Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin

(Direktor Univ.-Prof. Dr. med. M. Nauck)

der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Die Assoziation zwischen Knochenfestigkeit und Chemerin in Bezug auf den Body-Mass-Index: Ergebnisse der bevölkerungsbasierten SHIP-Trend- Studie

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der Universitätsmedizin Greifswald

2020

vorgelegt von:

Lejla Kadrić

geb. am 22.02.1991

in Sarajevo

Dekan: Herr Prof. Karlhans Endlich

1. Gutachterin: Frau PD Dr. Nele Friedrich

2. Gutachterin: Frau Prof. Dr. Martina Rauner

Ort, Raum: Zoom Videokonferenz, Meeting-ID: 677 2599 0591

Tag der Disputation: 17.12.2020

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS ..... - 4 -

TABELLENVERZEICHNIS ..... - 4 -

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... - 5 -

1. EINLEITUNG ..... - 6 -

1.1 Bedeutung von Übergewicht und Fettgewebe ..... - 6 -
1.1.1 Adipokine ..... - 7 -
1.1.2 Chemerin ..... - 8 -
1.2 Knochen ..... - 9 -
1.2.1 Osteoporose ..... - 9 -
1.2.2 Entstehung von Osteoblasten, Osteoklasten und Adipozyten ..... - 10 -
1.3 Zusammenhang zwischen Chemerin und Knochen ..... - 11 -
1.4 Herleitung der Fragestellung ..... - 12 -

2. METHODEN ..... - 13 -

2.1 Die Study of Health in Pomerania ..... - 13 -
2.2 Studienpopulation ..... - 14 -
2.3 Chemerin-Messung ..... - 16 -
2.4 QUS-Messung ..... - 16 -
2.5 Statistische Analysen ..... - 17 -

3. ERGEBNISSE ..... - 19 -

3.1 Charakteristika der Studienpopulation ..... - 19 -
3.2 Assoziationen zwischen Chemerin und den QUS-Parametern ..... - 19 -

4. DISKUSSION ..... - 23 -

4.1 Vergleichende Ergebnisse anderer epidemiologischer Studien im Hinblick auf die Assoziation zwischen Chemerin und Knochen ..... - 23 -
4.2 Chemerin bei Adipositas ..... - 24 -
4.3 Unterschiede BUA und SOS ..... - 25 -
4.4 Pathophysiologie – Hinweise aus experimentellen Studien ..... - 25 -
4.5 Stärken und Limitationen ..... - 27 -
4.6 Schlussfolgerung ..... - 28 -

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK ..... - 29 -

6. LITERATURVERZEICHNIS ..... - 31 -

7. ANHANG ..... - 35 -

7.1 Wissenschaftliche Arbeit ..... - 35 -
7.2. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift ..... - 66 -
7.3 Eidesstattliche Erklärung ..... - 67 -

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: ENTSTEHUNG VON OSTEOBLASTEN /-KLASTEN, ADIPOZYTEN ..... - 10 -
ABBILDUNG 2: FLOW-CHART ZUR SELEKTION DER STUDIENPOPULATION..... - 15 -
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER QUS-MESSUNG AM CALCANEUS MIT DEM ACHILLES INSIGHT. ..... - 16 -
ABBILDUNG 4: ASSOZIATION ZWISCHEN DER PLASMACHEMERINKONZENTRATION UND DEM QUS-BASIERTEN OSTEOPOROTISCHEN FRAKTURRISIKO STRATIFIZIERT NACH GESCHLECHT UND BMI GRUPPEN ..... - 22 -

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: CHARAKTERISTIKA DER STUDIENPOPULATION STRATIFIZIERT NACH GESCHLECHT UND BODY MASS INDEX ..... - 20 -
TABELLE 2: ASSOZIATION ZWISCHEN DER PLASMACHEMERINKONZENTRATION UND DEN QUS-BASIERTEN PARAMETERN STRATIFIZIERT NACH GESCHLECHT UND BODY MASS INDEX ..... - 21 -

Abkürzungsverzeichnis

ATC-CODE	ANATOMISCH-THERAPEUTISCH-CHEMISCHES KLASSIFIKATIONSSYSTEM
BMI	BODY-MASS-INDEX
BUA	BROADBAND ULTRASOUND ATTENUATION (BREITBANDULTRASCHALLABSCHWÄCHUNG)
CMKLR1	CHEMOKINE-LIKE-RECEPTOR 1
DXA	DUAL-X-RAY-ABSORPTIOMETRY (DUALE RÖNTGEN ABSORPTIOMETRIE)
ELISA	ENZYME- LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY
GFR	GLOMERULÄRE FILTRATIONSRATE
HBA1C	GLYKOSYLIERTES HÄMOGLOBIN
HSC	HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLE
IL- 6	INTERLEUKIN- 6
KI	KONFIDENZINTERVALL
MCSF	MAKROPHAGEN-KOLONIE-STIMULIERENDER-FAKTOR
OECD	ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (ORGANISATION FÜR WIRTSCHAFTLICHE ZUSAMMENARBEIT UND ENTWICKLUNG)
QUS	QUANTITATIVE ULTRASOUND (QUANTITATIVE ULTRASCHALLUNTERSUCHUNG)
RANKL	RECEPTOR ACTIVATOR OF NF-KB LIGAND
SD	STANDARDABWEICHUNG
SHIP	STUDY OF HEALTH IN POMERANIA
SI	STIFFNESS INDEX (STEIFIGKEITSINDEX)
SOS	SPEED OF SOUND (SCHALLGESCHWINDIGKEIT)
TNF α	TUMORNEKROSEFAKTOR α
WHO	WORLD HEALTH ORGANISATION (WELTGESUNDHEITSORGANISATION)

1. Einleitung

1.1 Bedeutung von Übergewicht und Fettgewebe

Übergewicht gilt als eines der bedeutsamsten Probleme für die öffentliche Gesundheit im 21. Jahrhundert. Laut Schätzungen der WHO sind zwischen 30 und 80% der Erwachsenen in den Ländern der Europäischen Region übergewichtig (1). Seit den 1980er Jahren hat sich die Prävalenz der übergewichtigen Erwachsenen verdreifacht und erreicht epidemische Ausmaße (1). Übergewicht ist ein tragender Risikofaktor für ischämische und hypertensive Herzkrankheiten, ischämische Schlaganfälle sowie für die Entwicklung einer Vielzahl von Karzinomen, z.B. dem Kolon- oder Endometriumkarzinom. Mehr als dreiviertel der Diabetes mellitus Typ 2-Fälle sind ursächlich auf Übergewicht zurückzuführen (1). Jährlich verursachen die Folgeerkrankungen des Übergewichtes mehr als eine Million Todesfälle sowie mehr als 12 Millionen krank verbrachte Lebensjahre in der Europäischen Region (1). Diese Entwicklung stellt gesundheitspolitisch eine massive Herausforderung dar. Durch steigende direkte Kosten wie häufigere und zeitaufwändigere Arztbesuche sowie durch indirekte Kosten wie Produktivitätsverluste und Einkommenseinbußen, kommt es zu ökonomischen Belastungen für die Gesellschaft.

Generell ist Übergewicht ein Zeichen des Ungleichgewichtes zwischen Energiezufuhr und Energieverbrauch (2, 3). Gemäß den Vorgaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird der Body-Mass-Index (BMI) als Indikator für Übergewicht genutzt (4). Der BMI ist ein Maß zur Bewertung der Körpermasse im Verhältnis zur Körperoberfläche. Laut WHO liegt Normalgewicht bei einem BMI zwischen 18,50 kg/m² und 24,99 kg/m² vor. Als Übergewicht oder Präadipositas wird ein Body-Mass-Index zwischen 25,00 kg/m² und 29,99 kg/m² definiert. Fettleibigkeit, oder Adipositas, hingegen beginnt definitionsgemäß ab einem BMI von 30,00 kg/m² (1).

Während eine übermäßige Akkumulation von Fettgewebe negative Konsequenzen für die Gesundheit hat, ist ein der Norm entsprechender Körperfettanteil unverzichtbar. Das Fettgewebe befindet sich in der Unterhaut und an Organen und ist der wichtigste Energiespeicher des Menschen. Fettgewebe fungiert darüberhinaus als endokrines Organ (5) und sezerniert über die Fettgewebszellen eine Vielzahl von Hormonen, wie Leptin, Resistin, Adiponektin und Chemerin (6–8). Zudem wirkt es über die Sekretion weiterer bioaktiver Moleküle, wie dem Enzym Aromatase, auf die Biosynthese der

Östrogene ein und somit auch im Knochenstoffwechsel (6–8). Es hat außerdem eine tragende Rolle in der Aufrechterhaltung des Glukosehaushalts (2, 6–8). Verschiedene Reize, wie u.a. das oben genannte Ungleichgewicht zwischen Energiezufuhr und Energieverbrauch, können jedoch zu einer Adipozytenhyptertrophie mit Übergewicht und Fettleibigkeit führen (14).

1.1.1 Adipokine

Adipokine (syn. Adipozytokine) sind Proteine, die endokrin aktiv sind. Sie werden von Adipozyten produziert und sezerniert (3). Unter pathophysiologischen Bedingungen können sie auch von anderen Zellen, wie Makrophagen, Fibroblasten oder Myozyten hergestellt werden (9). Mit ihren komplexen, regulatorischen Eigenschaften beeinflussen Adipokine u.a. die Insulinempfindlichkeit und die Glukose- und Gewichtsregulation sowie den Energiestoffwechsel (3). Aktuell sind zahlreiche Adipokine identifiziert. Zu den bekanntesten Adipokinen gehören Leptin, Adiponektin, Resistin, Visfatin, Chemerin und Apelin sowie die Zytokine TNF-α und IL-6 (3). Eines der bislang am besten erforschten Adipokine ist Leptin. Es hemmt physiologisch das Hungergefühl (10). Die vielversprechende Idee von Leptin als medikamentösem Appetitzügler wurde jedoch verworfen, als bekannt wurde, dass übergewichtige Personen eine Leptinresistenz ausbilden und sich die erhoffte Wirkung auf die Zielneuronen nicht beobachten lässt. (10).

Adipokine haben mannigfaltige Auswirkungen auf das Immunsystem, indem sie pro- oder antiinflammatorisch wirken und weisen dadurch eine enge Verbindung zu verschiedenen chronischen Inflammationskrankheiten auf (3, 9, 11, 12). Darüberhinaus belegten zahlreiche weitere Studien die Beeinflussung von Entzündungsprozessen durch Adipokine (13–15). In den vergangenen Jahren wurden zudem vermehrt Studien publiziert (7, 9, 13–16), die sich mit der Beeinflussung des Knochenumbaus durch Adipokine beschäftigen. Adiponektin z.B., wirkt über die Stimulation von Osteoblastenrezeptoren fördernd auf die Osteoblastogenese und beeinträchtigt somit indirekt die Neuentstehung von Osteoklasten. Seine Konzentration ist bei adipösen, bzw. übergewichtigen Probanden erniedrigt, unterliegt aber auch einem altersabhängigen Anstieg (9).

Insgesamt ist die derzeitige Studienlage zu den verschiedenen Adipokinen und vor allem zu deren klinischem Nutzen zwar vielversprechend, lässt aber noch keine

abschließende Beurteilung zu. Um den klinischen Nutzen der Adipokine in Zusammenhang mit Fettleibigkeit und weiteren Erkrankungen besser verstehen zu können, werden weitere experimentelle, als auch epidemiologische Studien benötigt.

1.1.2 Chemerin

Chemerin ist seit 2007 ein Mitglied der Adipokinfamilie (17). Die Erstbeschreibung erfolgte schon 1997, damals als Tazarotene-induziertes-Gen 2 Protein in psoriatrischen Hautläsionen (18). Es ist ein 16 kDa schweres Polypeptid, welches zunächst als 18 kDa schweres Prä-Prochemerin, bestehend aus 163 Aminosäuren, sezerniert wird (17, 19–21). Anschließend entsteht durch die Abspaltung am N-terminalen Ende ein biologisch inaktives Prochemerin mit 143 Aminosäuren (21). Es wird angenommen, dass der Großteil des zirkulierenden Chemerins im menschlichen Körper als inaktives Prochemerin vorliegt (19, 20, 22). Durch eine Abspaltung am C-terminalen Ende des Prochemerins, entstehen verschiedene Isoformen, die unterschiedliche biologische Aktivität aufweisen. Die biologisch aktivste Form, das Chem157S, entsteht nach Abspaltung von Aminosäuren durch extrazelluläre Proteasen (19, 20, 22, 23). Bislang wurden drei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beschrieben, an die Chemerin bindet (23). Dazu zählen der Chemokine Rezeptor-like 2 (CCRL2), der Orphan-Rezeptor GPR1 sowie der Chemokine-like-Rezeptor 1 (CMKLR1) (23). Der größte Anteil der bis dato erforschten biologischen Aktivität von Chemerin wird der Bindung an CMKLR1 zugeschrieben (23).

Seitdem 2007 beschrieben wurde, dass Chemerin und sein Rezeptor CMKLR1 von weißem Fettgewebe sezerniert werden und deren Genexpression mit zunehmender Differenzierung der Adipozyten und somit auch mit zunehmender Fettmasse stark ansteigen, besteht ein Interesse daran, Chemerin in Zusammenhang mit Adipositas-assoziierten Erkrankungen genauer zu erforschen (24). CMKLR1 beeinflusst als Rezeptor eines Adipokins die Neuentstehung und Ausreifung der Adipozyten (24, 25). Die Anwesenheit von Chemerin in den frühen Entstehungsphasen der Adipozyten ist essenziell (24, 25). Wird Chemerin oder sein Rezeptor CMKLR1 blockiert oder neutralisiert, kommt es nicht zur Ausdifferenzierung in reife Adipozyten (24, 25). Ebenso ist ein Verlust an CMKLR1 assoziiert mit einer Reduktion der Körperfettmasse und des Übergewichtes (20, 25). Jedoch finden sich hohe Genexpressionen von Chemerin und CMKLR1 nicht nur in weißem Fettgewebe, sondern u.a. in der Plazenta,

Leber, Lunge, im braunen Fettgewebe, sowie in den Nieren und der Skelettmuskulatur(23, 24).

1.2 Knochen

1.2.1 Osteoporose

Osteoporose zählt zu den systemischen Erkrankungen des Skelettsystems. Ihr zugrunde liegt eine Abnahme der Knochenmasse sowie eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochens (26). Aussagen der WHO zufolge, gehört sie zu den zehn bedeutsamsten Erkrankungen der Welt und stellt ein immer größer werdendes Problem in der Allgemeinbevölkerung dar (26, 27). Der aktuell festgelegte Goldstandard zur Osteoporosediagnostik ist die Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DXA) (26, 27). Laut WHO kann definitionsgemäß von einer Osteoporose gesprochen werden, wenn die Knochenmineraldichte mindestens 2,5 Standardabweichungen (SD) unter dem Durchschnitt junger, gesunder Erwachsener liegt.

