentare nell'estratto di biopsie delle ossa, trattate con SDS, di tutti i pazienti affetti da panostite una banda doppia con un peso molecolare di 39000 D. Tutti i cani di referenza mostravano nella posizione corrispondente soltanto una banda singola. Probabilmente a causa di un blocco chimico del terminale N non è stato possibile fare la sequenza degli aminoacidi delle proteine della banda doppia a partire dal terminale N. La natura di questa banda doppia è per il momento sconosciuta. L'etiologia della panostite non ha quindi potuto essere verificata completamente nell'ambito di questo studio. Comunque il metabolismo delle proteine e degli aminoacidi di cani affetti da panostite sembra essere effettivamente modificato.

Literatur

Agnihotri R., Crawford H. C., Haro H., Matrisian L. M., Havrda M. C., Liaw L.: Osteopontin, a novel substrate for Matrix Metalloprotease-3 (Stromelysin-1) and Matrix Metalloproteinase-7 (Matrilysin). *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 28261–28267.

Andres H.U.: Die Panostitis beim Hund. Eine kryptogenetische Skeletterkrankung im Blickwinkel einer neuen ätiopathogenetischen Hypothese (Klinische Erhebungen), Dissertation, Universität Bern, 1996.

Baumann R., Pommer A.: Die chronische Osteomyelitis der jungen Schäferhunde. *Wien. tierärztl. Mschr.*, 1951, 10: 670–676.

Berger M., Stich H., Schaffner T., Bosshardt D.D., Lutz H., Lussi A., Schawalder P.: New approaches to the

study of Feline Odontoclast Resorptive Lesions. *Proceedings 10th EVD Congress, Berlin, 2001.*

Bidlingmeyer B.A., Cohen S.A., Tarvin T.L.: Rapid Analysis of Amino Acids using Pre-Column Derivatization. *Journal of Chromatography* 1984, 336: 93–104.

Blum J.W., Zentek J., Meyer H.: Untersuchungen zum Einfluss einer unterschiedlichen Energieversorgung auf die Wachstumsintensität und Skelettentwicklung bei wachsenden Doggen. 2. Mitteilung: Einfluss auf den insulinähnlichen Wachstumsfaktor I und auf Schilddrüsenhormone. *J.Vet. Med.* 1992, 39: 568–574.

Böhning R.H., Suter P.F., Hohn R.B., Marshall J.: Clinical and Radiologic Survey of Canine Panosteitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1979, 156: 870–883.

