

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Geschäftsführender Vorstand:

Prof. Dr. H.-G. Gabius

Anfertigung unter der Leitung von

Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben

**Knochenanabole Wirkung
der zyklischen Calcitriol Therapie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Von

Katrin Susanne Nägele

aus München

München 2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
Der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. R.G. Erben
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. E. Wolf

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Vitamin D und Metaboliten	3
2.1.1 Aufbau und Vorkommen von Vitamin D	3
2.1.2 Metabolismus von Vitamin D	4
2.1.3 Regulation des Vitamin D Metabolismus	6
2.2 Funktion und Wirkung von Vitamin D und seinen Metaboliten	7
2.2.1 Kalziumhomöostase	7
2.2.2 Weitere Funktionen von Calcitriol	10
2.2.3 Indikation von Vitamin D und seinen Metaboliten	10
2.2.4 Nebenwirkungen einer Vitamin D Substitution	10
2.3 Aufbau und Funktion des Knochens	11
2.3.1 Aufbau des Knochens	11
2.3.2 Metabolismus und Funktion des Knochens	12
2.4 Osteoporose	17
2.4.1 Definition	17
2.4.2 Ätiologie und Pathophysiologie	18
2.4.3 Therapiemöglichkeiten der Osteoporose	20
3 Material und Methoden	25
3.1 Versuchstiere	25
3.2 Tierhaltung	25
3.3 Versuchsaufbau und Durchführung	26
3.3.1 Gruppeneinteilung	26
3.3.2 Ovariectomie	26
3.3.3 Versuchsaufbau	27
3.4 Histologische Aufarbeitung des Knochenmaterials	30

3.4.1	Präparation, Fixierung, Entwässerung, Infiltration und Einbettung	30
3.4.2	Herstellung der Knochenschnitte	31
3.4.3	Färbung der Knochenschnitte	31
3.5	Messungen	33
3.5.1	Messung der Knochendichte mittels pQCT.....	33
3.5.2	Histomorphometrische Analysen	33
3.6	Statistik	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Gewichtsentwicklung und Versuchsverlauf.....	38
4.2	Biochemische Parameter.....	38
4.3	Messungen mittels peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT).....	39
4.4	Histomorphometrische Analyse	42
5	Diskussion	61
5.1	Einfluss der Ovariectomie	61
5.1.1	Einfluss der Ovariectomie auf das Körpergewicht	61
5.1.2	Einfluss der Ovariectomie auf den Knochen	61
5.2	Skelettwirkung der zyklischen Calcitrioltherapie	62
6	Zusammenfassung	65
7	Summary	67
8	Literaturverzeichnis.....	67
9	Lebenslauf	84
10	Danksagung	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ergocalciferol / Vitamin D ₂	3
Abbildung 2: Cholecalciferol / Vitamin D ₃	3
Abbildung 3: aktives 1,25-Dihydroxycholecalciferol/Calcitriol	5
Abbildung 4: Gesamt-B(one) M(inal) D(ensity)	40
Abbildung 5: Trabekuläre-B(one) M(inal) D(ensity)	41
Abbildung 6: Trabekuläre Knochenmassee.....	43
Abbildung 7: Trabekuläre Breite.....	44
Abbildung 8: Trabekelzahl.....	44
Abbildung 9: Trabekelabstand.....	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchsplan.....	28
Tabelle 2: Knochendichtenmessung am 4. Lendenwirbel	46
Tabelle 3: Knochendichtenmessung an der proximalen Tibia	47
Tabelle 4: Knochendichtenmessung am Tibia Schaft.....	48
Tabelle 5: Knochendichtenmessung an der distalen Tibia	49
Tabelle 6: Histomorphometrische Messungen am 1. Lendenwirbel	50
Tabelle 7: Histomorphometrische Analyse des 1. Lendenwirbel	51
Tabelle 8: Histomorphometrische Analyse der proximalen Tibiametaphyse	52
Tabelle 9: Biochemische-Analysen	53
Tabelle 10: 2-fach ANOVA der Knochendichtemessungen des 4 Lendenwirbels	54
Tabelle 11: 2-fach ANOVA der Knochendichtemessungen der proximalen Tibia	55
Tabelle 12: 2-fach ANOVA der Knochendichtemessungen des Tibia Schafts	56
Tabelle 13: 2-fach ANOVA der Knochendichtemessungen der distalen Tibia.....	57
Tabelle 14: 2-fach ANOVA der histomorphometrischen Analyse des 1. Lendenwirbels	58
Tabelle 15: 2-fach ANOVA der histomorphometrischen Analyse der proximalen Tibiametaphyse.....	59
Tabelle 16: 2-fach ANOVA der biochemischen Analysen des Serums, Urins und des Körpergewichts	60

1 Einleitung

Da die postmenopausale Osteoporose eine der weltweit häufigsten Knochenerkrankungen darstellt, ist es von besonderem Interesse, durch Prävention und Therapie, dem Verlust der Knochenmasse entgegen zu wirken. Die Folge einer Osteoporose, das erhöhte Frakturrisiko, wird als wichtige Ursachen für Morbidität und Mortalität bei älteren Menschen angesehen.

In den ersten Jahren nach der Menopause kommt es bedingt durch den Östrogenmangel zu einer Steigerung der Knochenumsatzrate, bei der die Knochenresorption im Vergleich zur Knochenformation überwiegt, und dadurch zu einem Verlust an Knochenmasse führt.

Ziel der Osteoporosetherapie ist daher ein Zuwachs an Knochenmasse, der möglichst der physiologischen Knochenstruktur entspricht. Dies kann durch eine Reduktion der Knochenresorption und eine Steigerung der Knochenformation erreicht werden.

Pharmakologisch können zur Reduktion der Knochenresorption so genannte antiresorptive Substanzen eingesetzt werden. Dazu zählen Östrogene, Calcitonin, Bisphosphonate und Vitamin D. Sie wirken über eine Hemmung der Osteoklasten und verringern somit das Ausmaß der Knochenresorption. Zur Förderung der Knochenformation eignen sich Parathormon (PTH) und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃.

Vor ca. 20 Jahren wurde die Idee geboren, dass sich die Knochenmasse eventuell durch eine sequentielle Gabe von Substanzen mit pharmakologisch unterschiedlicher Knochenwirkung – unter Ausnutzung der physiologischen, zeitlich gekoppelten Abläufe des Knochen-Remodelings – erhöhen lässt (FROST, 1984). Diese Form der Therapie wurde ADFR-Therapie [**A** (Activate) **D** (Depress) **F** (Free) **R** (Repeat)] benannt. Im Rahmen dieser Therapie werden zeitlich gestaffelt 2 oder mehrere Substanzen verabreicht, die zunächst zu einer Aktivierung des Knochen-Remodelings und danach zu einer Suppression der Knochenresorption führen. Theoretisch könnten mehrere Zyklen dieser sequentiellen Therapie dann die Knochenmasse erhöhen. Ein experimenteller Beweis für die Tragfähigkeit dieses Konzept ist bisher allerdings nicht erbracht worden.

Es gibt Hinweise darauf, dass eine derartige ADFR-Therapie mit kurzzeitig appliziertem 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ als alleinigem Pharmakon durchführbar ist (ERBEN et al., 1997). Die Gabe von hochdosiertem 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bewirkt eine initiale Aktivierung der osteoklastären Knochenresorption, die im weiteren Verlauf von einer Hemmung der Knochenresorption und einer Stimulation der osteoblastären Knochenformation gefolgt wird (ERBEN et al., 1997).

Ziel der vorliegenden Studie war es nun festzustellen, ob eine zyklische Kurzzeitapplikation von hochdosiertem 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ zu einer Erhöhung der Knochenmasse bei scheinoperierten und osteopenischen ovariektomierten Ratten führen würde.