Klinisch tritt die Osteoporose über Frakturen in Erscheinung, besonders im Bereich des Femurs und der Wirbelsäule. Sie ist zwar überwiegend eine Alterserkrankung, kann sich jedoch auch bei Jüngeren manifestieren (7, 23). Aufgrund des Rückgangs der Geburtenrate und der gleichzeitig älter werdenden Bevölkerung soll Schätzungen zufolge im Jahr 2030 jeder 5. Bewohner der OECD- Länder über 65 Jahre alt sein. In Deutschland soll der Anteil der über 65- jährigen dann sogar bei 29% liegen (27). Im Hinblick auf diese Entwicklung ist mit einem vermehrten Auftreten von osteoporotischen Frakturen und damit verbundenen Krankenhausaufenthalten zu rechnen. Dies wiederum wird zu stark ansteigenden Kosten für das Gesundheitssystem führen. Des Weiteren resultiert durch frakturbedingte Immobilisationen eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität für die Betroffenen (27).

Als schützend vor Osteoporose gilt vor allem eine ausgewogene mechanische Belastung des Knochens (27). Eine Reihe an Risikofaktoren hingegen wird als fördernd für die Entstehung einer Osteoporose angesehen (27). Hierzu zählen modifizierbare Faktoren, wie vor allem Untergewicht (definiert als BMI unter 20 kg/m²), Nikotinkonsum sowie ein riskanter Alkoholkonsum (27). Da Frauen etwa viermal häufiger von Osteoporose betroffen sind als Männer, zählen das weibliche Geschlecht,

aber auch die Postmenopause sowie ein hohes Lebensalter und die Einnahme von Medikamenten wie Steroiden, Antiandrogenen, Antiepileptika, Antidepressiva, u.v.m., als nicht-modifizierbare Triggerfaktoren (6, 7, 26, 27).

1.2.2 Entstehung von Osteoblasten, Osteoklasten und Adipozyten

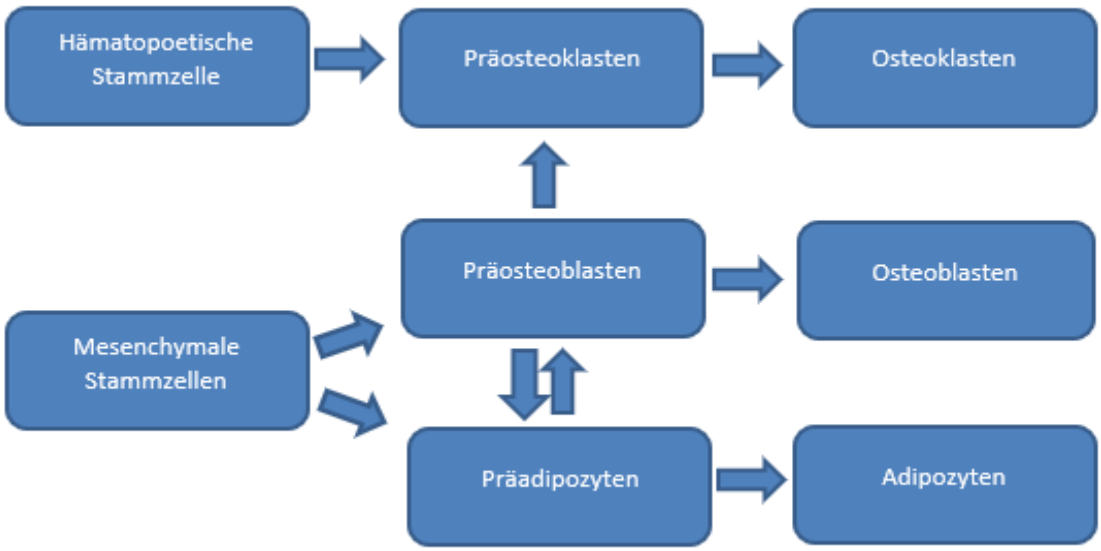

***Abbildung 1**: Entstehung von Osteoblasten, Osteoklasten und Adipozyten. Eigene Darstellung.*

Der Knochen gehört zu den dynamischen Geweben des Körpers, die einem lebenslangen Auf- und Abbau unterliegen. Ziel des Umbauvorgangs ist die Bildung einer optimalen Knochenarchitektur unter Berücksichtigung der individuellen Belastung. Wie **Abbildung 1** zeigt, gehen die auf- und abbauenden Zellen des Knochens maßgeblich von zwei Zellreihen aus: den mesenchymalen und den hämatopoetischen Stammzellen. Die aus den mesenchymalen Stammzellen hervorgehenden Osteoblasten, sind am Knochenaufbau, die aus den hämatopoetischen Stammzellen entstehenden Osteoklasten am Knochenabbau beteiligt. Knochenauf- und -abbau stehen physiologisch im Gleichgewicht, jedoch können verschiedene Faktoren dazu führen, dass die empfindliche Homöostase zugunsten eines vermehrten Knochenabbaus bzw. eines vermehrten Knochenaufbaus verschoben wird (9, 11). Kurzzeitig kommt dieser Mechanismus in Form der

Frakturheilung zu tragen. Längerfristig resultierende Folgen einer manifesten Störung der Knochenhomöostase sind Osteoporose bzw. Osteopenie, sowie das entsprechende Gegenstück, die Osteopetrose (9, 28).

1.3 Zusammenhang zwischen Chemerin und Knochen

Sowohl Präadipozyten als auch Präosteoblasten differenzieren aus den gleichen Vorläuferzellen, den mesenchymalen Stammzellen (**Abbildung 1**). Chemerin beeinflusst die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen, wie eine experimentelle Studie von Muruganandan et al. nachweisen konnte (29). Wird Chemerin und damit sein zugehöriger Rezeptor CMKLR1 blockiert bzw. kommt es zur Unterbrechung des Signalweges und der Expression von PPARγ, so nimmt auch die Ausdifferenzierung der Adipozyten nahezu gänzlich ab. Gleichzeitig wird die Osteoblastogenese gefördert (29). Muruganandan und Kollegen (29) fanden zudem heraus, dass ein kompetitives Zusammenspiel zwischen dem Wnt-Signalweg, welcher die Osteoblastogenese fördert, und PPARγ, welches die Adipogenese fördert, besteht. Beide Signalwege wirken sich auf die Expression von CMKLR1 aus, wobei Wnt stimmulierend und PPARγ unterdrückend wirkt (29). Eine weitere experimentelle Studie an Mäusen von Zhao und Kollegen (46) kommt zu einem gegenteiligen Ergebnis. Demnach soll Chemerin zusammen mit seinem Rezeptor CMKLR1 einen positiven Einfluss auf den Knochenumbau haben, indem es durch die Beeinflussung der Testosteronproduktion in das Gleichgewicht zwischen Osteoblasten- und Osteoklastenentstehung einwirkt (30). Eine experimentelle Inaktivierung von CMKLR1 führte zu erniedrigtem Serumtestosteron und einem Verlust von Knochensubstanz (30).

Zudem gibt es eine Reihe von epidemiologischen Studien, die einen Zusammenhang zwischen osteoporotischen Frakturen und Chemerin nachweisen konnten. Eine querschnittliche Fall-Kontroll-Studie von He und Kollegen konnte bei 93 Probandinnen ein gesteigertes osteoporotisches Frakturrisiko mit steigenden Chemerinwerten nachweisen (31). Zum gleichen Ergebnis kamen Shi und Kollegen in einer Studie in der Daten von 543 adipösen Chinesinnen ausgewertet wurden (32), als auch die EPIC-Studie aus Potsdam von Menzel und Kollegen mit 683 Frauen (33). Im Gegensatz dazu zeigten Engin-Üstün et al. bei 88 türkischen postmenopausalen Frauen, die an Osteoporose erkrankt waren, niedrigere Chemerinwerte im Vergleich zu einer

knochengesunden Kontrollgruppe (34). Ebenso zeigten Terzoudis und Kollegen bei 120 Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen eine inverse Assoziation zwischen Chemerin und dem Auftreten von Osteoporose (14, 34).

1.4 Herleitung der Fragestellung

In der Vergangenheit durchgeführte experimentelle Studien (16, 25, 29, 30, 35) haben zwar einen Zusammenhang zwischen Chemerin und dem Knochenstoffwechsel zeigen können, lieferten jedoch zum Teil gegensätzliche Ergebnisse. Entsprechende Beobachtungsstudien sind durch kleine Probandenzahlen limitiert. Zudem lag der Fokus der überwiegenden Mehrzahl der Studien auf postmenopausalen Frauen, sodass es keine bzw. kaum verwertbare Ergebnisse für das männliche Geschlecht gibt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mit den Erkenntnissen der genannten Studien als Grundlage, den Zusammenhang zwischen Chemerin und der Knochenqualität in der Allgemeinbevölkerung genauer zu beleuchten. Dabei war auch von Interesse, ob eine relevante Effektmodifikation durch den BMI auftritt.

2. Methoden

2.1 Die Study of Health in Pomerania

Nach der Wiedervereinigung zwischen Ost- und West-Deutschland im Jahr 1990 wurde deutlich, dass die Lebenserwartung im Gebiet der ehemaligen DDR geringer war als die im ehemaligen West-Deutschland. Darüber hinaus zeigte sich, dass der Anstieg der Lebenserwartung im ehemaligen Ost-Deutschland über die letzten Jahrzehnte vor der Wiedervereinigung deutlich geringer ausgefallen war als im ehemaligen West-Deutschland. Zudem gab es innerhalb des Ost-Gebietes ein in Hinblick auf die Lebenserwartung auffallendes Nord-Süd-Gefälle mit der niedrigsten Lebenserwartung im Nordosten Deutschlands. Um diese Unterschiede hinreichend zu erläutern fehlten jedoch bis dato stichhaltige Informationen. Aus diesem Grund wurde in den 1990er Jahren der Forschungsverbund Community Medicine an der Universität Greifswald gegründet und die Study of Health in Pomerania (SHIP) als eine bevölkerungsbezogene und epidemiologische Studie ins Leben gerufen. Diese sollte die auslösenden Risikofaktoren für die beobachteten Unterschiede in der Lebenserwartung identifizieren und damit die Frage nach der hohen Mortalität im Bereich des Nordostens klären (36).

Die SHIP-Studienregion umfasst Vorpommern, jedoch ohne die Inseln Rügen und Usedom. Die Probanden wurden über repräsentative Stichproben aus den Einwohnermelderegistern ausgewählt und anschließend durch das Insitut für Community Medicine kontaktiert. Berücksichtigt wurden dabei diejenigen Männer und Frauen, die zum Zeitpunkt der Stichprobenziehung ihren Hauptwohnsitz im o.g. Untersuchungsgebiet hatten, zwischen 20 und 79 Jahre alt waren und die deutsche Staatsbürgerschaft besaßen. Die Basisuntersuchungen der SHIP-Kohorte fanden zwischen 1997 und 2001 statt. Etwa 10 Jahre später wurde eine zweite, unabhängige Kohorte (SHIP-Trend) gestartet. Für diese Kohorte wurde eine weitere repräsentative Stichprobe der 20 bis 79-jährigen Einwohner der Studienregion, mit marginalen Änderungen an den Rändern, gezogen. Voraussetzung für den Einschluss in die Stichprobenziehung waren wiederum ein Erstwohnsitz im festgelegten Untersuchungsgebiet, die deutsche Staatsbürgerschaft und keine Teilnahme an der ursprünglichen SHIP-Kohorte. Die Basisuntersuchungen der SHIP-Trend-Kohorte

fanden zwischen 2008 und 2012 mit 4420 Probanden (Response 50,1%) statt (36–38).

Das Studiendesign folgt den Prinzipien der Deklaration von Helsinki und wurde vom Ethikkomitee der Universität Greifswald genehmigt (36–39).

2.2 Studienpopulation

Die hier verwendeten Daten stammen aus der Basisuntersuchung der SHIP-Trend-Kohorte. In dieser Studienwelle wurde allen Probanden im Untersuchungszentrum in Greifswald eine quantitative Ultraschallmessung (QUS) an der Ferse angeboten, um ihre Knochenqualität abzuschätzen. Probanden, die im Rahmen von SHIP-Mobil an anderen Standorten teilnahmen, konnten die QUS-Messung nicht wahrnehmen (n = 482). Selbiges galt für alle Teilnehmer, bei denen aufgrund von Frakturen in den letzten 12 Monaten vor der Untersuchung, bestehender Immobilisation im Rollstuhl, Implantaten, Amputaten o. Ä. unterhalb des Knies, Infektionen oder Wunden der unteren Extremität keine QUS-Messung erfolgen konnte (n = 82). Für die Analysen in der vorliegenden Studie wurden weiterhin alle Probanden ohne gültige Chemerin-Messwerte (n = 93) ausgeschlossen als auch diejenigen mit Chemerin-Messwerten über dem 99. geschlechtsspezifischen Perzentil (n = 44). Des Weiteren führten eine zum Studienzeitpunkt bestehende Schwangerschaft (n = 7) sowie Nierenerkrankungen mit einer geschätzten glomerulären Filtrationsrate (eGFR) unter 30 ml/min/1,73m² (n = 1) als auch ein Parathormon-Spiegel über 120 pg/ml zum Ausschluss von den Datenanalysen (n = 7). Die Einnahme von Medikamenten, die auf den Knochenstoffwechsel Einfluss nehmen (n = 77), sowie fehlende Angaben in confundierenden Variablen (n = 45) waren ebenfalls Selektionskriterien für die vorliegenden Untersuchungen. Für die Analysen standen somit Daten von 3583 Probanden zur Verfügung; davon waren 1803 Frauen und 1780 Männer (**Abbildung 2**).

Die Durchführung des Studienprogramms fand nach sachgerechter Aufklärung und schriftlichem Einverständnis statt. Dabei erfolgten standardisierte medizinische Untersuchungen sowie eine Blutentnahme. Des Weiteren wurden mittels eines vorgegebenen computerassistierten Anamnesebogens Informationen über Alter, Geschlecht, den sozio-demographischen Hintergrund, die medizinische Anamnese

und das Gesundheitsverhalten der Probanden dokumentiert. Alle Medikamente, die in der Woche vor der Datenerhebung eingenommen wurden, sollten zu den Anamneseerhebungen mitgebracht werden. Diesen wurde entsprechend des Anatomisch-Therapeutisch-Chemischen Klassifikationssystems (ATC-Code) der Wirkstoffname zugeordnet. Zur Bestimmung des BMI wurden die Körpergröße und das Körpergewicht mit geeichten Geräten gemessen. Die Rauchgewohnheiten der Probanden wurden in drei Kategorien („nie“, „aktuell“, „ehemals“) eingeteilt. Wer sich weniger als eine Stunde pro Woche körperlich ertüchtigte, wurde als sportlich inaktiv kategorisiert. Das glykosylierte Hämoglobin (HbA1c), ebenso wie die Serumkreatinin- und die Plasmafibrinogenkonzentration wurden mit standardisierten Methoden im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Greifswald gemessen.