- Brody T.: Nutritional Biochemistry. Academic Press 1994, Inc: 413–427.
- Burt J.K., Wilson G. P.: Progress in Veterinary Radiology. A Study of Eosinophilic Panosteitis (Enostosis) in German Shepherd Dogs. Acta Radio 1972, Suppl. 319: 7–13.
- Clauss S.: Ein Beitrag zur Panostitis des Hundes. Dissertation, Universität München, 1991.
- Cotter S. M., Griffiths R. C., Leav I.: Enostosis of Young Dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1968, 153: 401–410.
- Dämmrich K.: Zur Pathogenese der Skelettkrankheiten bei Hunden und Katzen. Wien. Tierärztl. Mschr. 1981, 68: 109–114.
- Edman P.: On the Mechanism of the Phenyl Isothiocyanate Degradation of Peptides. Acta Chemica Scandinavica 1956, 10: 761–768.
- Fricker C., Bucher K., Stucker G.: Sind degenerative Gelenkerkrankungen chronische Kompartmentsyn-drome? Schweiz. Arch. Tierheilk. 1995, 137: 137–140.
- Gratzl E.: Die eosinophile Panostitis der Junghunde. Wien. Tierärztl. Mschr. 1951, 38: 629–670.
- Hardy W. D., Stockmann W.S.: Clinico-Pathologic Conference. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1969, 154: 1600–1608.
- Hazewinkel H.A.W., Goedegebuure S.A., Poulos P.W.: Influences of Chronic Calcium Excess on the Skeletal Development of Growing Great Danes. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 1985, 21: 377–391.
- Hazewinkel H.A.W., van den Brom W.E., van't Klooster A. Th.: Calcium Metabolism in Great Dane Dogs Fed Diets with Various Calcium and Phosphorus Levels. J. Nutr. 1991, 121: 99–106.
- Jutzi K.: Die Panostitis beim Hund. Eine kryptogenetische Skeletterkrankung im Blickwinkel einer neuen ätiopathogenetischen Hypothese (Biochemische Aspekte), Dissertation, Universität Bern, 1996.
- Lämmli U.K.: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 1970, 227: 680–685.
- Lengweiler S.: Identifizierung der Disulfidbrücken in der Komponente C9 des humanen Komplementsystems. Dissertation, Universität Bern, 1995.
- Nap R.C., Hazewinkel H.A.W., Voorhout G., Biewenga W.J., Koeman J.P., Goedegebuure S.A., van't Klooster A. Th.: The Influence of the Dietary Protein Content on Growth in Giant Breed Dogs. Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology 1993a, 6: 1–8.
- Nap R.C., Mol J.A., Hazewinkel H.A.W.: Age-Related Plasma Concentrations of Growth Hormone (GH) and Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) in Great Dane Pups Fed Different Dietary Levels of Protein. Dom. Anim. Endocrinol. 1993b, 1013: 237–247.
- Petho A.: Efficacy of Benzopyrones in Posttraumatic Inflammations/Clinical Double Blind Study in the Postoperative Treatment of Episiotomy. Arzneimittel-forschung 1981, 31: 1303–1307.
- Roux W.: Gesammelte Abhandlungen über Entwicklungsmechanik der Organismen. Leipzig 1895
- Schawalder P., Sutter M.: Ätiopathogenetische Untersuchungen der Panostitis beim Hund. Unveröffentlichte Pilotstudie, Vet. Med.-Fakultät, Bern, 1989.
- Schawalder P., Andres H., Jutzi K., Stoupis C., Bösch C.: Die Panostitis beim Hund – eine kryptogenetische Skeletterkrankung im Blickwinkel einer neuen ätiopathogenetischen Hypothese. Teil 1: Klinische und diagnostische Aspekte. Schweiz. Arch. Tierheilk. 2002, 144: 115–130.
- Schawalder P., Jutzi K., Andres H.U.: Neue Erkenntnisse zur Panostitis des Hundes – ätiopathogenetische, diagnostische und therapeutische Aspekte. Referatband 126–128, BPT-Kongress, Nürnberg, 5.–8. September, 1996.
- Scheunert A., Trautmann A.: Lehrbuch der Veterinär-Physiologie. Parey Buchverlag 1987, 93–112, 454–459.
- Stoupis C., Schawalder P., Aeschbacher G., Andres H.U., Jutzi K., Boesch C.: Panostitis: Assessment with Gd-enhanced MR imaging compared to invasive techniques in a dog model. Abstract Form for Scientific of Magnetic Resonance Third Scientific Meeting. Rom, 1995.
- Trachsel U.: Sandoz, Basel, Persönliche Mitteilung 1996.
- Wermuth B.: Klinische Chemie, Inselspital Bern: Persönliche Mitteilung 1996.
- Wilkens S.: Pathologisch-anatomische und -histologische Untersuchungen zur Pathogenese der Enostose der langen Röhrenknochen bei Hunden grosswüchsiger Rassen. Dissertation, Universität Berlin, 1987.
- Wölff J.: Das Gesetz der Transformation der Knochen. Berlin, August Hirschwald, 1892.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Peter Schawalder, Abteilung Chirurgie und Orthopädie des Departements für klinische Veterinärmedizin der Vet.-med.-Fakultät der Universität Bern, Länggassstrasse 128, CH-3012 Bern.
Fax: +41 31 631 22 96, E-Mail: peter.schawalder @ kkh.unibe.ch

Manuskripteingang: 7. Dezember 2000

In vorliegender Form angenommen: 28. Januar 2002