2 Literaturübersicht

2.1 Vitamin D und Metaboliten

2.1.1 Aufbau und Vorkommen von Vitamin D

Grundsätzlich sind zwei Verbindungen von Vitamin D zu unterscheiden. Das pflanzliche Vitamin D₂, auch Ergocalciferol genannt, und das in tierischen Produkten enthaltene Vitamin D₃, welches als Cholecalciferol bezeichnet wird. Beide Vitamine sind Steroide und haben somit die gleiche Grundstruktur, das Ringsystem des Cholesterols. Sie unterliegen dem gleichen Aktivierungsprozess im Organismus, wodurch die aktiven Metaboliten 1,25-Dihydroxycholecalciferol bzw. Calcitriol und 1,25-Dihydroxyergocalciferol bzw. Ercalcitriol entstehen. Sie unterscheiden sich nur durch eine Methylgruppe am Carbon 24 und einer Doppelbindung zwischen Carbon 22 und 23. Vitamin D kann über die Nahrung aufgenommen werden, wobei das Vitamin D₃ die Besonderheit hat, dass es zusätzlich endogen über UVB-Einstrahlung auf die Epidermis aus dem Provitamin 7-Dehydrocholesterol gebildet werden kann (JONES et al., 1998).

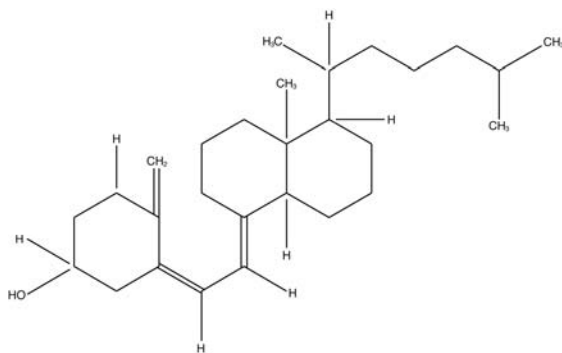


Abbildung 1: Ergocalciferol / Vitamin D₂

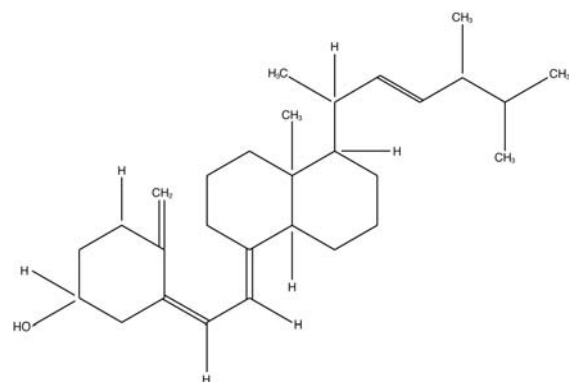


Abbildung 2: Cholecalciferol / Vitamin D₃

2.1.2 Metabolismus von Vitamin D

Die metabolische Aktivierung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ findet in zwei Schritten statt und wird zum einen durch die entstehenden Metaboliten und zum anderen durch den Kalziumplasmaspiegel und PTH kontrolliert (JONES et al., 1998). Durch die verschiedenen Hydroxylierungen entsteht dann das aktive Hormon Calcitriol.

Das über die Nahrung aufgenommene Vitamin D₃ gelangt durch passive Diffusion im proximalen Dünndarmabschnitt, in Chylomikronen eingeschlossen, in die Blutbahn und wird dort an spezifische Transportproteine gebunden. So gebunden wird es zur Leber transportiert, wo der erste Schritt der Aktivierung stattfindet. Vitamin D ist zwar in der Lage, sich im Plasma auch an Albumin und Lipoproteine zu binden, eine größere Bedeutung haben aber die spezifischen Vitamin D-Bindungsproteine. Diese Transportproteine werden in der Leber synthetisiert (HADDAD, 1987 und 1992). Sie besitzen eine hohe Bindungsaffinität und liegen im Überschuss im Plasma vor. Aufgrund dessen können sie fast das gesamte freie Vitamin D und seine Metaboliten binden (HADDAD, 1987). Gleichzeitig wird angenommen, dass sie als Kurzzeitspeicher für Vitamin D dienen. Da Vitamin D nur für kurze Zeit im Blutplasma zirkuliert, kann es, gebunden an die Transportproteine, zum adipösen Gewebe des Organismus transportiert werden, um dort zur Speicherung aufgenommen zu werden (BLUNT et al., 1968).

Das zur Leber transportierte Cholecalciferol und Ergocalciferol wird über das in der Mitochondrienmembran der Hepatozyten lokalisierte Enzym Vitamin D₃-25-Hydroxylase (CYP27) an Position C-25 zu einer hormonell inaktiven Vorläuferform hydroxyliert. Die Hepatozyten der Leber verfügen noch über eine weitere Cytochrom p450-Hydroxylase, die Vitamin D metabolisieren kann. Diese ist jedoch nicht mitochondrial lokalisiert, sondern microsomal. Der Unterschied dieser verschieden lokalisierten Enzyme liegt in ihrer Affinität zu den verschiedenen Vitamin D-Formen. Das mitochondrial lokalisierte Enzym kann Cholecalciferol wie auch Ergocalciferol als Substrat verwenden. Jedoch liegt die Hydroxylierungsrate des Cholecalciferols etwa doppelt so hoch wie die des Ergocalciferols. Das microsomal lokalisierte Enzym kann ausschließlich Cholecalciferol als Substrat verwenden, also kein Ergocalciferol, hat jedoch die Eigenschaft, dass es zur Synthese der Metaboliten keine Ferridoxin-Reduktase benötigt, sondern ausschließlich auf der Ebene der NADH-Cytochrom-

p450-Reduktase arbeitet. Die bei der mitochondrialen wie auch der microsomalen Hydroxylierung entstehenden Metaboliten sind 25-Hydroxycholecalciferol bzw. 25-Hydroxyergocalciferol (ARMBRECHT et al., 1992). Diese Metaboliten besitzen eine hohe Affinität zum Vitamin D-bindenden Protein und werden über die Blutbahn so gebunden zur Niere transportiert (COOKE and HADDAD, 1997). Der zentrale Vitamin D-Regulationsmechanismus, der eine Überschussproduktion von aktivem Vitamin D verhindert, ist in der Niere lokalisiert. In den Mitochondrien der proximalen Tubuluszellen der Niere befindet sich die Vitamin D-1 α -Hydroxylase (CYP1 α). Die Synthese dieser 1 α -Hydroxylase ist abhängig von dem Serumspiegel des Parathormons (PTH), dem Serumspiegel des Phosphats und von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ selbst (GRAY et al., 1978; HENRY, 1997). Die Vitamin D-1 α -Hydroxylase metabolisiert 25-(OH)D₃ zu 1,25(OH)₂D₃, d.h. dem aktiven Vitamin D-Hormon. Dieses Cytochrom p450-Enzym ist nicht nur in der Niere lokalisiert, sondern ebenfalls, allerdings in einer geringeren Konzentration, noch in anderen Zellen, wie Makrophagen, Osteoblasten, Plazentazellen und Keratinozyten (BIKLE et al., 1986; ADAMS and GACAD, 1985). Wenn 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ im Überschuss vorliegt, entsteht in der Niere aus 25(OH)D₃ vermehrt 24,25(OH)₂D₃ durch eine Cytochrom p450-abhängige 24-Hydroxylase (JONES et al., 1987). Diese Metabolisierung von 25(OH)D₃ zu 24,25(OH)₂D₃ gilt als wichtigste Deaktivierung von 25(OH)D₃, da 24,25(OH)₂D₃ gegenüber 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ eine 10 000fach geringere biologische Aktivität besitzt. Des weiteren können diese Metaboliten zu 1,24,25-Trihydroxycholecalciferol metabolisiert werden. Das Endprodukt des Abbaus von Vitamin D ist die Calcitronsäure, die dann über die Galle ausgeschieden wird (REDDY and TSERNG, 1989).

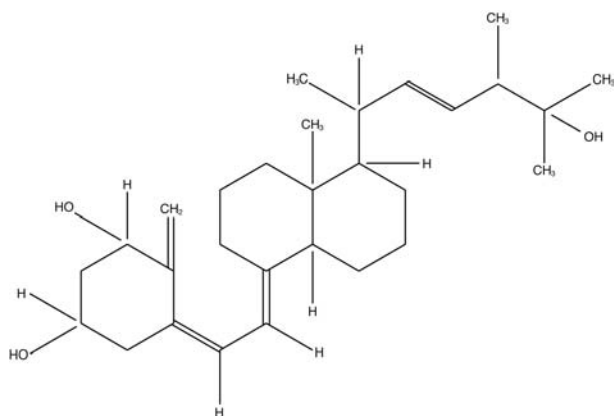


Abbildung 3: aktives 1,25-Dihydroxycholecalciferol/Calcitriol

2.1.3 Regulation des Vitamin D Metabolismus

Eine der wichtigsten Wirkungen von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ ist die Regulation des extrazellulären Kalziumspiegels. Aufgrund dessen unterliegt die Synthese von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ einer strengen Regulation. Einer der wichtigsten Kontrollfaktoren der Synthese von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ ist PTH. Das Absinken des Kalziumspiegels im Blut bewirkt eine Sekretion von PTH aus der Nebenschilddrüse (BROWN et al., 1993). PTH bewirkt dann eine vermehrte Synthese der renalen 1 α -Hydroxylase und die Hemmung der Synthese der 24-Hydroxylase, wodurch es zu einer vermehrten Bildung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ kommt. Die kalzämischen Effekte von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ führen dann über eine Erhöhung des Plasmakalziumspiegels wiederum zu einer negativen Rückkopplung, was eine verminderte Sekretion von PTH zur Folge hat (NAVEH-MANY et al., 1989).