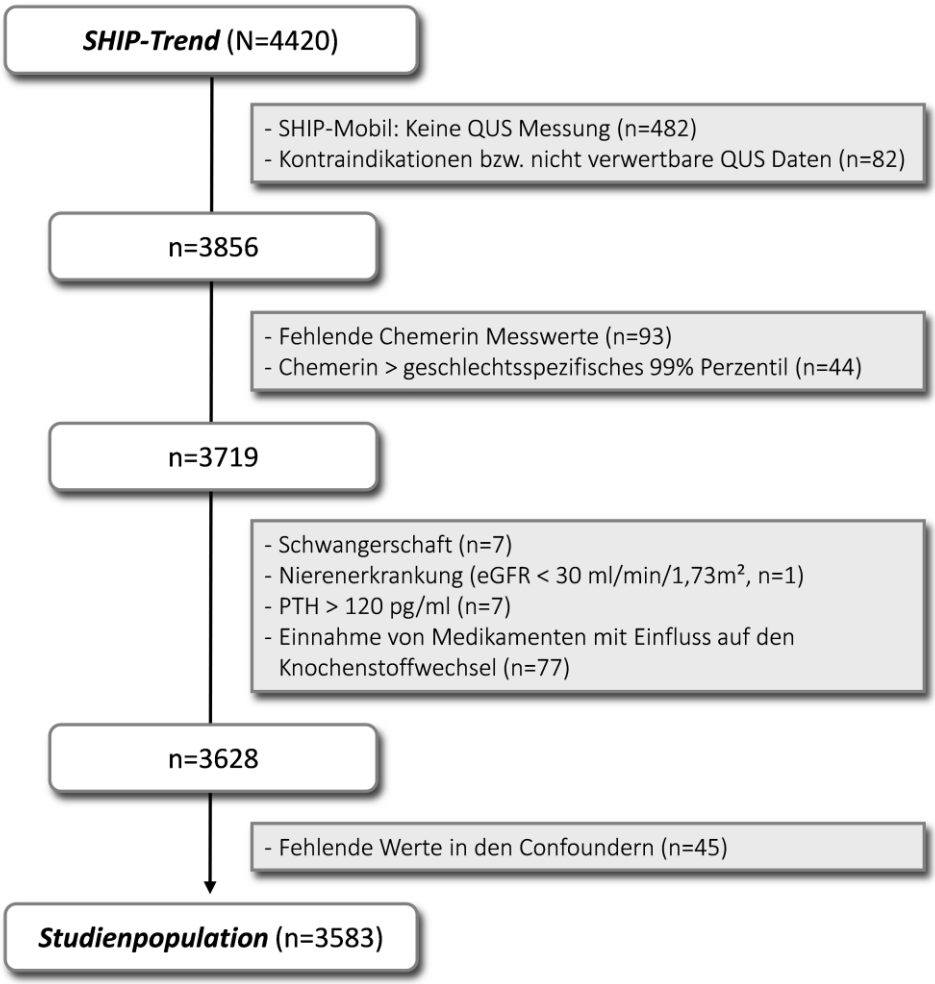

***Abbildung 2**: Flow-Chart zur Selektion der Studienpopulation.*

Medikamente mit Einfluss auf den Knochenstoffwechsel: Bisphosphonate, selektive Östrogenrezeptormodulatoren, Vitamin D, Parathormon, Glukokortikoide zur systemischen Anwendung. eGFR, geschätzte glomeruläre Filtrationsrate; PTH, Parathormon; QUS, quantitativer Ultraschall

2.3 Chemerin-Messung

Die Entnahme der Blutproben in SHIP-Trend erfolgte bei allen Probanden in Rückenlage zwischen 7.00 Uhr morgens und 13.00 Uhr mittags. Etwa zwei Drittel der Studienteilnehmer waren bei der Blutabnahme nüchtern mit mehr als achtstündiger Nahrungskarenz. Die aus der Vena cubiti des Unterarmes entnommenen Proben wurden entweder sofort untersucht oder zur späteren Bearbeitung bei -80°C eingelagert. Die Chemerin-Konzentration wurde im EDTA-Blutplasma über einen ELISA bestimmt (Mediagnost, Reutlingen, Germany). Die im Rahmen der Studie ermittelten Variationskoeffizienten betrugen 5,8% für hohe und 5,5% für niedrige Chemerin-Konzentrationen.

2.4 QUS-Messung

Um die Knochenfestigkeit der Probanden zu ermitteln, wurde in sitzender Position eine QUS-Messung beidseitig am Calcaneus durchgeführt (**Abbildung 3**).

Abbildung 3*: Schematische Darstellung der QUS-Messung am Calcaneus mit dem Achilles InSight.*

Alle Messungen wurden von dafür speziell ausgebildeten Untersucherinnen durchgeführt, die initial zertifiziert und jährlich re-zertifiziert wurden. Als Kontaktmittel

für das auf Wasserbasis funktionierende Ultraschallgerät Achilles InSight (GE Medical Systems Ultrasound; GE Healthcare, Chalfont St Giles, U.K) wurde Alkohol verwendet. Das Gerät erfasst die Schallgeschwindigkeit (SOS) sowie die Breitbandultraschallabschwächung (BUA) des Ultraschallsignals beim Durchtritt durch den Calcaneus. Diese sind abhängig von der individuellen Knochenstruktur. Aus den beiden Messwerten wird der Steifigkeitsindex (SI) wie folgt berechnet (27, 40):

$$SI = (0{,}67 \times BUA) + (0{,}28 \times SOS) – 420.$$

Aus dem SI wiederum kann, über den Vergleich mit den Werten einer jungen gesunden Referenzpopulation, das individuelle osteoporotisch bedingte Frakturrisiko abgeleitet werden. Wird bei einem Probanden ein SI unterhalb der -2,5fachen Standardabweichung (SD) vom Referenzdurchschnitt beobachtet, liegt ein hohes osteoporotisches Frakturrisiko vor. Bei Werten zwischen der -2,5fachen SD und der -1fachen SD im Vergleich zum Referenzdurchschnitt, liegt ein mittleres osteoporotisch bedingtes Frakturrisiko vor. Bei Werten oberhalb der -1fachen SD vom Referenzdurchschnitt liegt ein niedriges osteoporotisches Frakturrisiko vor (27, 40).

2.5 Statistische Analysen

Die Angabe von kategorisierten Daten erfolgte in Prozent, während kontinuierliche Daten als Median mit 25. und 75. Perzentil angegeben wurden. Für Gruppenvergleiche wurden sowohl Kruskal-Wallis-Tests (kontinuierliche Daten) als auch χ^2-Tests (kategorisierte Daten) verwendet. Wenn nicht anders beschrieben, wurde ein p-Wert < 0,05 als statistisch signifikant erachtet.

In geschlechtsspezifischen linearen Regressionsmodellen wurden die Assoziationen zwischen Chemerin und den QUS-basierten Parametern BUA, SOS und SI analysiert. Dabei zeigte sich eine Effektmodifikation ($p < 0{,}10$) durch den BMI bei den Assoziationen zwischen Chemerin mit BUA und SI bei den Männern und zwischen Chemerin mit SOS und SI bei den Frauen. Aufgrund dessen wurden alle nachfolgenden Analysen nach Geschlecht und den BMI-Gruppen gemäß der Bestimmung der WHO (< 25 kg/m², 25- 29 kg/m², ≥ 30 kg/m²) stratifiziert. Alle Modelle wurden für Alter, BMI, körperliche Aktivität, Rauchen, Diabetes Mellitus, HbA1c,

Fibrinogen und die eGFR adjustiert. Bei den Frauen wurde eine zusätzliche Adjustierung für die Einnahme oraler Kontrazeptiva bzw. menopausaler Hormonersatztherapie vorgenommen. Weiterhin wurde das Vorliegen von nichtlinearen Assoziationen überprüft. Dazu wurden Modelle mit kubischen Splines mit drei Knoten am 5., 50. und 95. Perzentil konstruiert und mittels Likelihood-Ratio-Test der Model Fit geprüft. Da dieser keine signifikante Verbesserung gegenüber dem einfachen linearen Modell anzeigte, wurde auf die nichtlineare Modellierung verzichtet. Zusätzlich zu den linearen Regressionsmodellen wurden logistische Regressionsmodelle mit dem gleichen Confounderset gerechnet, bei denen die Assoziationen zwischen Chemerin und dem osteoporotischen Frakturrisiko (mittleres und hohes Risiko gemeinsam vs. niedriges Risiko) analysiert wurden. Aus den linearen Regressionsmodellen wurden ß-Koeffizienten mit Standardfehlern und p-Werten berichtet, aus den logistischen Regressionsmodellen Odds Ratios mit 95% Konfidenzintervallen.

Die Durchführung der statistischen Analysen erfolgte mit SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

3. Ergebnisse

3.1 Charakteristika der Studienpopulation

Tabelle 1 zeigt die allgemeinen Charakteristika der Studienpopulation stratifiziert nach Geschlecht und BMI-Gruppe. Es zeigte sich, dass ca. 60% der Frauen und ca. 78% der Männer präadipös oder adipös waren. Adipöse Frauen und Männer waren zudem älter und weniger häufig körperlich aktiv. Darüber hinaus stieg mit ansteigendem BMI auch die Zahl derer, die einen manifesten Diabetes mellitus hatten. Hinsichtlich des Chemerins fand sich bei den männlichen Probanden eine geringere Konzentration als bei den Frauen, jedoch zeigte sich sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Teilnehmern ein Anstieg des Chemerins mit steigendem BMI. Hinsichtlich der QUS-basierten Parameter zeigten die männlichen Probanden insgesamt höhere BUA- sowie SI-Werte in allen BMI-Gruppen als die weiblichen Probanden.

3.2 Assoziationen zwischen Chemerin und den QUS-Parametern

Die linearen Regressionsanalysen zeigten eine inverse Assoziation zwischen der Plasmachemerinkonzentration und BUA bei den adipösen Männern, jedoch keine Assoziation zu SOS oder dem SI. Bei den adipösen Frauen waren Chemerin und SOS sowie der SI invers assoziiert (**Tabelle 2**). In allen anderen Subgruppen konnte keine signifikante Assoziation zwischen Chemerin und den QUS-basierten Parametern festgestellt werden. Eine zusätzliche Adjustierung der Modelle für die Einnahme von oralen Kontrazeptiva oder menopausaler Hormonersatztherapie bei den Frauen änderte diese Zusammenhänge nicht und ist daher an dieser Stelle nicht weiter ausgeführt.

***Tabelle 1**: Charakteristika der Studienpopulation stratifiziert nach Geschlecht und Body Mass Index*

Charakteristika	Männer				Frauen			
	BMI < 25 kg/m²	BMI 25-29 kg/m²	BMI ≥ 30 kg/m²	p	BMI < 25 kg/m²	BMI 25-29 kg/m²	BMI ≥ 30 kg/m²	p
N	392	822	566		708	613	482	
Alter, Jahre	41 (30; 54)	53 (41; 65)	57 (46; 66)	<0,01	43 (33; 53)	54 (42; 64)	56 (45; 65)	<0,01
Sportlich aktiv, %	73,2	71,8	62,9	<0,01	69,4	73,4	67,6	0,09
Diabetes Mellitus, %	2,6	7,9	20,7	<0,01	1,6	5,7	16,6	<0,01
Fibrinogen, g/l	2,5 (2,2; 3,2)	2,8 (2,4; 3,3)	3,1 (2,5; 3,5)	<0,01	2,8 (2,4; 3,3)	3,2 (2,7; 3,5)	3,4 (3,0; 3,9)	<0,01
Hormoneinnahme, %*	-	-	-	-	28,0	16,2	10,4	<0,01
Chemerin, ng/ml	81 (69; 94)	91 (79; 109)	106 (90; 122)	<0,01	87 (75; 102)	104 (89; 121)	116 (101; 136)	<0,01
BUA, dB/MHz	114 (105; 124)	117 (108; 128)	119 (110; 129)	<0,01	108 (99; 118)	108 (99; 120)	111 (103; 120)	<0,01
SOS, m/s	1563 (1548; 1587)	1562 (1540; 1589)	1563 (1539; 1585)	0,98	1565 (1543; 1588)	1560 (1539; 1579)	1560 (1539; 1582)	<0,01
Steifigkeitsindex	94 (83; 108)	96 (84; 109)	98 (86; 109)	0,06	90 (79; 104)	89 (78; 102)	90 (80; 103)	0,18
Frakturrisiko†				0,01				0,23
Niedrig, %	64,5	68,6	73,7		61,7	61,8	66,2	
Mittel/hoch, %	35,5	31,4	26,7		38,3	38,2	33,8	

*Angegeben sind der Median (25.; 75. Perzentil) bzw. Anzahl oder Anteile. Die Unterschiede zwischen den BMI-Gruppen wurden mittels Chi-Quadrat-Test (kategorisierte Daten) oder Kruskal-Wallis-Test (kontinuierliche Daten) auf statistische Signifikanz geprüft. BUA = Breitband-Ultraschall-Abweichung; SOS = Schallgeschwindigkeit; Steifigkeitsindex = (0,67*BUA) + (0,28*SOS) - 420.*

**Hormoneinnahme ist definiert als Einnahme von oralen Kontrazeptiva (ACT G03A), Östrogen (ACT G03C), Progesteron (ACT G03D), und Progesteron und Östrogen in Kombination (ACT G03F). †QUS-basiertes osteoporotisches Frakturrisiko.*

***Tabelle 2**: Assoziation zwischen der Plasmachemerinkonzentration und den QUS-basierten Parametern stratifiziert nach Geschlecht und Body-Mass-Index*

Geschlecht	**Outcome**	**BMI <25 kg/m²**			**BMI 25-29 kg/m²**			**BMI ≥30 kg/m²**		
		ß	SDfehler	p	ß	SDfehler	p	ß	SDfehler	p
Männer	BUA	-0,93	0,81	0,25	-0,07	0,54	0,89	-1,31	0,66	**0,05**
	SOS	-1,95	2,32	0,40	0,03	1,47	0,99	-1,84	1,77	0,30
	Steifigkeits-index	-1,17	1,10	0,29	-0,04	0,72	0,95	-1,39	0,83	0,09
Frauen	BUA	-0,35	0,59	0,56	0,27	0,62	0,66	-0,66	0,65	0,31
	SOS	-0,11	1,37	0,94	-0,12	1,41	0,93	-5,25	1,51	**<0,01**
	Steifigkeits-index	-0,26	0,71	0,71	0,15	0,73	0,84	-1,91	0,77	**0,01**

Die Schätzer (ß) mit Standardfehler (SDfehler) und p-Wert stammen aus linearen Regressionsmodellen bei denen ein Anstieg von Chemerin um eine Standardabweichung modelliert wurde.

*BUA = Breitband-Ultraschall-Abweichung; SOS = Schallgeschwindigkeit; Steifigkeitsindex = (0,67*BUA) + (0,28*SOS) - 420. Die linearen Regressionsmodelle wurden für Alter, sportliche Aktivität, Rauchstatus, Diabetes Mellitus, HbA1c, eGFR, Fibrinogen und den BMI adjustiert.*

Die Assoziationen zwischen der Plasmachemerinkonzentration und dem QUS-basierten osteoporotischen Frakturrisiko sind in **Abbildung 4** illustriert. Bei den Männern zeigte sich wiederum ausschließlich in der Gruppe der adipösen Männer eine Assoziation. Mit Anstieg des Plasmachemerins um eine Standardabweichung wurde hier eine erhöhte Chance für ein mittleres/hohes Frakturrisiko beobachtet. Eine ähnliche Beziehung zeigte sich in der Gruppe der adipösen Frauen, diese verfehlte aber die statistische Signifikanz (p = 0,10). Weder in der Gruppe der normalgewichtigen noch in der Gruppe der präadipösen Probandinnen konnten vergleichbare Assoziationen beobachtet werden.