Es wird vermutet, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ selbst in der Lage ist, die Synthese der 24-Hydroxylase zu stimulieren (ZIEROLD et al., 1994). Weiterhin wird angenommen, dass der Plasmaphosphatspiegel einen Einfluss auf die Synthese von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ besitzt. Allerdings ist der Mechanismus dieser Effekte noch nicht geklärt.

2.2 Funktion und Wirkung von Vitamin D und seinen Metaboliten

2.2.1 Kalziumhomöostase

Das Hormon der Nebenschilddrüse, PTH, wie auch 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulieren die intestinale Absorption, die renale Exkretion und die Mobilisierung von Kalzium aus dem Knochen. Beide Hormone steuern über verschiedene Mechanismen die Kalziumhomöostase.

2.2.1.1 Einfluss von Vitamin D

Die physiologische Hauptfunktion von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ ist die Bereitstellung von Kalzium. Kalzium ist für die Aufrechterhaltung vieler Funktionen im Organismus essentiell. So spielt es eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung im Nervensystem, bei der Muskelkontraktion, bei der exokrinen Sekretion, bei der Zelladhäsion, bei der Reproduktion, bei der embryonalen wie auch postembryonalen Skelettentwicklung und dem Knochenstoffwechsel (RASMUSSEN and DeLUCA, 1963). Aufgrund dieser vielfältigen Aufgabengebiete ist es verständlich, dass der Organismus auf einen konstanten Kalzium-Plasmaspiegel angewiesen ist. Um diesen Kalzium-Plasmaspiegel konstant zu halten, bedarf es eines komplexen Kontrollsystems, der Kalziumhomöostase, bei der Vitamin D und seine Metaboliten wie auch das Parathormon eine zentrale Rolle spielen.

Die klassischen Organe, über die 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ die Möglichkeit hat, Kalzium bereitzustellen, sind der Dünndarm als Ort der enteralen Kalzium- und Phosphorabsorption, die Niere als Ort der renalen Kalzium- und Phosphorexkretion bzw.- reabsorption und das Knochengewebe, welches durch den ständigen Knochen-Abbau und Aufbau einen gut mobilisierbaren Kalziumspeicher darstellt. Allerdings ist auch das Knochengewebe auf Kalzium und Phosphor zur Erhaltung stabiler, mechanisch belastbarer Knochensubstanz angewiesen.

Am Darm gibt es zwei voneinander unabhängige Kalziumtransportmechanismen. Zum einen besteht ein sättigbarer transzellulärer Mechanismus, der bei Konzentrationen bis zu 10 mM im proximalen Teil des Dünndarms von Bedeutung ist. Zum anderen ein interzellulärer Mechanismus, der bei Konzentrationen von 10

mM bis 50 mM im gesamten Dünndarm stattfindet (JOHNSON and KUMAR, 1994; WASSERMAN and FULLMER, 1995). Im ersten Fall werden Kalziumionen lumenseitig resorbiert und transzellulär transportiert, um dann an der basolateralen Zellmembran gegen den Konzentrationsgradienten in die extrazelluläre Matrix abgegeben werden zu können. Der zweite Mechanismus besteht nur bei einer ausreichenden Vitamin D-Versorgung. Hier bindet sich Kalzium intrazellulär an das Kalziumbindungsprotein Calbindin. Durch die Anwesenheit von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ kann die Kalziumaufnahme erhöht werden. Da 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ ein Steroidhormon ist, besitzt es die Möglichkeit, durch die Zellmembran zu diffundieren und intrazellulär an einen Rezeptor (Vitamin D-Rezeptor, VDR) zu binden. Dieser Calcitriol-Rezeptor beeinflusst die Gentranskription und erhöht u.a. die Syntheserate des Kalzium-bindenden Proteins Calbindin-D9K und von Osteopontin (SHIMURA et al., 1983; HAUSSLER et al., 1995). Liegt ein Kalziummangel im Organismus vor, kommt es zu einer PTH-Sekretion, die dann eine vermehrte Synthese von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auslöst. Dies bewirkt dann über den zweiten Mechanismus wiederum eine vermehrte Kalziumabsorption.

2.2.1.2 Vitamin D und PTH

Die Parathyreoidea ist das Kontrollorgan für den Kalziumplasmaspiegel. Bei einer Hypocalcämie sezerniert die Parathyreoidea innerhalb von Sekunden ein Peptidhormon, das PTH (SILVER et al., 1996). PTH bewirkt, wie bereits oben erwähnt, eine Aktivierung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, was zu einer vermehrten Kalziumabsorption führt. PTH hat aber noch die Möglichkeit, sich an Rezeptoren, die in den Nephronen der Niere und in Osteoblasten lokalisiert sind, zu binden und dadurch die Kalziumhomöostase zu beeinflussen (BROWN et al., 1993).

PTH aktiviert in den proximalen Tubuluszellen der Niere über einen cAMP-vermittelten Mechanismus eine vermehrte 1 α -Hydroxylase-Transkription, was zu einer vermehrten Bildung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ führt (GARABEDIAN et al., 1974).

Über denselben Mechanismus reduziert PTH die Synthese der 24-Hydroxylase, dies führt dazu, dass weniger 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ abgebaut wird (SHINKI et al., 1992) und der Plasmaspiegel von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ steigt (THAKKER et al., 1986).

Die Ausschüttung von PTH aus der Nebenschilddrüse wird aber nicht nur über den Kalziumplasmaspiegel reguliert, sondern auch über 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (STUMPF et al., 1981). Bei einem hohen 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Plasmaspiegel wirkt 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ suppressiv auf die Sekretion von PTH aus der Parathyreoidea.

Ob 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ noch weitere Effekte auf die Kalziumreabsorption in der Niere hat, ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ den Phosphattransport im proximalen Tubulus zugunsten der Kalziumretention hemmt (BONJOUR et al., 1977). Weiterhin lässt die Tatsache, dass VDR im gesamten Tubulusbereich exprimiert wird, vermuten, dass noch weitere Vitamin D-Effekte an der Niere existieren (LIU et al., 1996).

2.2.1.3 Einfluss von Vitamin D auf den Knochen

Über den Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und PTH kann Kalzium aus dem Knochen mobilisiert werden. Osteoklasten verfügen über keinen Rezeptor für PTH und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. Allerdings können beide Hormone mit Osteoblasten interagieren (MERKE et al., 1986). Aufgrund dessen erfolgt eine Aktivierung der Osteoblasten, die dann Osteoklasten-Vorläuferzellen stimulieren, aus denen sich vermehrt Osteoklasten bilden, die dann Knochen resorbieren können (TANAKA et al., 1982; BOIVIN et al., 1987).

Weiterhin wird durch die Bindung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ an den VDR der Osteoblasten die Synthese der Matrixproteine Osteocalcin, Osteopontin, Bone Sialoprotein und Kollagen Typ 1 reguliert (BOYAN et al., 1992; LIAN and STEIN, 1993). Aufgrund dessen nimmt man an, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ einen unmittelbaren knochenanabolen Effekt besitzt. Weiterhin besitzt 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ einen knochenkatabolen Effekt. Durch die Beteiligung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ an der Osteoklastenreifung werden vermehrt Osteoklasten gebildet, welche dann vermehrt Knochen resorbieren können. Man nimmt an, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ über diesen Weg einen direkten Einfluss auf das Knochen-Remodeling hat (STERN, 1997).