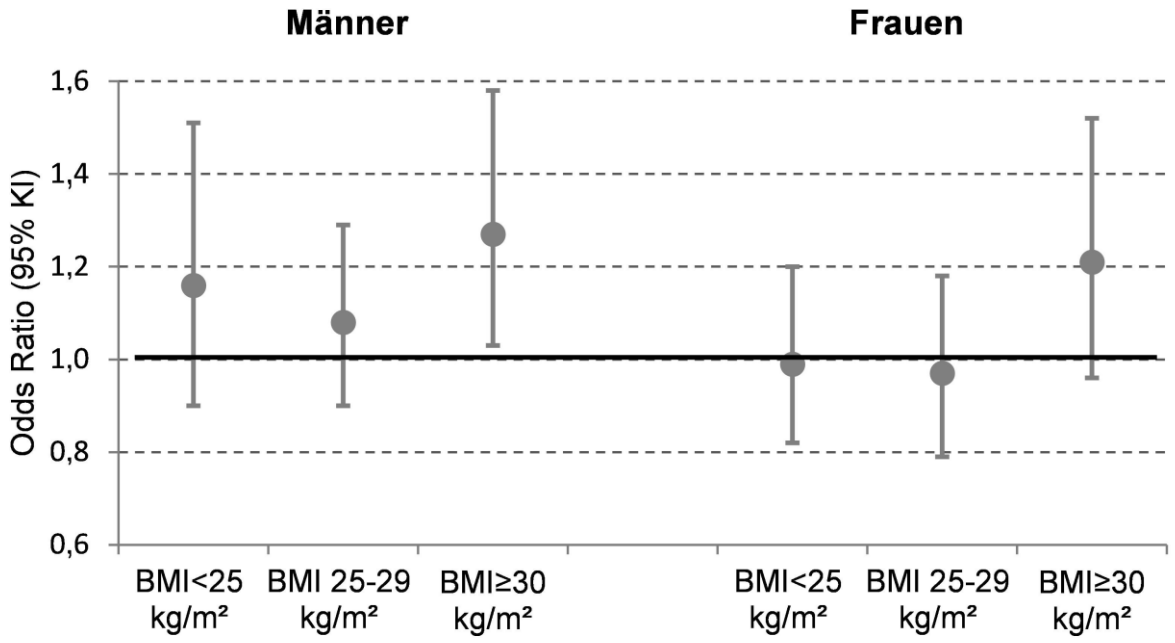

***Abbildung 4**: Assoziation zwischen der Plasmachemerinkonzentration und dem QUS-basierten osteoporotischen Frakturrisiko stratifiziert nach Geschlecht und BMI Gruppen*

Angegeben sind Odds Ratios mit 95% Konfidenzintervallen (KI) für ein mittleres/hohes vs. ein niedriges Risiko aus logistischen Regressionmodellen in denen ein Anstieg von Chemerin um eine Standardabweichung modelliert wurde. Die Modelle wurden für Alter, sportliche Aktivität, Rauchstatus, Diabetes Mellitus, HbA1c, eGFR, Fibrinogen und den BMI adjustiert.

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie konnte erstmals der Zusammenhang zwischen der Plasmachemerinkonzentration und den Komponenten der Knochenfestigkeit in einer großen, randomisierten, populationsbasierten Kohorte betrachtet werden. Dabei wurden signifikante inverse Zusammenhänge für beide Geschlechter in der Gruppe der adipösen Probanden beobachtet; bei den Männern zwischen Chemerin und BUA, bei den Frauen zwischen Chemerin und SOS sowie dem SI. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass ein hoher Plasmachemerinwert mit einer höheren Chance für ein mittleres oder hohes osteoporotisches Frakturrisiko assoziiert ist. Jedoch war auch dieser Zusammenhang auf die adipösen Probanden beider Geschlechter limitiert und konnte bei schlanken bzw. lediglich präadipösen Studienteilnehmern nicht gezeigt werden.

4.1 Vergleichende Ergebnisse anderer epidemiologischer Studien im Hinblick auf die Assoziation zwischen Chemerin und Knochen

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Assoziationen bestätigen größtenteils die Ergebnisse verschiedener vorheriger Studien, wenngleich das Studiendesign als auch die Rahmenbedingungen deutliche Unterschiede aufweisen (31–33). So wiesen He und Kollegen bei 93 Patientinnen mit Osteoporose höhere Chemerinwerte nach als in der entsprechenden gesunden Kontrollgruppe (31). Zudem konnte eine inverse Assoziation zwischen Chemerin und der lumbalen sowie femoralen Knochenmineraldichte gezeigt werden (31). Ähnliche Beobachtungen wurden auch in einer Studie von Shi und Kollegen mit 543 adipösen Chinesinnen getätigt (32). Auch hier wurde ein inverser Zusammenhang zwischen Chemerin und der lumbalen, sowie femoralen Knochenmineraldichte beobachtet (32). Diese Ergebnisse untermauern die Resultate der vorliegenden Arbeit, wenngleich sie durch ein vorwiegend asiatisches und ausschließlich weibliches Patientenkollektiv in ihrer Vergleichbarkeit limitiert sind. Auch die populationsbasierte EPIC-Studie aus Potsdam lieferte überwiegend vergleichbare Studienergebnisse (33). Dabei untersuchten Menzel und Kollegen insgesamt 683 Frauen auf den Zusammenhang zwischen Chemerin und BUA. Auch hier zeigte sich, dass eine hohe Plasmachemerinkonzentration mit einem niedrigen BUA zusammenhängt. Allerdings wurde in den Analysen keine Aufteilung nach BMI-Gruppen vorgenommen (33). Zudem wurden ausschließlich peri- und postmenopausale

Frauen in die Analysen eingeschlossen, sodass durch das Fehlen männlicher Probanden die Ergebnisse nicht vollumfänglich mit denen der vorliegenden Untersuchungen in der SHIP-Trend-Population vergleichbar sind. Darüberhinaus wurden im Gegensatz zu dieser Arbeit die Parameter SOS und SI in EPIC nicht ausgewertet. Diese Daten wurden in der EPIC-Studie zwar erhoben, fanden allerdings keinen Eingang in die Publikation (33).

Im Gegensatz zu den genannten Untersuchungen, die passend zu den vorliegenden Ergebnissen einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Plasmachemerin-konzentration und einem gesteigerten osteoporotischen Frakturrisiko aufzeigen, stehen die widersprüchlichen Ergebnisse zweier weiterer Studien (14, 34). Bei 88 türkischen Probandinnen, die an postmenopausaler Osteoporose erkrankt waren, konnten Engin-Üstün und Kollegen niedrigere Plasmachemerinkonzentration zeigen als in der entsprechenden Kontrollgruppe ohne manifeste Osteoporose (34). Ähnliche Ergebnisse präsentierte eine Studie von Terzoudis und Kollegen, die an 120 griechischen Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen den Zusammenhang zwischen Plasmachemerin und Osteoporose untersuchte (14). Dort zeigten sich, wie bei Engin-Üstün, eine inverse Assoziationen zwischen Plasmachemerin und dem Auftreten von Osteoporose (14, 34). Diese abweichenden Ergebnisse könnten durch die unterschiedliche Selektion der Patienten erklärt werden (14). Des Weiteren sind die untersuchten Stichproben relativ klein und enthalten keine männlichen Probanden, sodass eine Anwendbarkeit der Ergebnisse auf die Allgemeinbevölkerung nicht gegeben ist.

4.2 Chemerin bei Adipositas

In der vorliegenden Arbeit konnte eine inverse Assoziation zwischen der Plasmachemerinkonzentration und der Knochenfestigkeit bei beiden Geschlechtern ausschließlich in der Gruppe der adipösen Probanden verdeutlicht werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in der Aktivierung von Chemerin in seine biologisch aktiven Formen liegen. Chemerin wird zunächst als Chem163S sezerniert, ein inaktives Prochemerin, welches über verschiedene Peptidasen wie Carboxypeptidase N/B2, oder Plasmin und Elastase in Chem157S, seine aktive und potenteste Form, überführt wird. Zusätzlich zu Chem157S wird eine nicht aktive Form in den Blutkreislauf entlassen. An dieser Stelle besteht ein entscheidender Unterschied in der Verteilung der Chemerinformen zwischen

normalgewichtigen und adipösen Personen. Wie Chang und Kollegen in ihrer Studie mit 37 Personen, aufgeteilt nach BMI-Gruppen, zeigten, fand sich nicht nur eine höherere Plasmachemerinkonzentration bei adipösen Teilnehmern, sondern auch ein quantitativer Unterschied in der Sekretion der aktiven und inaktiven Chemerinformen zwischen den BMI-Gruppen (19). Bei schlanken Probanden waren die Werte des inaktiven Chemerins höher und die des aktiven Chemerins niedriger als in der Gruppe der adipösen Studienteilnehmer (19). Diese Resultate lassen den Rückschluss zu, dass die Proteolyse und somit die Aktivierung des inaktiven Prochemerin, Chem163S, bei normalgewichtigen Personen in einem deutlich geringeren Umfang stattfindet (19, 20, 22). Das vermehrte Vorliegen aktiver Chemerinformen bei adipösen im Vergleich zu normalgewichtigen Personen könnte wiederum eine mögliche Erklärung für den negativen Einfluss von Chemerin auf die Knochenfestigkeit in der BMI-Gruppe über 30 kg/m² liefern.

4.3 Unterschiede BUA und SOS

Die vorliegenden Analysen aus SHIP-Trend stellten signifikante inverse Zusammenhänge zwischen Chemerin und BUA bei adipösen Männern und zwischen Chemerin und SOS sowie dem Steifigkeitsindex bei adipösen Frauen heraus. Bei der hier verwendeten QUS-Messung reflektieren die Faktoren BUA und SOS die Knochendichte (41, 42). SOS beinhaltet zusätzlich Informationen zur Knochenelastizität und -festigkeit sowie zur Mikroarchitektur des Knochens (40–42). Die verminderten BUA-Messwerte bei hohen Plasmachemerinkonzentrationen deuten somit auf eine Verringerung der Knochendichte bei adipösen Männern hin (40, 41 42). Bei adipösen Frauen deuten die Assoziationen zur SOS auf eine Schädigung der Mikroarchitektur des Knochens bei steigenden Plasmachemerinkonzentrationen hin. Aus klinischer Sicht spielt diese recht spekulative Interpretation jedoch keine entscheidende Rolle, da das osteoporotische Frakturrisiko durch beide QUS-Parameter zuverlässig vorhergesagt werden kann (40–43).

4.4 Pathophysiologie – Hinweise aus experimentellen Studien

Während vorausgehende Beobachtungsstudien zwar keine einheitlichen Ergebnisse hinsichtlich der Assoziation zwischen Chemerin und der Knochenfestigkeit lieferten (16, 25, 29, 31–33, 35), zeigen sich jedoch mehrheitlich Assoziationen, die durch die vorliegenden

Ergebnisse gestützt werden. In einer Reihe aufwändiger experimenteller Studien (16, 25, 29, 35) konnten Muruganandan und Kollegen potenzielle ursächliche Mechanismen aufdecken. CMKLR1 wird als G-Protein- gekoppelter Rezeptor von verschiedenen Zelltypen exprimiert. Dazu gehören: mesenchymale Stammzellen, Adipozyten und Osteoblasten. Der Rezeptor seinerseits wird durch Chemerin aktiviert (35, 44). Sobald die Signalübertragung über CMKLR1 stattfindet, kommt es zu einer Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Adipozyten oder Osteoblasten. Dieser Vorgang erfolgt kompetitiv (44). Es ist daher möglich, dass durch CMKLR1 die Adipogenese erhöht und gleichzeitig die Osteoblastogenese reduziert wird. Infolge einer experimentellen Blockade von CMKLR1 in den Stromazellen des Knochenmarks von Versuchstieren (Mäusen) kam es zur Unterbrechung der Adipogenese, während die Zeichen der Osteoblastogenese merklich zunahmen (25). Daraus kann spekulativ abgeleitet werden, dass das hier beobachtete erhöhte osteoporotische Frakturrisiko bei steigenden Plasmachemerinwerten in der Gruppe der adipösen Probanden durch einen höheren Körperfettanteil oder sogar einem fetthaltigeren Knochenmark erklärt werden könnte. Eine gesteigerte Chemerinsekretion hätte schließlich zur Folge, dass die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen dahingehend beeinflusst wird, dass ein negativer Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau entsteht.

Während Chemerin einerseits den Knochenumbau über die Osteoblastogenese beeinflusst, spielt es andererseits auch eine Rolle bei der Osteoklastogenese. Wie **Abbildung 1** zeigt, entstehen Osteoklasten aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC). Zunächst entwickeln sich die hämatopoetischen Stammzellen über M-CSF, den Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor, und Interleukin-6, zu Präosteoklasten. Anschließend kommt es über die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor (RANK) an den Präosteoklasten und unter dem Einfluss von Osteoprotegerin zur Entstehung ausgereifter Osteoklasten. MCSF, IL-6, Osteoprotegerin und RANKL werden dabei durch Präosteoblasten sezerniert (35, 45). Muraganandan und Kollegen konnten nachweisen, dass HSCs sowohl Chemerin als auch CMKLR1 sezernieren. Ihre diesbezüglich durchgeführten experimentellen Tierversuche weisen präzise darauf hin, dass die Blockade des Chemerinsignals zur Unterbrechung der Osteoklastogenese führt (25, 35). Dieser Effekt konnte als reversibel nachgewiesen werden, sodass nach dem Aufheben der Blockade die Rekrutierung neuer Osteoklasten wieder möglich war. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Blockade des

Chemerinsignals keine zytotoxischen Auswirkungen hatte und das Ergebnis allein auf den ursprünglichen Chemerinentzug zurückzuführen ist. Chemerin wirkt demnach als essentieller Bestandteil in der Osteoklastogenese. Dieser Mechanismus könnte vielversprechend sein in Hinblick auf die Therapie pathologischer Knochenumbauvorgänge und systemischer Skeletterkrankungen wie der Osteoporose oder Osteopenie. Es werden allerdings weitere Studien benötigt um diese Annahmen zu untermauern.

4.5 Stärken und Limitationen

In dieser Studie wurden erstmalig die Auswirkungen von Chemerin auf die Knochenfestigkeit im Rahmen einer großen, populationsbasierten Untersuchung beleuchtet. Dabei war es aufgrund der hohen Probandenzahl möglich, geschlechts- und BMI-stratifizierte Analysen vorzunehmen. Um eine hohe Qualität der Datenerhebung zu gewährleisten, wurden alle Messungen von dafür speziell ausgebildeten und zertifizierten Untersuchern durchgeführt. Trotz vieler Stärken dieser Studie gibt es auch einige Einschränkungen, die im Folgenden genannt werden sollen. Von den vorliegenden Analysen wurden u.a. diejenigen SHIP-Trend Probanden ausgeschlossen, die 12 Monate vor der QUS-Messung Verletzungen, Operationen oder Implantate an der unteren Extremität hatten. Somit ist davon auszugehen, dass unsere Studienpopulation hinsichtlich der Knochenfestigkeit insgesamt gesünder ist als die Gesamtbevölkerung. Dementsprechend ist eine Übertragung unserer Studienergebnisse auf eine weniger gesunde Bevölkerung nicht vollumfänglich möglich. Des Weiteren ist die hier verwendete QUS-Messung zwar nicht-invasiv, strahlungsfrei und ermöglicht eine gute Abschätzung des osteoporotisch bedingten Frakturrisikos, jedoch ist die DXA derzeit der von der Weltgesundheitsorganisation empfohlene Goldstandard für die Osteodensitometrie (40, 46–48). Diese stand in SHIP-Trend nicht zur Verfügung. Daher können Untersuchungen, die als osteodensitometrisches Verfahren die DXA nutzen, mit der vorliegenden Studie nicht direkt verglichen werden. Eine zentrale Schwäche ergibt sich zudem aus dem Studiendesign als Querschnittsstudie, welche es nicht ermöglicht Kausalitäten zwischen Chemerin und den gemessenen Ultraschallparametern nachzuweisen.