2.2.2 Weitere Funktionen von Calcitriol

Neben den Hauptfunktionen, in denen 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ eine Rolle spielt, besitzt 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ noch weitere Funktionen im Organismus. Dazu gehört der Einfluss auf die Insulin-Sekretion über die β -Zellen des Pankreas (NORMANN et al., 1980). Weiterhin zeigt 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ einen Einfluss auf die Proliferation und die Differenzierung von Zellen des Immunsystems, speziell auf die Lymphozyten und die T-Helfer-Zellen. In der Haut ist 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ an der Differenzierung der Keratinozyten beteiligt und kann die Zellproliferation hemmen (BIKLE et al., 1993).

2.2.3 Indikation von Vitamin D und seinen Metaboliten

Die Indikationen für den therapeutischen Einsatz von Vitamin D-Metaboliten sind in erster Linie die unterschiedlichen Formen des Hypoparathyreodismus, renale Osteodystrophie, Rachitis, Osteomalazie und Osteoporose. Die positive Beeinflussung dieser Krankheitsbilder durch die einzelnen Vitamin D-Metaboliten wird durch zahlreiche klinische wie auch im Tiermodell durchgeführte Studien belegt (GALLAGHER et al., 1994; LINDGREN and LINDHOLM, 1979; ERBEN et al., 1998).

2.2.4 Nebenwirkungen einer Vitamin D Substitution

Als unerwünschte Wirkung treten in erster Linie Hyperkalzämie und Hyperphosphatämie mit all ihren potentiellen Folgewirkungen, wie z.B. Nephrocalcinose, auf. Deswegen ist therapiebegleitend eine regelmäßige Überprüfung von Laborparametern, insbesondere des Serumkalziums, angezeigt, um auf einen Anstieg sofort mit einer Dosisreduktion reagieren zu können (FOURNIER et al., 1995).

2.3 Aufbau und Funktion des Knochens

2.3.1 Aufbau des Knochens

Im Organismus gibt es zwei Knochenarten: ca. 80% des Gesamtknochens im Organismus ist kortikal und ca. 20% trabekulär. Beide Formen werden über ihren Aufbau voneinander unterschieden.

Grundsätzlich finden aber an beiden Formen die gleichen Umbauprozesse statt, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Prinzipiell sind die gleichen Zelltypen für die Umbauprozesse verantwortlich.

Alle Knochenformen haben biomechanische wie auch metabolische Funktionen. So dienen sie als Stützgerüst für Muskeln, als Schutz für die inneren Organe und als Schutzhülle für das Knochenmark, in der die Hämatopoese stattfindet (PARFITT, 1990). Die mineralisierte Grundsubstanz des Knochens dient als Speicherort für Mineralien, insbesondere für Kalzium. In dieser Grundsubstanz befinden sich knochenspezifische Zellen, bei denen es sich um Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten handelt.

Osteoblasten

Der Osteoblast entsteht aus undifferenzierten Mesenchymzellen (GRIGORIADIS et al., 1988). Seine Funktionen sind vielfältig, so ist er zuständig für die Bildung der noch unmineralisierten Knochensubstanz, dem Osteoid. Gleichzeitig ist er für die Mineralisierung des Osteoids verantwortlich (HARRIS, 1989). Er ist der Regulationsmechanismus des Knochen-Remodelings, da er über eine Vielzahl von Rezeptoren verfügt, an die sich PTH wie auch 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ binden können (RODAN and MARTIN 1981). Er synthetisiert Proteine wie z.B. Osteopontin und Osteocalcin, ist beteiligt an der Sekretion von Kollagen, enthält alkalische Phosphatase und ist somit für den Aufbau der Knochensubstanz bedeutend. All diese Substanzen werden vom Osteoblasten während des Prozesses der Knochenformation gebildet und können aufgrund dessen als Indices für den zyklischen „Bone-Remodeling-Prozess“ angesehen werden.

Osteozyten

Der Osteoblast hat ungefähr eine Lebensdauer von 100 Tagen (ERIKSEN et al., 1990). Einige der Osteoblasten werden mit in die Matrix eingebaut und zu Osteozyten umgewandelt, andere entwickeln sich an der Oberfläche der neu entstandenen Matrix zu Lining-Zellen. Osteozyten können über gap junctions miteinander kommunizieren und sind am Erhalt des Knochens maßgebend beteiligt (REVELL, 1986; DOTY, 1981).

Osteoklasten

Der Osteoklast entsteht aus pluripotenten Zellen des hämatopoetischen Systems (SUDA et al., 1992a). Osteoblasten aktivieren über Interleukine und andere Mediatoren die Formation und Differenzierung von Promyelozyten zu Monozyten, welche die Vorläuferzellen der Osteoklasten darstellen (FELIX et al., 1990). Ihre Lebensdauer ist auf ca. 16 Tage begrenzt. Im Gegensatz zu den Osteoblasten, die sich umwandeln, gehen die Osteoklasten durch Apoptose zugrunde (PARFITT, 1994).

Der Osteoklast übernimmt die Funktion der Resorption und ist somit am Prozess des Remodelings und der Kalziumhomöostase beteiligt. Über die Sekretion von lysosomalen Enzymen und Säuren besitzt der Osteoklast die Fähigkeit, Knochenmatrix abzubauen. Diese Fähigkeit der Osteoklasten ist essentiell für den Remodeling-Prozess (PARFITT, 1990).

2.3.2 Metabolismus und Funktion des Knochens

2.3.2.1 Modeling

Das Skelettsystem unterliegt zeitlebens einem kontinuierlichen Auf- und Umbauprozess, welcher zeitlich und räumlich unabhängig voneinander statt findet und als „Modeling“ bezeichnet wird. Dies ist die Reaktion des Skeletts auf veränderte biomechanische Belastung und kann zu einem Nettogewinn an Knochenmasse führen (FROST, 1990). Prinzipiell kann zwischen drei Arten von Modeling unterschieden werden:

Micromodeling

Die Funktion des Micromodelings liegt in der Bereitstellung von Zellen und Kollagen in der Phase der Differenzierung und Formation. Es findet immer dann statt, wenn neues Gewebe gebildet werden muss und legt somit fest, welche Art von Gewebe entsteht.

Minimodeling

Bei diesem Prozess, wird die räumliche Struktur von trabekulärem Knochen, über Knochenformation oder Knochenresorption, an die neuen biomechanischen Anforderungen angepasst. Hierbei sind Osteoblasten, Osteoklasten und Percursor-Zellen beteiligt.

Makromodeling

Bei der juvenilen Skelettentwicklung findet ein physiologisches Wachstum statt, das als Makromodeling bezeichnet wird. Dies bedeutet, dass sich die Zellzahl erhöht und sich die intrazelluläre Substanz vergrößert (FROST, 1991). Dieser Vorgang wird von dem Genom der Zelle kontrolliert oder lokal über Wachstumsfaktoren wie z.B. Insulin-like growth factor (IGF) und Hormone beeinflusst. Nach der Skelettreife findet unter normalen Umständen kein physiologisches Wachstum mehr statt. Eine Ausnahme hierbei ist die Frakturheilung (FROST, 1991).

2.3.2.2 Remodeling

Knochen-Remodeling ist ein zeitlich begrenzter, immer wiederkehrender Prozess am Knochen, welcher der Erneuerung und Restrukturierung von trabekulärem und kortikalem Knochen dient. Es dient der Bereitstellung von Mineralien, zur Reparatur von Microläsionen und zur Anpassung des Knochens an neue Anforderungen. Die Knochenoberfläche, in der das Remodeling stattfindet, besteht aus vier Anteilen:

1. Periost,
2. Intrakortikalis,
3. Kortikoendostale Oberfläche,
4. trabekuläre endostale Oberfläche.

Remodeling verläuft in einem immer gleich ablaufenden Zyklus von Aktivierung - Resorption - Formation, der auch ARF-Sequenz genannt wird.

Das Remodeling wird von den Basic multicellular units (BMU) ausgeführt. Im kortikalen Knochen sind das die Osteone. Während des Remodelings entstehen durch die Osteoklastenaktivität sogenannte „cutting cones“ bzw. Tunnel in der Kortikalis. Im trabekulären Knochen entstehen über die BMUs, die hier die Form eines Halbmondes aufweisen, „Howshipsche Lakunen“ (PARFITT, 1983).