4.6 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Assoziation zwischen Knochenfestigkeit und Chemerin in Bezug auf den BMI zeigen in der Gruppe der adipösen Probanden für beide Geschlechter eindeutige Befunde. Steigende Plasmachemerinkonzentrationen gehen bei adipösen Probanden mit einem erhöhten QUS-basierten Risiko für osteoporotische Frakturen einher. Diese Ergebnisse aus der großen, populationsbasierten SHIP-Trend Studie bestätigen vorausgehende epidemiologische Studien sowie die Schlussfolgerungen verschiedener experimenteller Untersuchungen. Erstmalig konnte eine eindeutige Assoziation zwischen Plasmachemerin und der Knochenfestigkeit bei Männern gezeigt werden, wenngleich dieses Ergebnis auf adipöse Probanden limitiert war. Insgesamt bietet sich damit eine vielversprechende Ausgangslage für die Aufdeckung weiterer Verbindungen zwischen Adipositas, Chemerin und der Knochenfestigkeit. Jedoch sind zusätzliche Studien erforderlich um einen konkreten klinischen Nutzen zu ermitteln.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Adipositas und Osteoporose stellen immer größer werdende Herausforderungen für das Gesundheitssystem dar. Beide Erkrankungen gehen mit erheblichen negativen Auswirkungen für die Betroffenen einher. Übergewicht ist mit der Entstehung von Diabetes mellitus, sowie einer Erhöhung des Blutdrucks und dem Auftreten eines inflammatorischen Phänotyps assoziiert. Wiederrum ist die Plasmakonzentration des Adipokins Chemerin bei übergewichtigen oder adipösen Patienten erhöht. Kleinere Beobachtungsstudien zeigen, dass erhöhtes Plasmachemerin zudem mit einem Verlust an Knochensubstanz in Verbindung steht. Die Ergebnisse vorheriger Studien zu diesem Thema waren jedoch durch ihre kleine Teilnehmerzahl, ihr Studiendesign oder ihre ausschließlich weibliche Kohorte nicht auf die Allgemeinbevölkerung übertragbar. Dies ist daher die erste populationsbasierte Studie, die den potentiellen Zusammenhang zwischen Chemerin und der Knochenqualität in der Allgemeinbevölkerung untersucht hat. Zudem wurde der Einfluss des Body-Mass-Index (BMI) auf den genannten Zusammenhang berücksichtigt.

Für diese Arbeit wurden Daten von 3583 Teilnehmern der Study of Health in Pomerania (SHIP)–Trend untersucht. Die Probanden wurden nach Geschlecht und BMI-Gruppen in normalgewichtig (BMI<25 kg/m²), übergewichtig (BMI 25-29 kg/m²) und adipös (≥30 kg/m²) eingeteilt. Die Plasmachemerinkonzentration wurde im EDTA-Plasma der Probanden bestimmt. Die Messung der Knochenqualität erfolgte mittels quantitativen Ultraschalls (QUS) an der Ferse.

Die statistischen Analysen (lineare und logistische Regressionsmodelle) zeigten bei adipösen Probanden einen signifikanten inversen Zusammenhang zwischen Chemerin und der Knochenfestigkeit (Breitbandultraschallabschwächung bei Männern, Schallgeschwindigkeit und Steifigkeitsindex bei Frauen) sowie eine erhöhte Chance für ein mittleres oder hohes QUS-basiertes Frakturrisiko. Bei normal- und übergewichtigen Probanden gab es keinen Hinweis auf signifikante Assoziationen zwischen den untersuchten Parametern. Chemerin hat somit bei adipösen Männern und Frauen einen negativen Einfluss auf die Knochenfestigkeit.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass dies die erste Studie ist, die an einem großen Studienkollektiv den Zusammenhang zwischen Plasmachemerin und der Knochenqualität in Abhängigkeit vom BMI statistisch umfassend geprüft hat. Es wurden verschiedene

Hypothesen zum pathophysiologischen Zusammenhang zwischen Chemerin und den QUS-Parametern diskutiert. Eine abschließende Erklärung kann mit den vorhandenen Daten aber nicht geliefert werden. Um den klinischen und therapeutischen Nutzen für den Patienten genauer herauszuarbeiten als auch zur Findung neuer Therapie- und Diagnosekonzepte, sollten weitere Studien folgen.

6. Literaturverzeichnis

1. **Branca F, ed.** *Die Herausforderung Adipositas und Strategien zu ihrer Bekämpfung in der Europäischen Region der WHO*. *Zusammenfassung* [ger]. Kopenhagen: WHO Regionalbüro für Europa, 2007.
2. **Berg RM, Wallaschofski H, Nauck M, Rettig R, Markus MRP, Laqua R, Friedrich N, Hannemann A.** Positive Association Between Adipose Tissue and Bone Stiffness [eng]. *Calcified tissue international* 97: 40–49, 2015.
3. **Gressner AM, Arndt T, eds.** *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018.
4. **World Health Organization, ed.** Body mass index - BMI [en] [Online]. World Health Organization. http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi [4 Feb. 2020].
5. **Unamuno X, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Becerril S, Frühbeck G, Catalán V.** Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity [eng]. *European journal of clinical investigation* 48: e12997, 2018.
6. **Rosen CJ, Bouxsein ML.** Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? [eng]. *Nature clinical practice. Rheumatology* 2: 35–43, 2006.
7. **Shapses SA, Pop LC, Wang Y.** Obesity is a concern for bone health with aging [eng]. *Nutrition research (New York, N.Y.)* 39: 1–13, 2017.
8. **Nishimura R, Hata K, Yoneda T.** Relationship between bone metabolism and adipogenesis [jpn]. *Clinical calcium* 17: 233–240, 2007.
9. **Neumann E, Junker S, Schett G, Frommer K, Müller-Ladner U.** Adipokines in bone disease [eng]. *Nature reviews. Rheumatology* 12: 296–302, 2016.
10. **Izquierdo AG, Crujeiras AB, Casanueva FF, Carreira MC.** Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later? [eng]. *Nutrients* 11, 2019.
11. **Neumann E, Schett G.** Knochenstoffwechsel. Molekulare Mechanismen. molekulare mechanismen [ger]. *Zeitschrift fur Rheumatologie* 66: 286–289, 2007.
12. **Cao JJ.** Effects of obesity on bone metabolism [eng]. *Journal of orthopaedic surgery and research* 6: 30, 2011.
13. **Kluzek S, Arden NK, Newton J.** Adipokines as potential prognostic biomarkers in patients with acute knee injury [eng]. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 20: 519–525, 2015.
14. **Terzoudis S, Malliaraki N, Damilakis J, Dimitriadou DA, Zavos C, Koutroubakis IE.** Chemerin, visfatin, and vaspin serum levels in relation to bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease [eng]. *European journal of gastroenterology & hepatology* 28: 814–819, 2016.
15. **Ma J, Niu D-S, Wan N-J, Qin Y, Guo C-J.** Elevated chemerin levels in synovial fluid and synovial membrane from patients with knee osteoarthritis [eng]. *International journal of clinical and experimental pathology* 8: 13393–13398, 2015.
16. **Muruganandan S, Sinal CJ.** The impact of bone marrow adipocytes on osteoblast and osteoclast differentiation [eng]. *IUBMB life* 66: 147–155, 2014.
17. **Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, Walder K, Segal D.** Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome [eng]. *Endocrinology* 148: 4687–4694, 2007.
18. **Nagpal S, Patel S, Jacobe H, DiSepio D, Ghosn C, Malhotra M, Teng M, Duvic M, Chandraratna RA.** Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin [eng]. *The Journal of investigative dermatology* 109: 91–95, 1997.

19. **Chang S-S, Eisenberg D, Zhao L, Adams C, Leib R, Morser J, Leung L.** Chemerin activation in human obesity [eng]. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 24: 1522–1529, 2016.
20. **Ernst MC, Sinal CJ.** Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity [eng]. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 21: 660–667, 2010.
21. **Du X-Y, Leung LLK.** Proteolytic regulatory mechanism of chemerin bioactivity [eng]. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 41: 973–979, 2009.
22. **Zabel BA, Allen SJ, Kulig P, Allen JA, Cichy J, Handel TM, Butcher EC.** Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades [eng]. *The Journal of biological chemistry* 280: 34661–34666, 2005.
23. **Rourke JL, Dranse HJ, Sinal CJ.** Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease [eng]. *Obesity reviews* 14: 245–262, 2013.
24. **Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, Muruganandan S, Sinal CJ.** Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism [eng]. *The Journal of biological chemistry* 282: 28175–28188, 2007.
25. **Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ.** Role of chemerin/CMKLR1 signaling in adipogenesis and osteoblastogenesis of bone marrow stem cells [eng]. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 25: 222–234, 2010.
26. **Bartl R.** *Osteoporose*. *Prävention, Diagnostik, Therapie; 12 Tabellen* [ger]. Stuttgart: Thieme, 2011.
27. **Schürer C, Wallaschofski H, Nauck M, Völzke H, Schober H-C, Hannemann A.** Fracture Risk and Risk Factors for Osteoporosis [eng]. *Deutsches Arzteblatt international* 112: 365–371, 2015.
28. **Giganti MG, Tresoldi I, Masuelli L, Modesti A, Grosso G, Liuni FM, Celi M, Rao C, Gasbarra E, Bei R, Tarantino U.** Fracture healing: from basic science to role of nutrition [eng]. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 19: 1162–1175, 2014.
29. **Muruganandan S, Govindarajan R, McMullen NM, Sinal CJ.** Chemokine-Like Receptor 1 Is a Novel Wnt Target Gene that Regulates Mesenchymal Stem Cell Differentiation [eng]. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 35: 711–724, 2017.
30. **Zhao H, Yan D, Xiang L, Huang C, Li J, Yu X, Huang B, Wang B, Chen J, Xiao T, Ren P-G, Zhang JV.** Chemokine-like receptor 1 deficiency leads to lower bone mass in male mice [eng]. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 76: 355–367, 2019.
31. **He J, Li J-C, Xie H, Xu Z-H, Sun Y-W, Shan Q.** Serum Chemerin Levels in relation to Osteoporosis and Bone Mineral Density: A Case-Control Study [eng]. *Disease markers* 2015: 786708, 2015.
32. **Shi L, Mao C, Wang X, Liu R, Li L, Mou X, Xu P, Li H, Xu C, Yuan G, Wan B, Zhang H.** Association of chemerin levels and bone mineral density in Chinese obese postmenopausal women [eng]. *Medicine* 95: e4583, 2016.
33. **Menzel J, Biemann R, Aleksandrova K, Schulze MB, Boeing H, Isermann B, Weikert C.** The cross-sectional association between chemerin and bone health in peri/pre and postmenopausal women: results from the EPIC-Potsdam study [eng]. *Menopause (New York, N.Y.)* 25: 574–578, 2018.
34. **Engin-Üstün Y, Çağlayan EK, Göçmen AY, Polat MF.** Postmenopausal Osteoporosis Is Associated with Serum Chemerin and Irisin but Not with Apolipoprotein M Levels [eng]. *Journal of menopausal medicine* 22: 76–79, 2016.
35. **Muruganandan S, Dranse HJ, Rourke JL, McMullen NM, Sinal CJ.** Chemerin neutralization blocks hematopoietic stem cell osteoclastogenesis [eng]. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 31: 2172–2182, 2013.

36. **Völzke H.** Study of Health in Pomerania (SHIP). Konzept, Kohortendesign und ausgewählte Ergebnisse [ger]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 55: 790–794, 2012.
37. **John U, Greiner B, Hensel E, Lüdemann J, Piek M, Sauer S, Adam C, Born G, Alte D, Greiser E.** Study of Health In Pomerania (SHIP): a health examination survey in an east German region: objectives and design. *Sozial- und Präventivmedizin* 46: 186–194, 2001.
38. **Völzke H, Alte D, Schmidt CO, Radke D, Lorbeer R, Friedrich N, Aumann N, Lau K, Piontek M, Born G, Havemann C, Ittermann T, Schipf S, Haring R, Baumeister SE, Wallaschofski H, Nauck M, Frick S, Arnold A, Jünger M, Mayerle J, Kraft M, Lerch MM, Dörr M, Reffelmann T, Empen K, Felix SB, Obst A, Koch B, Gläser S, Ewert R, Fietze I, Penzel T, Dören M, Rathmann W, Haerting J, Hannemann M, Röpcke J, Schminke U, Jürgens C, Tost F, Rettig R, Kors JA, Ungerer S, Hegenscheid K, Kühn J-P, Kühn J, Hosten N, Puls R, Henke J, Gloger O, Teumer A, Homuth G, Völker U, Schwahn C, Holtfreter B, Polzer I, Kohlmann T, Grabe HJ, Rosskopf D, Kroemer HK, Kocher T, Biffar R, John U, Hoffmann W.** Cohort profile: the study of health in Pomerania [eng]. *International journal of epidemiology* 40: 294–307, 2011.
39. **Völzke H, Ittermann T, Schmidt CO, Baumeister SE, Schipf S, Alte D, Biffar R, John U, Hoffmann W.** Prevalence trends in lifestyle-related risk factors [eng]. *Deutsches Arzteblatt international* 112: 185–192, 2015.
40. **Hadji P, Albert US, Bock K, Emons G, Gottschalk M, Hars O, Schulz K-D.** Knochendichtemessung mittels Ultraschall am Os calcaneus bei Patientinnen mit manifester Osteoporose. *Journal für Menopause*: 23–29, 1998.
41. **Chin K-Y, Ima-Nirwana S.** Calcaneal Quantitative Ultrasound as a Determinant of Bone Health Status: What Properties of Bone Does It Reflect? [eng]. *International Journal of Medical Sciences* 10: 1778–1783, 2013.
42. **Jergas M, Uffmann M, Wittenberg R, Müller P, Köster O.** Ultraschallgeschwindigkeitsmessungen an belastungstragenden und nicht-belastungstragenden Stellen des peripheren Skeletts. Der Einfluss körperlicher Aktivität bei Fussballspielern [ger]. *RöFo: Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und bildgebenden Verfahren* 157: 420–424, 1992.
43. **Moayyeri A, Adams JE, Adler RA, Krieg M-A, Hans D, Compston J, Lewiecki EM.** Quantitative ultrasound of the heel and fracture risk assessment: an updated meta-analysis [eng]. *Osteoporosis international* 23: 143–153, 2012.
44. **Kadric L, Zylla S, Nauck M, Völzke H, Friedrich N, Hannemann A.** Associations Between Plasma Chemerin Concentrations and Bone Quality in Adults From the General Population [eng]. *Endocrinology* 159: 2378–2385, 2018.
45. **Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H.** Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression [eng]. *Nature medicine* 17: 1231–1234, 2011.
46. **Blake GM, Fogelman I.** The role of DXA bone density scans in the diagnosis and treatment of osteoporosis [eng]. *Postgraduate medical journal* 83: 509–517, 2007.
47. **Glüer CC, Eastell R, Reid DM, Felsenberg D, Roux C, Barkmann R, Timm W, Blenk T, Armbrecht G, Stewart A, Clowes J, Thomasius FE, Kolta S.** Association of five quantitative ultrasound devices and bone densitometry with osteoporotic vertebral fractures in a population-based sample: the OPUS Study [eng]. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 19: 782–793, 2004.