Aktivierung

Da ca. 80 % der Knochenoberfläche sich im Stadium der Ruhe befinden, wird ein Signal benötigt, welches das Remodeling aktiviert. Eine Theorie besagt, dass im Stadium der Ruhe die Knochenoberfläche von einer dünnen Schicht Lining-Zellen bedeckt wird, die das Knochenmark vom Knochen trennen (MILLER and JEE, 1987). Lining-Zellen stehen im Kontakt zu den Osteozyten. Da beide, Osteozyten und Lining-Zellen, aus den Osteoblasten hervorgehen, nimmt man an, dass sie ebenfalls über die gleichen Rezeptoren wie die Osteoblasten verfügen. Allerdings haben sie die Fähigkeit der Kollagensynthese verloren, besitzen aber die Möglichkeit, wie der Osteoblast an sich, über die Sezernierung von Interleukinen Osteoklasten-Vorläuferzellen zu stimulieren. Dadurch haben die Lining-Zellen indirekt einen Einfluss auf die Aktivierung des Remodeling Prozesses (PARFITT, 1984; BARON et al. 1983a). Eine andere Hypothese nimmt an, dass nach mechanischer Reizung Osteozyten Faktoren wie zum Beispiel IGF-I sezernieren, die eine Aktivierung des Remodeling-Prozesses bewirken (LEAN et al., 1996). Ebenso scheint das durch Ermüdungsschäden bedingte Freiliegen der mineralisierten Matrix nach Zerstörung der oberflächlichen Osteoidlage eine Chemotaxis der Osteoklasten-Vorläuferzellen auszulösen (MALONE et al., 1982).

Resorption

Die Adhäsion der Osteoklasten und somit das Stadium der Resorption kann erst eintreten, nachdem die Lining-Zellen proteolytische Enzyme, wie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), Kollagenasen und Gelatinasen, welche die Knochenoberfläche angreifen, (MEIKLE et al. 1992), sezerniert haben. Freiwerdende Glykoproteine und Mineralien wirken chemotaktisch auf die Osteoklasten-Vorläuferzellen (MALONE et al., 1982). Durch die Bindung verschiedener Mediatoren

oder Hormone wie z.B. Cytokine, Wachstumsfaktoren, PTH und Calcitriol an die Lining-Zellen kommt es zu einem Anstieg von Osteoklasten-Vorläuferzellen. Indem neue Kapillaren einsprossen, gelangen die Osteoklasten-Vorläuferzellen aus dem hämatopoetischen System zu der Region am Knochen, an dem das Remodeling stattfinden soll. Gleichzeitig bewirken PTH, Calcitriol, PGE₂ und Cytokine die Umwandlung der Osteoklasten-Vorläuferzellen in den aktiven vielkernigen Osteoklasten.

Sobald die Osteoklasten sich mit der Knochenoberfläche verbunden haben, beginnt die Resorption. Die Anheftung der Osteoklasten erfolgt durch Integrine (Membranglykoproteine), die bestimmte Proteine der extrazellulären Matrix erkennen und binden (BERRY et al., 1994). Im Kontaktbereich der Knochenoberfläche bildet sich ein organellenfreies Areal, in der Osteoklasten die sogenannte „clear zone“ bilden. Sie ist durch einen besonders hohen Gehalt an F-Aktin-Filamenten gekennzeichnet. Durch das Zusammenwirken von Integrinen und Aktin-Filamenten werden Podosomen und Adhäsionen zwischen den Osteoklasten und der zu resorbierenden Knochenoberfläche gebildet (SUDA et al., 1996). Die Osteoklasten entlassen hydrolytische Enzyme und H⁺-Ionen und formen dabei charakteristische Vertiefungen in der Knochenoberfläche. Im trabekulären Knochen werden diese Vertiefungen als Howshipsche Lakunen und im kortikalen Knochen als cutting cone bezeichnet (PARFITT, 1982). Aus der aufgelösten Knochenmatrix werden Transforming growth factor β und andere Faktoren freigesetzt, die inaktivierend auf Osteoklasten und aktivierend auf Osteoblasten wirken (PFEILSCHIFTER et al., 1990) und so die Resorption des Knochens begrenzen. Zusätzlich hemmt eine hohe Kalziumkonzentration die Osteoklastenaktivität (ZAIDI, 1990).

Zwischen der Resorption und der Formation liegt ein zeitlich begrenztes Intervall, das als Verbindungsglied anzusehen ist und auch als Reversal-Stadium bezeichnet wird. Kennzeichnend für diesen Prozess sind die Howshipschen Lakunen ohne die Anwesenheit von Osteoklasten (PARFITT, 1983) und das Einwandern von Präosteoblasten. Der Stimulus, welcher das Einwandern von Osteoblasten an die Stelle des Umbaus hervorruft, entsteht in der Phase der Resorption, indem durch den Abbau der Matrix eine signalgebende Substanz (HOWARD et al., 1980) entlassen wird. Mononukleäre Zellen und Osteoblasten glätten die Oberfläche der in der Resorption entstandenen Lakunen, indem sie die Lakunen mit einer kollagen-

und mineralstoffarmen Substanz auffüllen (BARON et al., 1984). Dadurch entsteht eine dünne Schicht, die auch als Zementschicht bezeichnet wird und die die Knochenoberfläche für das Stadium der Formation vorbereitet.

Formation

Das Stadium der Formation verläuft in zwei Prozessen, die räumlich wie auch zeitlich voneinander getrennt sind. Nach Abschluss der Formation gelangt der Knochen wieder in das Stadium der Ruhe.

1. Matrix Formation:

Dieser Prozess dient der Volumenbestimmung. Die hierfür verantwortlichen Zellen sind die Osteoblasten, die an das Osteoid angelagert sind. Hier findet die Synthese von Kollagen, Proteoglykanen und Glykoproteinen statt. Diese Substanzen dienen zur Auffüllung der während des Remodeling-Prozess entstandenen Lakunen. Im weiteren Verlauf reduziert sich die Osteoidproduktion, weniger Osteoblasten wandern an den Ort des Geschehens und die dort vorhandenen Osteoblasten wandeln sich in Lining-Zellen und Osteozyten um.

2. Mineralisation:

Die Phase der Mineralisation dient dem Aufbau der Knochendichte und findet zwischen Osteoid und Knochen statt. Durch Wasserentzug und Ersatz des Wassers durch Mineralien kann sich Hydroxyapatit bilden, welches kristallisiert und dadurch die Knochenstruktur verdichtet.

2.4 Osteoporose

2.4.1 Definition

Unter dem Begriff Osteoporose wird eine pathogenetisch uneinheitliche Gruppe von Skelettaffektionen zusammengefasst, die mit einer erhöhten Frakturanfälligkeit einhergehen (NORDIN, 1987).

Nach WHO-Definition spricht man dann von einer Osteoporose, wenn die Knochenmineraldichte eine größere Standardabweichung als $-2,5$ aufweist, bezogen auf einen vergleichbaren jungen gesunden Organismus mit gleichem Geschlecht. Eine Osteopenie liegt vor, wenn die Standardabweichung zwischen -1 und $-1,5$ liegt.

Das Leitbild der Osteoporose ist eine pathologisch reduzierte Knochensubstanz. Die Ursache ist entweder eine negative Knochenbilanz, die sich aus Knochenformation und Knochenresorption ergibt, oder eine wachstumsbedingte Unterentwicklung der physiologischen Knochensubstanz. Als Leitsymptom gelten Frakturen. Unterschieden wird zwischen akuten und chronischen Frakturen. Die akuten Frakturen entstehen vor allem am Wirbelkörper, am distalen Radius, am proximalen Femur und an den Rippen. Sie können akute Knochenschmerzen hervorrufen. Dagegen führen die chronischen Frakturen zu Knochenverformungen und Weichteilschmerzen (HOFFMANN, 1987).

Durch die Abnahme der Spongiosadichte und den Verlust der Knochenbälkchen kann der Knochen dem äußeren Druck nicht mehr auf seine Gesamfläche verteilen und es kommt zu Knick- oder Sinterungsfrakturen in den Wirbelkörpern, die für das typische Kleinerwerden der osteoporotischen Patienten verantwortlich sind (KUHLENCORDT, 1987). Es wäre daher naheliegend, in das klinische Bild der Osteoporose neben der Frakturanfälligkeit und dem Verlust der Knochenmasse auch die Strukturveränderungen des verbleibenden trabekulären Knochens mit einzubeziehen. Der Begriff Osteoporose sollte daher der klinischen Erkrankung vorbehalten werden und eine Verminderung der Knochenmasse ohne klinische Symptome sollte als „Osteopenie“ bezeichnet werden (HOFFMANN, 1987; JOHNSTON et al., 1985; MALLUCHE et al., 1986).