48. **Trimpou P, Bosaeus I, Bengtsson B-A, Landin-Wilhelmsen K.** High correlation between quantitative ultrasound and DXA during 7 years of follow-up [eng]. *European journal of radiology* 73: 360–364, 2010.

7. Anhang

7.1 Wissenschaftliche Arbeit

Associations Between Plasma Chemerin Concentrations and Bone Quality in Adults From the General Population

Lejla Kadric[1], Stephanie Zylla[1,2], Matthias Nauck[1,2], Henry Völzke[2,3], Nele Friedrich[1,2] und Anke Hannemann[1]

[1] Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medicine Greifswald, 17475 Greifswald, Germany;
[2] DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), Partner Site Greifswald,University Medicine Greifswald, 17475 Greifswald, Germany;
[3] Institute for Community Medicine, University Medicine Greifswald, 17475 Greifswald, Germany

Reproduced with permission by the Endocrine Society and Oxford University Press (Copyrigh Clearance Center Order Number 4795481371173

Associations between plasma chemerin concentrations and bone quality in adults from the general population

Lejla Kadric[1], Stephanie Zylla[1,2], Matthias Nauck[1,2], Henry Völzke[2,3], Nele Friedrich[1,2], Anke Hannemann[1]

1) Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medicine Greifswald, Ferdinand-Sauerbruch-Straße, 17475 Greifswald, Germany

2) DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), Partner Site Greifswald, University Medicine, Greifswald, Germany

3) Institute for Community Medicine, University Medicine Greifswald, Walther Rathenau Straße 48, 17475 Greifswald, Germany

Corresponding author and address for reprint requests:

Anke Hannemann, Dr. rer. med.

Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

University Medicine Greifswald

Ferdinand-Sauerbruch-Straße

D-17475 Greifswald

Germany

Phone: +49-3834-86-19659

FAX:+49-3834-86-5502

E-Mail: anke.hannemann@uni-greifswald.de

Short title: Association between chemerin and bone quality

Keywords: BMI; chemerin; bone; obesity, osteoporosis, sex-specific, population-based

Funding: SHIP-TREND is part of the Research Network Community Medicine of the University Medicine Greifswald, which is supported by the German Federal State of Mecklenburg – West Pomerania (Grant Nos. 01ZZ9603, 01ZZ0103, and 01ZZ0403).

Disclosures: The authors have nothing to disclose.

Précis: We report inverse associations between plasma chemerin levels and bone quality in obese men and women. Thus, chemerin may play a role in bone loss in obesity.

ABSTRACT

Chemerin is an adipokine associated with parameters of inflammation and the metabolic syndrome. Small observational studies suggested that high circulating chemerin levels are also related to bone erosion. We aimed to determine whether plasma chemerin levels are related to bone quality in the general population and to investigate the influence of body mass index (BMI) on that relation. For our analyses we obtained data from 3,583 adults who participated in the population-based Study of Health in Pomerania (SHIP)-Trend. The participants were divided into three groups according to their BMI: lean (<25 kg/m²), overweight (25-30 kg/m²), and obese (≥30 kg/m²). Chemerin concentrations were determined in EDTA plasma (Mediagnost, Reutlingen, Germany). Bone quality was assessed using quantitative ultrasound at the heel (Achilles InSight, GE Healthcare, U.K.). The broadband ultrasound attenuation (BUA), speed of sound (SOS), stiffness index, and the osteoporotic fracture risk were derived from this measurement. Sex- and BMI-specific linear regression models revealed inverse associations between chemerin levels and BUA in obese men. In obese women inverse relations between chemerin levels and SOS or stiffness index were found. Logistic regression models revealed positive associations between chemerin levels and the osteoporotic fracture risk. In lean or overweight subjects no statistically significant associations were found. Our sex- and BMI-specific analyses showed that inverse associations between chemerin levels and bone quality are restricted to obese men and women. The observed association may be due to a chemerin-induced negative affect on bone metabolism, possibly due to abrogation of osteoblastogenesis or stimulation of adipogenesis.

INTRODUCTION

Obesity and osteoporosis are rising public health concerns which seem to be interrelated. Both conditions are associated with severe morbidity, an increased mortality rate, and rising costs for the health-care system (1-5). Bone is a dynamic connective tissue that underlies constant remodelling (6-9) with different parameters influencing the fragile balance between bone formation and resorption. Interestingly, osteoblasts and adipocytes have the same progenitor, the mesenchymal stem cell, which either undergoes osteoblastogenesis or adipogenesis. Thus, when adipogenesis outweighs, bone rebuilding activity may decrease (3,6-8).

Adipose tissue is a crucial endocrine organ that produces and secretes a plurality of adipokines which exert pleiotropic effects and are involved in the regulation of food intake, lipid and glucose metabolism, insulin resistance, inflammation and other biological processes (10). Furthermore, adipokines are cell signalling proteins that may affect bone remodelling via different pathways, such as RANKL (8,11-13). Moreover, it was found that osteoblasts and osteoclasts are variably activated by different adipokines (14).

The number of discovered adipokines is immense and constantly increasing. While the functions of the earlier identified adipokines, such as adiponectin and leptin have already been well investigated, the role of more recently identified adipokines like chemerin needs to be evaluated (15). Chemerin, also known as tazarotene-induced gene 2 protein (TIG2), is secreted as 18-kDa prochemerin that requires further extracellular C-terminal processing to generate the 16-kDa active chemerin (16). It is highly expressed in white adipose tissue, lungs and liver (17). Chemerin exerts its biological effects mainly through the CMKLR1 receptor, which mRNA is especially expressed in white adipose tissue and immune cells

(17). Chemerin is assumed to regulate adipocyte development, glucose metabolism and to modify metabolic functions in mature adipocytes (18,19). Furthermore, experimental data from rats showed that chemerin and its receptor CMKLR1 may play an important role in osteoblastogenesis, bone mineralisation, as well as inhibition of osteoclastogenesis (20). Another experimental study revealed that rising chemerin levels in hematopoietic stem cells modulate higher osteoclastogenesis (21).

So far, only few studies (22-25) have investigated the associations between circulating chemerin levels and bone mineral density (BMD) or osteoporosis in humans. From these studies, inverse relations between serum chemerin levels and lumbar BMD in obese postmenopausal women (24) or lumbar and femoral BMD (23) in elderly men and women have been reported. However, there are also conflicting data, as serum chemerin levels were found to be higher (23) or lower (22) in patients with osteoporosis compared to healthy controls.

Overall, experimental studies (20,21) provided first indications for a role of chemerin in bone remodelling, while observational studies in humans are still rare and mostly limited by small sample sizes (22,23,25) or restricted to postmenopausal (22) or postmenopausal obese women (24). Therefore, the aim of the present study was to investigate the association between plasma chemerin levels and bone quality, assessed by quantitative ultrasound (QUS) at the heel, in a large sample from the general population. Moreover we aimed to examine the influence of body mass index (BMI) on that association as both plasma chemerin levels and bone quality are related to it.

MATERIAL and METHODS

Study population

SHIP-TREND is the second cohort of the Study of Health in Pomerania (SHIP), a population-based research project in West Pomerania, a rural region in north-east Germany (26). A stratified random sample of 8,826 adults aged 20-79 years was drawn from population registries. Sample selection was facilitated by centralization of local population registries in the Federal State of Mecklenburg-West Pomerania. Stratification variables were age, sex and city/county of residence. Out of all invitations, 4,420 individuals chose to participate (50.1% response) in the examinations between 2008 and 2012. The study followed the recommendations of the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committee of the University of Greifswald. SHIP data are publically available for scientific and quality control purposes. Data usage can be applied for via www.community-medicine.de.

QUS measurements were offered to all SHIP-Trend participants, who were examined in the main examination centre in Greifswald (n=3938). Participants who were examined in mobile examination centres (n=482) could not opt for this measurement. Moreover, all subjects with implants, prostheses, or amputations in or below the knee were excluded from the measurements, as were participants with open wounds or infections below the knee. In addition, we do not report data for wheelchair-bound participants, for participants whose feet could not be placed correctly and for participants who reported injuries or surgeries during the last 12 month before the SHIP-examinations (n=82). Of the 3856 SHIP-Trend participants with QUS measurements, 93 subjects with missing chemerin values were excluded. Moreover, 180 subjects were excluded due to the presence of at least one of the following conditions: pregnancy, estimated glomerular filtration rate <30 mL/min/1.73 m^2, medication intake (bisphosphonates (anatomic-therapeutic-chemical [ATC] code M05BA,

M05BB), selective estrogen receptor modulators (ATC G03XC), vitamin D (ATC A11CC), parathyroid hormone (ATC H05AA), glucocorticoids for systemic use (ATC H02AB, H02BX)), parathyroid hormone >120 pg/ml, outliers for chemerin (values above the sex-specific 99% percentile) or missing values for confounding factors. The final study population comprised 3,583 individuals (1,780 men, 1,803 women).

Measurements

Information on age, sex, socio-demographic characteristics, and medical histories were collected by computer-aided personal interviews. Smoking status and physical activity were assessed by self-report. Standard digital scales were used to measure weight (to the nearest 0.1 kg) of subjects in light clothing and without shoes. Height was measured with a digital ultrasound instrument (to the nearest 0.1 cm). BMI was calculated from the body weight in kilogram and height in meters [BMI = kg/m^2]. BMI was categorised into three groups: lean (<25 kg/m²), overweight (25-30 kg/m²), and obese (≥30 kg/m²). Hormone intake among women was defined as hormonal contraceptives for systemic use (ACT G03A), estrogens (ACT G03C), progesterons (ACT G03D), progesterons and estrogens in combination (ACT G03F).

In SHIP-Trend, venous blood samples were collected between 7 a.m. and 1 p.m. from the cubital vein of subjects in the supine position. The majority (61.2%) of study participants provided fasting (>8h) blood samples, the remaining samples (38.8%) were obtained from non-fasting subjects. Aliquots were prepared for immediate analysis and for storage at -80° C. Glycated hemoglobin (HbA1c) was determined by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection (Diamat Analyzer; Bio-Rad, Munich, Germany). Plasma fibrinogen concentrations were measured according to the Clauss method by coagulation analyzers (BCS-XP; Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn,

Germany). Serum high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) concentrations were determined by nephelometry on the Dimension Vista analytical system (Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Germany). Serum concentrations of intact amino-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) and carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (CTX) were determined on the IDS-iSYS Multi-Discipline Automated Analyzer (Immunodiagnostic Systems Limited, Frankfurt am Main, Germany). Serum creatinine concentrations were determined with a modified kinetic Jaffé method with a sensitivity of 0.14-20.2 mg/dl (Dimension VISTA, Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Germany). The creatinine-based eGFR was calculated using the four-variable Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) study equation (27): eGFR(crea) = 186 × serum creatinine$^{-1.154}$ × age$^{-0.203}$ × (0.742 if female). Chemerin levels were determined in EDTA plasma using an enzyme-linked immunosorbent assay technique (Mediagnost, Reutlingen, Germany). The inter-assay coefficients of variation were 5.8% and 5.5% for low and high chemerin levels, respectively.

Quantitative Ultrasound

Bone quality was assessed by quantitative ultrasound (QUS) at the heel using the Achilles InSight device (GE Medical Systems Ultrasound, GE Healthcare, Chalfont St Giles, U.K.), a water-based bone ultrasonometer. As previously described (28) the system measures the frequency-dependent attenuation of the sound waves (BUA) and the speed of sound waves (SOS) as they pass through the heel (os calcis). BUA and SOS were combined to form the stiffness index according to the following formula: stiffness index = (0.67 × BUA) + (0.28 × SOS) − 420. The system automatically compares individual stiffness index results to values obtained in a young reference population. This reference population was provided with the Achilles InSight and contains sex-specific data for Germany. Indices below the reference

mean minus 2.5 standard deviations (SDs) were taken to indicate a high osteoporotic fracture risk, indices above the reference mean minus 2.5 SDs but below the reference mean minus 1 SD were taken to indicate a medium osteoporotic fracture risk and indices above the reference mean minus 1 SD were taken to indicate a low osteoporotic fracture risk. During the course of the study, two devices without systematic differences were used. The measurements were performed successively on both feet of seated participants by trained and certified examiners.

All examiners underwent an initial certification process and annual re-certifications. During the annual re-certifications, each examiner performed two QUS measurements on the right foot on each of five volunteers. Coefficients of variation (CV) were determined for intra-observer [BUA 2.98%, SOS 0.39%, stiffness index 2.74%] and inter-observer variability (BUA 3.47%, SOS 0.36%, stiffness index 3.29%). Alcohol was used as coupling agent.

Statistical analysis

Continuous data are expressed as median (25th; 75th quartile), and nominal data are given as percentage. For comparisons between BMI groups the Kruskal-Wallis test (continuous data) or χ^2-test (nominal data) were used. In a first step, linear regression models adjusted for age, physical activity, smoking, diabetes mellitus, HbA1c, eGFR, fibrinogen and BMI were obtained to assess the associations between plasma chemerin levels and QUS parameters, separately for men and women. In men, BMI was an effect modifier (interaction term $p<0.10$) in the associations of chemerin with BUA and stiffness index. In women, BMI was an effect modifier in the associations of chemerin with SOS and stiffness index. Therefore, we decided to stratify all following analyses according to sex and BMI groups (<25 kg/m², 25-30 kg/m², ≥30 kg/m²). The models were adjusted for age, BMI, physical activity, smoking, diabetes mellitus, HbA1c, eGFR and fibrinogen. Among women,

regression models were additionally adjusted for hormone intake in a further model. Possible non-linear associations were tested in all models by including restricted cubic splines with three knots located at the 5th, 50th, and 95th percentile (29). The likelihood ratio test indicated no significant increase in model fitness. Therefore, no spline term was included in the regression model. In a second step, logistic regression models with the same adjustment set as mentioned above were calculated to analyze the association between chemerin levels and medium/high osteoporotic fracture risk. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were performed with SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

RESULTS

General characteristics of the study population are given in Table 1. About 78% of men and 60% of women were overweight or obese. Obese men and women were older, less often physically active and had lower bone turnover marker concentrations compared to lean and overweight subjects. Moreover, HbA1c, fibrinogen, hs-CRP levels and diabetes prevalence increase whereas the eGFR decreases with rising BMI in both sexes (Table 1). With respect to plasma chemerin levels, men had lower concentrations than women and a strong increase over BMI groups was observed in both sexes. (Figure 1). Concerning the QUS parameters, men showed overall higher BUA [men: 117 dB/MHz (108; 127); women: 109 dB/MHz (100; 119), $p<0.01$] and stiffness index values [men: 96 (84; 109); women: 90 (80; 103), $p<0.01$] than women.

Linear regression analyses indicated inverse associations of plasma chemerin with BUA in obese men whereas no significant association with SOS or stiffness index was found in these subjects (Table 2, Figure 2). In obese women, significantly inverse relations between

chemerin and SOS as well as stiffness index became apparent. In lean or overweight men or women, no significant association of chemerin with any of the QUS parameters became apparent (Table 2, Figure 2).

With respect to osteoporotic fracture risk, descriptive statistics revealed lower plasma chemerin levels among men and women with a low compared to those with a medium/high fracture risk independent of the BMI group (Figure 1). Logistic regression analyses demonstrated a positive association between plasma chemerin and a medium/high risk for osteoporotic fractures among obese subjects (Table 3). Among obese men, a one standard deviation increase in chemerin was related to 27% higher odds for a medium/high risk vs. a low risk for osteoporotic fractures. A similar trend was found in obese women who had a 21% higher odds for a medium/high risk vs. a low risk, even if the estimate barely missed statistical significance (p=0.10). Interestingly, this relation was not seen in lean as well as overweight men or women.

The additional adjustment for hormone intake did not alter the findings observed in women (Tables 2 and 3).

DISCUSSION

In the present study we investigated the associations between plasma chemerin levels and QUS-based parameters in the large population-based SHIP-TREND cohort. We observed an inverse relation between chemerin levels and BUA among obese men, as well as between chemerin levels and SOS or stiffness index in obese women. Moreover, positive associations between chemerin levels and a medium/high risk for osteoporotic fractures in obese men and women were observed. In lean or overweight subjects, no associations between plasma chemerin concentrations and the QUS-based parameters were detected.

Our analyses revealed inverse associations of chemerin with BUA in men and with SOS in women. While BUA and SOS are both related to BMD, SOS is also related to microarchitectural indices of bone, such as bone volume, trabecular number and trabecular thickness, as well as bone strength and elasticity (30). Thus, our results indicate that the bone loss observed with increasing chemerin levels in obese men may be due to a reduction in BMD, while in obese women also a damage in bone microstructure may occur. However, this interpretation is highly speculative and must be further examined. Moreover, from a clinical point of view, it is secondary whether BUA, SOS or stiffness index are affected by chemerin, as each of the QUS parameters can reliably predict fracture risk in elderly men and women (31).

Previously, only few studies (22-25) assessed the association between circulating chemerin and bone health. Two of these studies (23,24) reported an unfavourable effect of high chemerin levels on bone health. Thus, chemerin levels were higher in 93 elderly Chinese patients with osteoporosis than in 93 healthy controls (23). Moreover, inverse correlations between chemerin and femoral as well as lumbar BMD were found in these subjects (23). An inverse association between chemerin and BMD at the lumbar site was also reported in a study among 543 obese Chinese women with postmenopausal osteoporosis (24). Therefore, both studies are in line with our results of an association between increasing chemerin concentrations with decreasing QUS-based bone quality in obese individuals. In contrast, two other studies (22,25) reported conflicting data. Among 88 Turkish women with postmenopausal osteoporosis chemerin levels were lower than in 88 postmenopausal controls without osteoporosis (22). Additionally, chemerin was inversely associated with the presence of osteoporosis in 120 Greek patients with inflammatory bowel disease (25). These conflicting results can be explained by differences in sample sizes and study

populations, e.g. the restriction to patients with inflammatory bowel disease (25) or the relatively small patient sample that did not include men (22). The results obtained from the latter studies (22,25) may therefore not be applicable to the general population. Interestingly, there were no associations between chemerin and the QUS-based parameters in lean and overweight subjects in our study population. Previous studies did not assess the relations between chemerin and bone health according to adiposity, which may further contribute to explain the different findings.

Although previous study results were at least in part conflicting, several studies including ours suggest that chemerin unfavourably affects bone quality. In a series of well-designed studies, Muruganandan et al. (8,20,21,32) detected a range of possible underlying mechanisms that may elucidate this association. Chemerin activates the G-protein-coupled receptor, CMLKR1 which is expressed by different cell types such as mesenchymal stem cells, adipocytes and osteoblasts (21). Via signalling through CMLKR1, chemerin impacts the competitive differentiation of mesenchymal stem cells into adipocytes or osteoblasts and promotes adipogenesis. Recent data (32) demonstrated that next to the stimulation of adipogenic signalling also the suppression of the osteogenic Wnt and Notch pathways are affected by CMKLR1 signalling. Changes in Notch signalling promoted by CMKLR1 mediate the interaction between adipogenic PPAR-γ signalling and osteoblastogenic Wnt signalling (32). CMKLR1 signalling may thus increase adipogenesis and reduce osteoblastogenesis. This is supported by the observation that in CMKLR1 knockdown in bone marrow stromal cells adipocyte differentiation was abrogated while the expression of osteoblast markers increased (20). In obese subjects with a large fat mass or fatty bone marrow, the higher chemerin secretion from adipocytes may have an impact on the regulation of mesenchymal stem cell differentiation causing an imbalance of bone homeostasis. In our study inverse

associations between chemerin and bone quality were only evident in obese but not in lean or overweight subjects. Therefore, we speculate that the above mentioned effects of chemerin on bone homeostasis may only be detectable in obese subjects. However, these assumptions must be proved in further studies.

Another possible explanation for the lack of results among lean subjects in our study could lie in chemerin activation. Chemerin is secreted as inactive prochemerin (chem163S) (10,33). Via proteolytic cleavage by several enzymes, such as plasmin, carboxypeptidase B2 or carboxypeptidase N, an active form of chemerin (chem157S) is generated (10,33,34). Next to these, further inactive chemerin variants are present in the circulation (34) and their distribution differs between lean and obese subjects. In detail, Chang et al. (34) observed that in obese patients undergoing bariatric surgery there is less inactive chemerin but more of its other, probably processed, forms, than in lean control subjects. This finding suggests a greater activation and proteolysis of prochemerin in obese patients compared to lean controls (34). The increased activation in obesity in turn, may result into stronger negative effects of chemerin on bone homeostasis and bone quality in obese than in normal weight subjects.

As described above, chemerin acts on bone remodelling via osteoblastogenesis. Beyond that, chemerin is essential for hematopoietic stem cell (HSC) osteoclastogenesis. Several proinflammatory cytokines and proteins which are secreted from osteoblasts, such as MCSF (macrophage colony-stimulating factor) and IL-6 induce the evolution from HSC in preosteoclasts, while the enhancement to mature osteoclasts is triggered by RANKL/RANK/OPG, which are as well secreted by osteoblasts (3,8,24). Chemerin modulates NFAT2 expression, which is necessary in the early processes in osteoclastic differentiation of HSCs (21,24,35). Numerous animal and cell culture studies confirmed

these observations (21,35,36). Muruganandan et al. (21) even speculated that knockdown of chemerin signalling may abrogate osteoclastogenesis and that chemerin neutralization via antibodies could possibly have a therapeutic value for treating malfunctions of bone remodelling, following the example of the therapeutic antibody denosumab. Ultimately, various mechanisms linking chemerin and bone metabolism have been described and are further supported by our results.

Strengths of this study include the large, population-based sample size which allowed us to examine sex- and BMI-specific effects of chemerin on bone quality in a general population. Additionally, the medical examinations that all study participants underwent, were performed by certified examiners ensuring high data quality. Nevertheless, certain limitations apply to this study. Our study population represents a subsample of the whole SHIP-Trend cohort, namely those who participated in QUS measurements. Due to the fact that participants who had injuries or surgeries in the last twelve months before the examination were excluded, our participants are healthier than non-participants. Hence, our findings may not apply to a more morbid population. Another limitation is the use of QUS instead of DXA, which is the gold standard measurement for diagnosis of osteoporosis as recommended by the WHO (37). However, QUS measurements have the advantage of being non-invasive and radiation-free and also allow a good osteoporotic fracture risk estimation (38,39). Finally, our cross-sectional study does not allow to draw causal implications from the observed associations.

In conclusion, the present study revealed a significant inverse association between plasma chemerin levels and bone quality in a population-based sample. It is important to emphasize that this association was dependent on the subjects BMI and only apparent in obese men and women. The observed association may be due to a chemerin-induced negative affect

on bone metabolism, possibly due to abrogation of osteoblastogenesis or stimulation of adipogenesis via CMKLR1. However, further longitudinal studies on chemerin and bone metabolism are required.

REFERENCES

1. U.S. Department of Health and Human Services. Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. Rockville, MD: Office of the Surgeon General, 2004.

2. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA.* 2010;303(3):235-241.

3. Rosen CJ, Bouxsein ML. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006;2(1):35-43.

4. Shapses SA, Pop LC, Wang Y. Obesity is a concern for bone health with aging. *Nutr Res.* 2017;39(1-13.

5. Wright NC, Looker AC, Saag KG, Curtis JR, Delzell ES, Randall S, Dawson-Hughes B. The recent prevalence of osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the femoral neck or lumbar spine. *J Bone Miner Res.* 2014;29(11):2520-2526.

6. Andersen TL, Abdelgawad ME, Kristensen HB, Hauge EM, Rolighed L, Bollerslev J, Kjaersgaard-Andersen P, Delaisse JM. Understanding coupling between bone resorption and formation: are reversal cells the missing link? *Am J Pathol.* 2013;183(1):235-246.

7. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(2):236-253.

8. Muruganandan S, Sinal CJ. The impact of bone marrow adipocytes on osteoblast and osteoclast differentiation. *IUBMB Life.* 2014;66(3):147-155.

9. Tamma R, Zallone A. Osteoblast and osteoclast crosstalks: from OAF to Ephrin. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2012;11(3):196-200.

10. Ernst MC, Sinal CJ. Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(11):660-667.

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

12. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med.* 2011;17(10):1231-1234.

13. Ng A, Duque G. Osteoporosis as a lipotoxic disease. *IBMS BONEKEY.* 2010;7:108-123.

14. Cao JJ. Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res.* 2011;6:30.

15. Neumann E, Junker S, Schett G, Frommer K, Muller-Ladner U. Adipokines in bone disease. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(5):296-302.

16. Wittamer V, Gregoire F, Robberecht P, Vassart G, Communi D, Parmentier M. The C-terminal nonapeptide of mature chemerin activates the chemerin receptor with low nanomolar potency. *J Biol Chem.* 2004;279(11):9956-9962.

17. Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, Walder K, Segal D. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology.* 2007;148(10):4687-4694.

18. Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, Muruganandan S, Sinal CJ. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J Biol Chem.* 2007;282(38):28175-28188.

19. Rourke JL, Dranse HJ, Sinal CJ. Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease. *Obes Rev.* 2013;14(3):245-262.

20. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ. Role of chemerin/CMKLR1 signaling in adipogenesis and osteoblastogenesis of bone marrow stem cells. *J Bone Miner Res.* 2010;25(2):222-234.

21. Muruganandan S, Dranse HJ, Rourke JL, McMullen NM, Sinal CJ. Chemerin neutralization blocks hematopoietic stem cell osteoclastogenesis. *Stem Cells.* 2013;31(10):2172-2182.

22. Engin-Ustun Y, Caglayan EK, Gocmen AY, Polat MF. Postmenopausal Osteoporosis Is Associated with Serum Chemerin and Irisin but Not with Apolipoprotein M Levels. *J Menopausal Med.* 2016;22(2):76-79.

23. He J, Li JC, Xie H, Xu ZH, Sun YW, Shan Q. Serum Chemerin Levels in relation to Osteoporosis and Bone Mineral Density: A Case-Control Study. *Dis Markers.* 2015;2015:786708.

24. Shi L, Mao C, Wang X, Liu R, Li L, Mou X, Xu P, Li H, Xu C, Yuan G, Wan B, Zhang H. Association of chemerin levels and bone mineral density in Chinese obese postmenopausal women. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(35):e4583.

25. Terzoudis S, Malliaraki N, Damilakis J, Dimitriadou DA, Zavos C, Koutroubakis IE. Chemerin, visfatin, and vaspin serum levels in relation to bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2016;28(7):814-819.

26. Volzke H, Alte D, Schmidt CO, Radke D, Lorbeer R, Friedrich N, Aumann N, Lau K, Piontek M, Born G, Havemann C, Ittermann T, Schipf S, Haring R, Baumeister SE, Wallaschofski H, Nauck M, Frick S, Arnold A, Junger M, Mayerle J, Kraft M, Lerch MM, Dorr M, Reffelmann T, Empen K, Felix SB, Obst A, Koch B, Glaser S, Ewert R, Fietze I, Penzel T, Doren M, Rathmann W, Haerting J, Hannemann M, Ropcke J, Schminke U, Jurgens C, Tost F, Rettig R, Kors JA, Ungerer S, Hegenscheid K, Kuhn JP, Kuhn J, Hosten N, Puls R, Henke J, Gloger O, Teumer A, Homuth G, Volker U, Schwahn C, Holtfreter B, Polzer I, Kohlmann T, Grabe HJ, Rosskopf D, Kroemer HK, Kocher T, Biffar R, John U, Hoffmann W. Cohort profile: the study of health in Pomerania. *Int J Epidemiol.* 2011;40(2):294-307.

27. Levey A, Greene T, Kusek J, Beck G. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine [abstract]. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:A0828.

28. Berg RM, Wallaschofski H, Nauck M, Rettig R, Markus MR, Laqua R, Friedrich N, Hannemann A. Positive Association Between Adipose Tissue and Bone Stiffness. *Calcif Tissue Int.* 2015;97(1):40-49.

29. Stone CJ, Koo CY. Additive splines in statistics. Proceedings of the Statistical Computing Section. *American Statistical Association. Washington DC..* 1985;45-48.

30. Chin KY, Ima-Nirwana S. Calcaneal quantitative ultrasound as a determinant of bone health status: what properties of bone does it reflect? *Int J Med Sci.* 2013;10(12):1778-1783.

31. Moayyeri A, Adams JE, Adler RA, Krieg MA, Hans D, Compston J, Lewiecki EM. Quantitative ultrasound of the heel and fracture risk assessment: an updated meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2012;23(1):143-153.

32. Muruganandan S, Govindarajan R, McMullen NM, Sinal CJ. Chemokine-Like Receptor 1 Is a Novel Wnt Target Gene that Regulates Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Stem Cells.* 2017;35(3):711-724.

33. Zabel BA, Allen SJ, Kulig P, Allen JA, Cichy J, Handel TM, Butcher EC. Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. *J Biol Chem.* 2005;280(41):34661-34666.

34. Chang SS, Eisenberg D, Zhao L, Adams C, Leib R, Morser J, Leung L. Chemerin activation in human obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2016;24(7):1522-1529.

35. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell.* 2002;3(6):889-901.

36. Berg V, Sveinbjornsson B, Bendiksen S, Brox J, Meknas K, Figenschau Y. Human articular chondrocytes express ChemR23 and chemerin; ChemR23 promotes inflammatory signalling upon binding the ligand chemerin(21-157). *Arthritis Res Ther.* 2010;12(6):R228.

37. Blake GM, Fogelman I. The role of DXA bone density scans in the diagnosis and treatment of osteoporosis. *Postgrad Med J.* 2007;83(982):509-517.

38. Gluer CC, Eastell R, Reid DM, Felsenberg D, Roux C, Barkmann R, Timm W, Blenk T, Armbrecht G, Stewart A, Clowes J, Thomasius FE, Kolta S. Association of five quantitative ultrasound devices and bone densitometry with osteoporotic vertebral fractures in a population-based sample: the OPUS Study. *J Bone Miner Res.* 2004;19(5):782-793.