2.4.2 Ätiologie und Pathophysiologie

Im Allgemeinen werden unter dem Oberbegriff Osteoporose Skeletterkrankungen unterschiedlicher Ätiologien zusammengefasst. Um therapeutische Maßnahmen anwenden zu können, muss jedoch erst die Ursache der vorliegenden Osteoporose erkannt werden. Prinzipiell unterscheidet man zwei Formen der Osteoporose. Dazu gehört die primäre Form, zu der die idiopathische juvenile, die postmenopausale Osteoporose (Typ I) und die senile Osteoporose (Typ II) zählen, sowie die sekundäre Osteoporose (Typ III), bei der eine Primärerkrankung vorliegt (RIGGS and MELTON, 1983; RINGE, 1985).

2.4.2.1 Idiopathische juvenile Osteoporose

Sie tritt bei präpubertären Kindern auf und ihre Ätiopathogenese ist noch nicht geklärt. Das klinische Bild zeigt ein vermindertes Wachstum und verstärkte Frakturanfälligkeit der langen Röhrenknochen. Ein typisches Bild für den Krankheitsverlauf ist, dass sich das Knochenwachstum nach einer Dauer von zwei bis drei Jahren wieder normalisiert (CHRISTENSON, 1997).

2.4.2.2 Postmenopausale Osteoporose (Typ I)

Verantwortlich für die Entstehung einer Typ-I-Osteoporose ist das Erlöschen der physiologischen Ovarialfunktion bei Eintritt der Menopause. Die ersten klinischen Anzeichen treten dann nach etwa nach 10 bis 15 Jahren auf. Vorwiegend betroffen sind aufgrund des hohen Anteils an trabekulärem Knochen vor allem die Wirbelkörper, wie auch der distale Teil des Radius und der proximale Teil des Femurs (RIGGS et al., 1986).

Durch das Absinken des Östrogenspiegels findet ein vermehrter Knochenabbau statt, was zu einem erhöhten Serumkalziumspiegel führt (LINDSAY, 1988). Dies führt zu einer verminderten PTH-Sekretion, einer reduzierten Aufnahme von Vitamin D aus dem Darmlumen und einer geringeren Verstoffwechslung von Vitamin D zu seinem aktiven Metaboliten 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. Der dadurch bedingte verminderte Serumspiegel von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bewirkt eine verminderte Resorption von Kalzium aus dem Darmlumen. Zusätzlich wird durch die reduzierte PTH-Sekretion die Kalziumreabsorption aus den Nierentubuli vermindert. Um das

entstehende Kalziumdefizit auszugleichen, baut der Organismus wiederum vermehrt Knochensubstanz ab und es kommt zu einem Ungleichgewicht im Knochenstoffwechsel d.h. die Phase der Resorption überwiegt die Phase der Formation (YASUMURA et al. 1987). Die Knochenmasse nimmt ab und dadurch verschlechtert sich die Mikroarchitektur des Knochens (HOFFMANN, 1987). Der von außen einwirkenden Druck wird nun infolge verminderter räumlicher Konnektivität der Spongiosabälkchen nicht mehr über den gesamten Knochen verteilt, es kommt zu Mikroläsionen, die über Summation bis zu einer Fraktur führen können (RINGE, 1985).

2.4.2.3 Senile Osteoporose (Typ II)

Von dieser Form sind Frauen und Männer von über 70 Jahre fast im gleichen Verhältnis betroffen. Das Krankheitsbild unterscheidet sich von der Osteoporose des Typ I dadurch, dass trabekulärer und kortikaler Knochen in annähernd gleichem Maße betroffen sind. Dies hat zur Folge, dass auch die Röhrenknochen davon in Mitleidenschaft gezogen werden und es kommt dadurch häufig zu Oberschenkelhalsfrakturen.

Die Ursache des Typ II ist durch die im Senium zunehmende Einschränkung der Zellfunktionen und der daraus resultierenden verminderten osteoblastären Knochenformation altersbedingt. Weiterhin liegt eine erniedrigte renale 1α -Hydroxylasen-Aktivität vor, was eine verminderte Synthese des 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 und einen erniedrigten Kalziumplasmaspiegel bewirkt. Daraus entwickelt sich dann ein sekundärer Hyperparathyreodismus mit der Folge der Osteoporose (GALLAGHER, 1990).

2.4.2.4 Sekundäre Osteoporose (Typ III):

Die auslösenden Faktoren einer Typ III Osteoporose liegen einer Primärerkrankung zugrunde. Sie können endokrin-metabolischen Ursprungs sein wie z.B. bei Morbus Cushing, Hyperthyreose, Hypogonadismus und Diabetes mellitus. Weitere Ursachen sind Malabsorptionsstörungen, Hepathopathien, tumoröse Veränderungen oder auch iatrogener Natur sein, wie z.B. Langzeittherapie mit Glucokortikoiden, Heparin und Überdosierung von Schilddrüsenhormonen. Bei alten Menschen kommt noch der

Faktor der Immobilisation und weitere geriatrische Erkrankungen dazu (RINGE, 1985).

2.4.3 Therapiemöglichkeiten der Osteoporose

Ziel jeder Osteoporose-Therapie ist es ein Zuwachs der Knochenmasse und die Bildung einer möglichst physiologischen Knochenstruktur, zu erreichen. Dies führt zu einer verbesserten Statik und einer verminderten Frakturrate (ZIEGLER, 1991). Für die Behandlung der Osteoporose stehen eine Vielzahl von knochenwirksamen Pharmaka zu Verfügung, die zur Prävention bzw. zur Therapie eingesetzt werden können.

Alle medikamentösen therapeutischen Maßnahmen zur Behandlung von Knochenstoffwechselerkrankungen zielen auf eine Stimulation bzw. Dämpfung der verschiedenen Phasen des Knochen-Remodelings ab.

Eine der bekanntesten Therapieformen ist die Behandlung mit Sexualhormonen, speziell die Behandlung mit Östrogenen, auch in Kombination mit Gestagenen. Hormone gehören, wie auch weitere Osteoporose-Pharmaka, zu den antiresorptiven Substanzen. Ihre Wirkung liegt darin, dass sie im Stadium der Aktivierung die knochenresorbierenden Osteoklasten hemmen. Ob Sexualhormone einen Einfluss auf Osteoblasten und somit auf die Knochenformation haben, ist bislang noch nicht vollständig geklärt (MELSON et al., 1989). Des Weiteren kann durch eine Östrogentherapie die intestinale Kalziumabsorption stimuliert (HEANEY, 1990) und die Frakturanfälligkeit deutlich reduziert werden (FELSON et al., 1993).

Obwohl durch die Hormontherapie ein deutlicher Anstieg der Knochenmineraldichte und somit eine Reduzierung der Frakturanfälligkeit erzielt werden kann, ist der Einsatz von Hormonen aufgrund der starken Nebenwirkungen zu überdenken. Dazu gehören ein erhöhtes Risiko der Thromboembolie, eines Schlaganfalls und koronarer Herzerkrankungen. Weiterhin steigen mit der Dauer der Anwendung die Risiken einer Cholezystolithiasis, uteriner Malignome und Mammakarzinome.

Calcitonin kann auch zur Osteoporose-Therapie verwendet werden. Calcitonin ist ein Peptidhormon aus 32 Aminosäuren, welche von Spezies zu Spezies unterschiedlich aufgebaut sind. So ist das Calcitonin, das von Fischen gewonnen werden kann, durchschnittlich 10- bis 30mal potenter als das von Menschen oder Schweinen

(GUTTMANN, 1981; AZRIA, 1997). Calcitonin hat die Eigenschaften, dass es die Osteoklasten reversibel immobilisiert und damit direkt hemmt (CHAMBERS and MAGNUS, 1982). Weiterhin stimuliert es die Synthese und somit die Proliferation der Osteoblasten (FARLEY et al., 1988). Ein zusätzlicher vorteilhafter Effekt ist die analgetische Wirkung des Calcitonins (GENNARI, 1987), der offenbar unabhängig von den Effekten am Knochen ist (RINGE, 1987). Allerdings ist der Wirkmechanismus noch nicht vollständig geklärt. Das Problem in der Calcitonin-Therapie liegt zum einen in der Antikörperbildung und dadurch bedingten Resistenz der Osteoklasten, zum andern aber im eigentlichen Wirkmechanismus, in der Osteoklastenhemmung. Dies kann bei chronischer Applikation zu einer Inaktivierung des Knochenumbaus führen (CHESNUT et al., 1981; GRAUER et al., 1990).