39. Trimpou P, Bosaeus I, Bengtsson BA, Landin-Wilhelmsen K. High correlation between quantitative ultrasound and DXA during 7 years of follow-up. *Eur J Radiol.* 2010;73(2):360-364.

TABLES

Table 1. General characteristics of the study population stratified by sex and body mass index (BMI).

	Men				Women			
	BMI: <25kg/m²	**BMI: 25-30kg/m²**	**BMI: ≥30kg/m²**	**p**	**BMI: <25kg/m²**	**BMI: 25-30kg/m²**	**BMI: ≥30kg/m²**	**p**
N	392	822	566		708	613	482	
Age, years	41 (30; 54)	53 (41; 65)	57 (46; 66)	<0.01	43 (33; 53)	54 (42; 64)	56 (45; 65)	<0.01
Physical activity, %	73.2	71.8	62.9	<0.01	69.4	73.4	67.6	0.09
Smoking, %				<0.01				<0.01
Never smoker	24.0	30.3	21.2		41.0	46.5	49.6	
Ex-smoker	30.4	43.7	54.8		27.5	29.4	31.5	
Current smoker	45.7	26.0	24.0		31.5	24.1	18.9	
BMI, kg/m²	23.4 (22.0; 24.3)	27.5 (26.3; 28.7)	32.5 (31.1; 34.6)	<0.01	22.4 (21.1; 23.7)	27.2 (26.1; 28.4)	33.3 (31.3; 36.3)	<0.01
HbA1c, %	5.1 (4.8; 5.4)	5.3 (4.9; 5.7)	5.5 (5.1; 6.0)	<0.01	5.0 (4.7; 5.3)	5.2 (4.8; 5.6)	5.4 (5.0; 5.8)	<0.01
Diabetes, %	2.6	7.9	20.7	<0.01	1.6	5.7	16.6	<0.01
eGFR, ml/min/1.73m²	97 (86; 110)	87 (76; 102)	86 (74; 99)	<0.01	90 (80; 104)	85 (73; 100)	80 (70; 94)	<0.01
Fibrinogen, g/l	2.5 (2.2; 3.2)	2.8 (2.4; 3.3)	3.1 (2.5; 3.5)	<0.01	2.8 (2.4; 3.3)	3.2 (2.7; 3.5)	3.4 (3.0; 3.9)	<0.01
hs-CRP, mg/l†	0.74 (0.39; 1.44)	1.00 (0.57; 1.87)	1.73 (0.94; 3.55)	<0.01	0.94 (0.51; 1.99)	1.38 (0.77; 2.84)	2.86 (1.34; 5.28)	<0.01
PINP, ng/ml†	54.2 (41.0; 70.4)	42.4 (33.1; 54.1)	39.3 (31.1; 51.4)	<0.01	45.1 (34.0; 61.3)	45.7 (34.9; 59.1)	41.3 (32.8; 55.0)	<0.01
CTX, ng/ml†	0.36 (024; 0.50)	0.27 (0.18; 0.38)	0.21 (0.13; 0.31)	<0.01	0.25 (0.16; 0.38)	0.26 (0.16; 0.38)	0.22 (0.14; 0.32)	<0.01

Hormone intake*, %	-	-	-	-	28.0	16.2	10.4	<0.01
Chemerin, ng/ml	81 (69; 94)	91 (79; 109)	106 (90; 122)	<0.01	87 (75; 102)	104 (89; 121)	116 (101; 136)	<0.01
BUA, dB/MHz	114 (105; 124)	117 (108; 128)	119 (110; 129)	<0.01	108 (99; 118)	108 (99; 120)	111 (103; 120)	<0.01
SOS, m/s	1563 (1584; 1587)	1562 (1540; 1589)	1563 (1539; 1585)	0.98	1565 (1543; 1588)	1560 (1539; 1579)	1560 (1539; 1582)	<0.01
stiffness index	94 (83; 108)	96 (84; 109)	98 (86; 109)	0.06	90 (79; 104)	89 (78; 102)	90 (80; 103)	0.18
Risk for osteoporotic fractures, %				0.01				0.23
Low risk	64.5	68.6	73.7		61.7	61.8	66.2	
Medium/high risk	35.5	31.4	26.7		38.3	38.2	33.8	

Data are expressed as median (25th percentile; 75th percentile); nominal data are given as percentages. χ2-test (nominal data) or Kruskal-Wallis test (interval data) was used for comparisons between BMI groups. eGFR = estimated glomerular filtration rate; HbA1c = glycated hemoglobin; hs-CRP = high-sensitivity C-reactive protein; PINP = intact amino-terminal propeptide of type I procollagen; CTX = carboxy-terminal telopeptide of type I collagen; BUA = broadband ultrasound attenuation; SOS = speed of sound; stiffness index = (0,67*BUA)+(0,28*SOS)-420. *Hormone intake is defined as hormonal contraceptives for systemic use (ACT G03A), estrogens (ACT G03C), progesterons (ACT G03D), progesterons and estrogens in combination (ACT G03F). †hs-CRP n=143 missings; PINP n=23 missings; CTX n=58 missings

Table 2. Association between plasma chemerin and quantitative ultrasound parameters in men and women stratified by body mass index (BMI).

	BMI: <25kg/m^2			BMI: 25-30kg/m^2			BMI: ≥30kg/m^2		
	Estimate per SD increase in chemerin	**Stderr**	**P**	**Estimate per SD increase in chemerin**	**Stderr**	**P**	**Estimate per SD increase in chemerin**	**Stderr**	**P**
Men									
BUA	-0.93	0.81	0.25	-0.07	0.54	0.89	-1.31	0.66	0.05
SOS	-1.95	2.32	0.40	0.03	1.47	0.99	-1.84	1.77	0.30
stiffness index	-1.17	1.10	0.29	-0.04	0.72	0.95	-1.39	0.83	0.09
Women									
Model without adjustment for hormone intake									
BUA	-0.35	0.59	0.56	0.27	0.62	0.66	-0.66	0.65	0.31
SOS	-0.11	1.37	0.94	-0.12	1.41	0.93	-5.25	1.51	<0.01
stiffness index	-0.26	0.71	0.71	0.15	0.73	0.84	-1.91	0.77	0.01
Model with adjustment for hormone intake									
BUA	-0.37	0.59	0.54	0.30	0.62	0.63	-0.68	0.65	0.29
SOS	-0.05	1.38	0.97	-0.03	1.42	0.98	-5.16	1.50	<0.01
stiffness index	-0.26	0.71	0.71	0.19	0.74	0.79	-1.91	0.77	0.01

Stderr = standard error; BUA = broadband ultrasound attenuation; SOS = speed of sound; stiffness index = (0,67*BUA)+(0,28*SOS)-420. Hormone intake is defined as intake of hormonal contraceptives for systemic use (ACT

G03A), estrogens (ACT G03C), progesterons (ACT G03D), progesterons and estrogens in combination (ACT G03F). Linear regression models were adjusted for age, physical activity, smoking, diabetes mellitus, HbA1c, eGFR, fibrinogen and BMI.

Table 3. Association between plasma chemerin and a medium/high risk for osteoporotic fractures in men and women stratified by body mass index (BMI).

	BMI: <25kg/m²		**BMI: 25-30kg/m²**		**BMI: ≥30kg/m²**	
	OR (95%-CI)	**P**	**OR (95%-CI)**	**P**	**OR (95%-CI)**	**P**
Men (cases/N)	138/392		258/822		151/566	
per SD increase in Chemerin	1.16 (0.90; 1.51)	0.26	1.08 (0.90; 1.29)	0.41	1.27 (1.03; 1.58)	0.03
Women (cases/N)	271/708		234/613		163/482	
Model without adjustment for hormone intake						
per SD increase in Chemerin	0.99 (0.82; 1.20)	0.96	0.97 (0.79; 1.18)	0.74	1.21 (0.96; 1.52)	0.10
Model with adjustment for hormone intake						
per SD increase in Chemerin	1.00 (0.83; 1.21)	0.99	0.96 (0.79; 1.18)	0.72	1.21 (0.97; 1.52)	0.10

BMI = body-mass-index; SD = standard deviation; OR = odds ratio; CI = confidence interval. Hormone intake is defined as intake of hormonal contraceptives for systemic use (ACT G03A), estrogens (ACT G03C), progesterons (ACT G03D), progesterons and estrogens in combination (ACT G03F). Logistic regression models were adjusted for age, physical activity, smoking, diabetes mellitus, HbA1c, eGFR, fibrinogen and BMI.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Sex-specific box-plots for plasma chemerin according to body mass index (BMI) and quantitative ultrasound (QUS)-based osteoporotic fracture risk. Kruskal-Wallis tests revealed significant differences ($p<0.01$) in plasma chemerin levels between the BMI groups in men and women independent of the osteoporotic fracture risk.

Figure 2. Association between plasma chemerin and BUA, SOS, or stiffness index stratified by body mass index (BMI) and sex. Linear regression models were adjusted for age, physical activity, smoking, diabetes mellitus, HbA1c, eGFR, fibrinogen and BMI. BUA = broadband ultrasound attenuation; SOS = speed of sound; stiffness index = (0.67*BUA)+(0.28*SOS)-420.

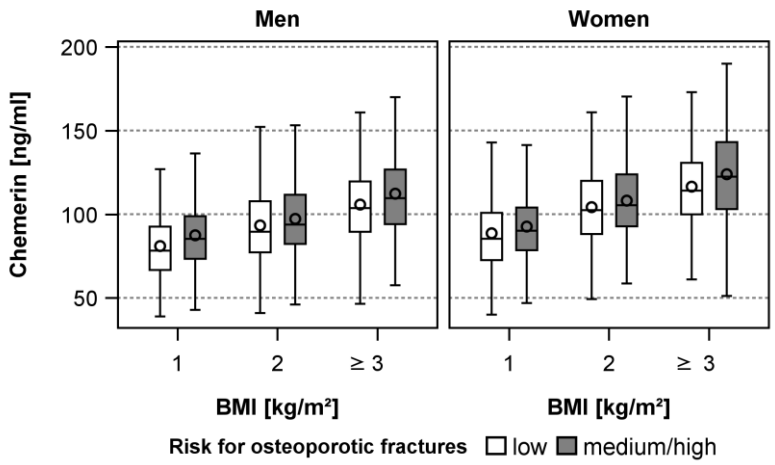
Men
Women
Chemerin [ng/ml]
200
150
100
50
1
2
≥ 3
BMI [kg/m²]
Risk for osteoporotic fractures
low
medium/high

Figure 1.

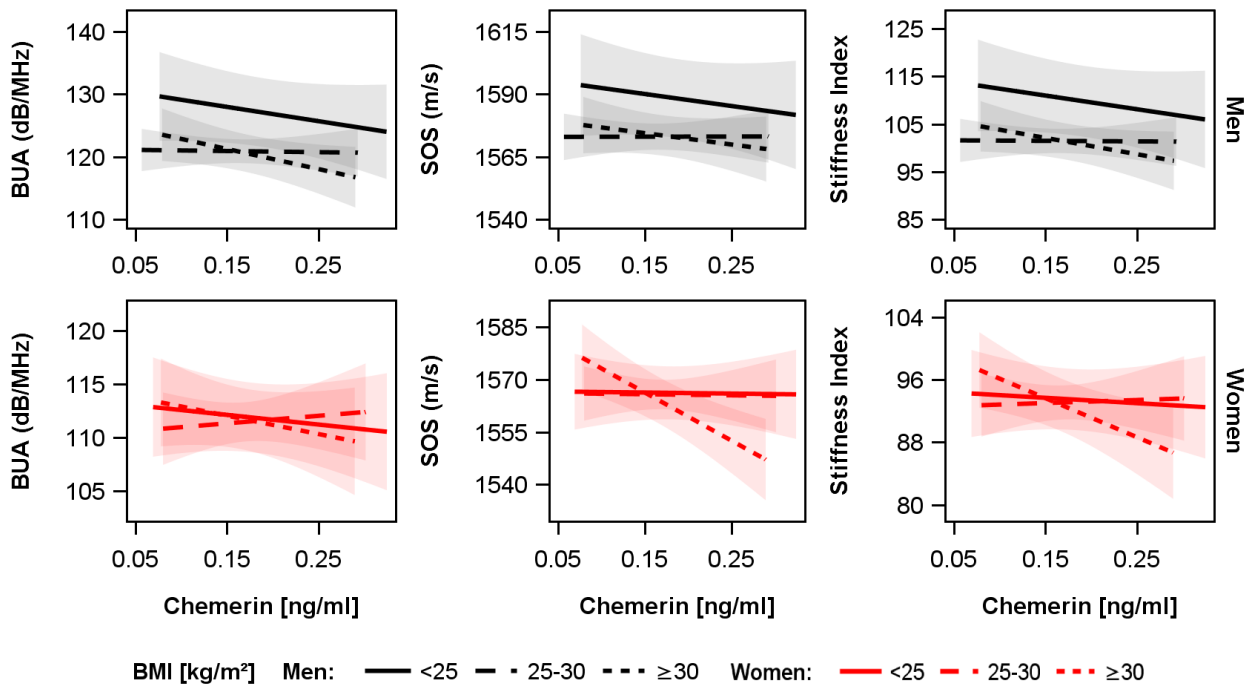
BUA (dB/MHz)
SOS (m/s)
Stiffness Index
Men
Women
Chemerin [ng/ml]
BMI [kg/m²] Men: <25 25-30 ≥30 Women: <25 25-30 ≥30

Figure 2.

7.2. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin unter Betreuung von Frau PD Dr. rer. med. Nele Friedrich durchgeführt.

Die in der vorliegenden Studie untersuchten SHIP-Daten wurden federführend von der Abteilung SHIP-KEF (Institut für Community Medicine, Universitätsmedizin Greifswald) erhoben. Die gesammelten Daten werden vom Forschungsverbund Community Medicine (*http://www2.medizin.uni-greifswald.de/cm/ fv/forschungsverbund/*) verwaltet und können von internen sowie externen Wissenschaftlern beantragt werden.

Gemeinsam mit meiner Betreuerin habe ich das Thema für die vorliegende Arbeit entwickelt und einen positiv begutachteten Datennutzungsantrag beim Forschungsverbund Community Medicine gestellt. Die statistischen Analysen erfolgten am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin anhand eines von mir ausgearbeiteten Analyseplans. Die Interpretation der Studienergebnisse als auch die Einordnung in den aktuellen Stand der Literatur habe ich selbständig vorgenommen. Die Diskussion der Ergebnisse erfolgte in enger Rücksprache mit der betreuenden Person am Institut. Das publizierte Manuskript habe ich eigenständig verfasst, es wurde durch meine Co-Autoren (Stephanie Zylla, Prof. Dr. med. Matthias Nauck, Prof. Dr. med. Henry Völzke, PD Dr. rer. med. Nele Friedrich, Dr. rer. med. Anke Hannemann) anschließend revidiert. Darauf basierend habe ich selbständig diese Arbeit verfasst.

Ludwigsburg, den 17.12.2020 Lejla Kadrić

7.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Diese Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und, dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Ludwigsburg, den 17.12.2020 Lejla Kadrić