Eine Alternative zur Hormonbehandlung bietet der Einsatz von Bisphosphonaten. Sie gehören ebenfalls zu der Gruppe der antiresorptiven Substanzen. Für die Therapie der Osteoporose stehen verschiedene Bisphosphonate zur Verfügung. Dazu gehören Etidronat, Alendronat und Risedronat. Der Unterschied zwischen den einzelnen Substanzen liegt in ihrer Pharmakokinetik, der Wirkmechanismus ist bei allen Substanzen der Bisphosphonate der gleiche.

Bisphosphonate werden an der Knochenoberfläche angereichert, vor allem im Bereich der Resorptionslakunen. Ihre Wirkung beruht auf einer Hemmung der Osteoklastenaktivität, Steigerung der Apoptose der Osteoklasten und Veränderung der Zellstruktur der Osteoklasten. Sie fördern die Mineralisationsdichte über einen positiven Effekt auf die Osteoblasten (BARTL, 2002) und führen somit zu einer erhöhten Mineralisation des Knochens und einer Verminderung der Frakturrate.

Eine weitere Möglichkeit der Osteoporosetherapie besteht in der Verabreichung von Vitamin D. Da bei der senilen, wie auch bei der postmenopausalen Osteoporose eine verminderte Absorption von Kalzium und Vitamin D vorherrscht, besteht die Möglichkeit einer kombinierten Kalzium- und Vitamin D-Therapie. Bei dem dabei verwendeten Metaboliten handelt es sich meist um die biologisch aktivste Form des Vitamin D-Hormonsystems, dem Calcitriol.

Verschiedene Studien zeigen, dass eine prophylaktische Verabreichung von Vitamin D und seinen Metaboliten in geringen Dosen keinen Effekt auf den Knochenverlust im postmenopausalen Stadium haben (CHRISTIANSEN, et al. 1980). Dagegen wirkt sich eine höhere Dosierung von Vitamin D und seinen Metaboliten bei der

manifesten postmenopausalen Osteoporose vorteilhaft aus. Die Frakturnrate verringert sich und der Knochenverlust wird gemindert (ALOIA, 1990).

Die Hauptaufgabe der Vitamin D-Substitution in der Osteoporosetherapie liegt in der Steigerung der intestinalen Kalziumabsorption, die für die Entstehung neuer Knochensubstanz benötigt wird. Des Weiteren wird eine Stimulation der Osteoblastenaktivität hervorgerufen (GALLAGHER and RECKER, 1985). Zudem führt eine hochdosierte 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Therapie zu einer Hemmung der Knochenresorption über die Suppression der Osteoklasten und zu einer verminderten Neubildung von Osteoklasten-Vorläuferzellen (ERBEN et al., 1990 b; ERBEN et al., 1992; ERBEN et al., 1998). Durch diesen Einfluss von Vitamin D auf den Knochenstoffwechsel liegt der Gedanke nahe, dass man durch alleinige Substitution von Vitamin D und der Kontrolle des Kalziumplasmaspiegels eine Verbesserung der Knochenmatrix erzielen kann.

2.4.3.1 Kohärenz-Therapie bzw. ADFR-Therapie

Der ADFR Therapie liegt die Idee zugrunde, dass alle Medikamente, die einen Einfluss auf das Stadium der Resorption haben, auch einen Einfluss auf das Stadium der Formation besitzen, da im gesamten Remodeling-Prozess immer die gleichen Knochenzellen vorhanden sind (FROST, 1984).

Hypothetisch können Medikamente, welche die Resorption und Formation beeinflussen, nur über eine zusammenhängende Therapieform effizient wirken, d.h., sie müssen zum richtigen Zeitpunkt des Remodeling-Prozess verabreicht werden (FROST, 1984).

Aufgrund dieser Idee entstand die **A** (Activate) **D** (Depress) **F** (Free) **R** (Repeat) Therapie. Ihr Prinzip liegt in der Stimulation physiologischer Zellsysteme und der Annahme, dass grundsätzlich eine Kopplung zwischen osteoklastärer Resorption und nachfolgender Aktivierung der Osteoblasten stattfindet. Der Impuls für die Aktivierung der Knochenresorption wird durch eine Substanz gegeben, die in der Lage ist, den Knochen-Remodeling-Prozess zu stimulieren, d.h. vermehrt Osteoblasten und Osteoklasten zu aktivieren. Der nächste Schritt ist dann, durch die Gabe eines „Depressors,“ die Resorptionstätigkeit der Osteoklasten zu hemmen, um einen möglichst geringen Defekt zu erreichen, um dann jedoch in der

Formationsphase die nachfolgende Knochenneubildung durch die vermehrt rekrutierten Osteoblasten zu steigern. Durch die Wiederholung dieses Prozesses nach einer therapiefreien Zeit, soll eine positive Bilanz in der Knochenmasse und der Struktur erzielt werden (PARFITT, 1982).

Wie verschiedene Studien darlegen, können unterschiedliche Substanzen als Aktivator bzw. Depressor eingesetzt werden. So zeigen PTH, Phosphate und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ eine Aktivierung der Knochenformationszellen. Als Depressoren werden vor allem antiresorptive Substanzen wie z.B. Bisphosphonate, Steroide und Calcitonin eingesetzt. In einem der ersten Versuche zur ADFR-Therapie zeigten ANDERSON et al. (1984), dass durch die Gabe von Phosphat eine Steigerung der PTH-Sekretion und dadurch eine Aktivierung der BMUs ausgelöst werden kann. Für die Inhibition wurde das Bisphosphonat Etidronat eingesetzt. Das Resultat dieser Studie ergab eine Zunahme der Knochenmasse. Allerdings erbrachte diese Studie nicht, ob eventuell die alleinige Verabreichung von Etidronat den Zuwachs der Knochenmasse bewirkte. HESCH et al. (1985) setzten als Aktivator direkt PTH ein, was ebenfalls eine Steigerung der Knochenformation bewirkte. Calcitonin wurde als Osteoklasten-Hemmer eingesetzt. Auch diese Studie führte zu einer Zunahme der Knochenmineraldichte. Ebenfalls fand RASMUSSEN et al. (1980) in einer Studie, die auf das ADFR-Prinzip aufbaute, heraus, dass durch die kontinuierliche Gabe von Phosphaten und die intermittierende Gabe von Calcitonin die Knochenmineraldichte zunahm. Diese Studien wurden aber durch DELLING (1990) und PACIFICI (1988) widerlegt.

Ein weiterer Ansatzpunkt der Osteoporose-Therapie, aufgebaut auf dem ADFR Prinzip, liegt in der Monotherapie mit hochdosiertem 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, welches zyklisch verabreicht wird. Hochdosiertes 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ kann Einfluss auf die Knochenresorption und Formation nehmen. Über die Bindung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ an Rezeptoren in den Osteoblasten bewirkt 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ eine Steigerung in der Osteoblasten- und Osteoklasten-Proliferation und eine erhöhte Synthese der osteoblastären Proteine Osteocalcin, Alkalischer Phosphatase und Kollagen vom Typ 1 (SUDA et al., 1992b). Gleichzeitig erzielt die verabreichte hohe Dosis von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ über zwei Wege eine Suppression der PTH-Sekretion: zum einen über die direkte hemmende Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Parathyreoidea, zum anderen über

die Steigerung der intestinalen Kalzium-Absorption, was zu einem erhöhten Serumkalziumspiegel führt, welcher indirekt zu einer Suppression der PTH-Sekretion aus der Parathyreoidea führt (NAVEH-MANY et al., 1989). Durch das Absinken des PTH-Serumspiegels wird eine Suppression der Knochenresorption nach ca. 4 Tagen erreicht und die Osteoklastenaktivität wie auch die Rekrutierung von Osteoklasten-Precursor-Zellen gehemmt (BOYCE and WEISBRODE, 1985). Diese zeitlich begrenzte Unterdrückung der Knochenresorption und die Wiederholung nach einer therapiefreien Zeit könnte zu einer Zunahme der Knochenmasse führen (ERBEN et al., 1997).

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für dieses Experiment wurden 93 weibliche, drei Monate alte Ratten vom Stamm Fischer 344 verwendet. Der Tierversuch wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt und unter dem Aktenzeichen 209.1/211-2531-111/01 geführt.

3.2 Tierhaltung

Die Tiere waren am Institut für Tierphysiologie der LMU München untergebracht.

Der dafür speziell ausgestattete Bereich ist ein fensterloser, vollklimatisierter Raum, der kontinuierlich eine Raumtemperatur von 24° C und eine relative Luftfeuchte von 50% aufweist. Das Lichtprogramm wurde über den gesamten Versuchsablauf auf 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit eingestellt.

Die Tiere wurden paarweise in Makrolonkäfigen (Typ 3) gehalten, wobei darauf geachtet wurde, dass alle Tiere einer Versuchsgruppe im Rack untereinander angeordnet waren. Durch diese Anordnung sollten eventuelle Beeinflussungen des Versuchsgeschehens durch auftretende Unterschiede in Beleuchtungsintensität, Raumtemperatur und Luftbewegung gleichmäßig verteilt werden.

Allen Versuchsgruppen stand ad libitum frisches Leitungswasser zur Verfügung. Die Baseline-Tiere wie auch die scheinovariectomierten Ratten erhielten ad libitum ein pelletiertes Alleinfuttermittel der Firma Altromin, Typ 1324. Der Futterverbrauch der scheinovariectomierten Tiere wurde wöchentlich ermittelt. Die ovariectomierten Tiere wurden über den gesamten Versuchszeitraum mit der ermittelten Futtermenge gefüttert. Ebenso wurden alle Tiere einmal wöchentlich gewogen, um Kontrolle über den Gesundheitszustand und die Gewichtszunahme zu haben.

3.3 Versuchsaufbau und Durchführung

3.3.1 Gruppeneinteilung

Vor Versuchsbeginn wurden die 93 Tiere gewogen und anhand ihres Gewichts in homogene Gruppen mit je 8 Tieren eingeteilt. Dadurch entstanden 11 Gruppen à 8 Tiere, die jeweils paarweise in einem Käfig untergebracht waren und eine Gruppe mit 5 Tieren, die als Reservegruppe vorgesehen war. Die 11 Gruppen wurden unterteilt in eine Baseline Gruppe à 8 Tiere, die zum Zeitpunkt der Ovariectomie getötet wurden, 5 scheinovariectomierte Gruppen und 5 beidseitig ovariectomierte Gruppen. Weiterhin wurden die 5 SHAM Gruppen unterteilt in eine pretreatment-Gruppe, 2 Gruppen, die mit Calcitriol behandelt werden sollten und 2 Gruppen, denen ausschließlich Vehikel verabreicht wurde. Die gleiche Aufteilung wurde bei den OVX Gruppen durchgeführt. Von den Reservetieren wurden 3 ovariectomiert und 2 scheinovariectomiert.

3.3.2 Ovariectomie

Die Narkose wurde mit Diethyläther eingeleitet. Danach wurden die Tiere am Rücken abgeschoren und die Haut desinfiziert. Ein 1,5 cm langer Hautschnitt wurde dorsal, in der Höhe des Übergangs von Brust zur Lendenwirbelsäule gesetzt und die Haut stumpf von der Bauchmuskulatur abpräpariert. Mit einer atraumatischen Pinzette wurde dann die Muskulatur hochverlagert und die Bauchhöhle eröffnet. Mit einem Katzenkastrationshaken wurden die Uterushörner nacheinander vorgelagert, um anschließend mit einem Scherenschlag die Ovarien von ihnen abzutrennen.

Danach wurde die Uterushörner zurückverlagert, die Bauchhöhle nicht gesondert verschlossen und der Hautschnitt der Größe entsprechend mit ein bis zwei Michelklammern verschlossen. Postoperativ wurde das Tier lokal an der Wunde mit Aluminiumspray und systemisch als Infektionsprophylaxe mit Trimethoprim-Sulfonamid (Borgal[®] 7,5%, Fa. Hoechst, Wiesbaden) 100 µl/Tier behandelt.

Bei den Tieren aus den SHAM-Gruppen wurde der gleiche operative Eingriff vorgenommen, nur wurden hier die Ovarien nicht abgesetzt. Dies wurde durchgeführt, um gleiche Ausgangsbedingungen in beiden Gruppen herzustellen.

3.3.3 Versuchsaufbau

Die Gruppeneinteilung bestand aus einer Baseline-Gruppe, welche am Tag nach der Ovariectomie getötet wurde, einer SHAM- und OVX-Pretreatment-Gruppe, die beide 3 Monate nach der Ovariectomie getötet wurden. Weitere Gruppen waren 4 OVX- und 4 SHAM-Posttreatment-Gruppen.

Die 4 OVX- und 4 SHAM-Posttreatment-Gruppen wurden weiterhin unterteilt in je 2 Vehikelgruppen und 2 Calcitriol-Gruppen, wovon aus jeder Gruppe je eine Vehikel- und eine Calcitriol-Gruppe 9 Wochen nach Therapiebeginn getötet wurden. Die verbleibenden OVX- und SHAM-Gruppen wurden nach einem therapiefreien Intervall von weiteren 9 Wochen getötet.

Die Posttreatment Gruppen erhielten vor Therapiebeginn eine einmalige Injektion von 30 mg/kg Alizarin complexone (Fa. Sigma) als Fluorochrom-Marker.

Alle Versuchstiere erhielten subkutan am 8. und 3. Tag vor der Tötung eine Fluorochrom-Doppelmarkierung mit Calcein gelöst in NaHCO₃ (Fa. Sigma, Deisenhofen), 20 mg/kg KGW

Die Therapie begann 3 Monate nach der Ovariectomie. Hierbei wurde den Tieren im Abstand von 3 Wochen jeweils über 3 Tage entweder Vehikel (physiologische Kochsalzlösung/Ethanol im Verhältnis 95:5) oder 0,2 µg/kg KGW Calcitriol (Geschenk der Fa. Schering AG, Berlin) subkutan injiziert.

Tabelle 1: Versuchsplan

Gr.Nr	n	OP	3 Monate	5 Monate	7 Monate
			post OP Therapie	post OP Therapiefreies Intervall	post OP
01	8	Base Line †			
02	8	SHAM	† pretreatment control		
03	8	OVX	† pretreatment control		
04	8	SHAM	3 Zyklen Vehikel	†	
05	8	SHAM	3 Zyklen Calcitriol	†	
06	8	OVX	3 Zyklen Vehikel	†	
07	8	OVX	3 Zyklen Calcitriol	†	
08	8	SHAM	3 Zyklen Vehikel		†
09	8	SHAM	3 Zyklen Calcitriol		†
10	8	OVX	3 Zyklen Vehikel		†
11	8	OVX	3 Zyklen Calcitriol		†

Zur Uringewinnung wurden alle Tiere am Tag vor der Tötung für 9 Stunden nüchtern gehalten und über Nacht (max.14 Stunden) in Stoffwechsellkäfige gesetzt, in denen ihnen nur Leitungswasser ad libidum zur Verfügung stand.

Den Tieren wurde prämortem eine Ketamin/Xylazin Injektionsnarkose intraperitoneal appliziert (50mg/kg KGW Ketamin, Hostaket[®], Fa. Hoechst, Wiesbaden und 10mg/kg KGW Xylazin, Rompun[®] 2%, Fa. Bayer, Leverkusen) das Abdomen eröffnet und anschließend wurden sie durch Blutentzug über die Bauchorta schmerzlos getötet.

Für die pQCT Analysen wurde der 4. Lendenwirbel und die linke Tibia entnommen, anschließend entfleischt und in 70 % EtOH aufbewahrt.

Um histomorphologische Untersuchungen durchführen zu können, mussten der 1. Lendenwirbel und die rechte Tibia entnommen und entfleischt werden, um dann in 40% EtOH bei 4°C im Kühlschrank fixiert zu werden. Das bei der Tötung gewonnene Serum, der gewonnene Urin aus den Stoffwechsellkäfigen, der rechte Femur, sowie der 2., 3. und 5. Lendenwirbel, wurden bei -28°C tiefgefroren, um bei Bedarf für spätere Analysen verwendet werden zu können.

Zur Erfolgskontrolle der Ovariectomie wurde bei allen Tieren der Uterus entnommen, adspektorisch auf die Gestalt und mittels Analysenwaage auf sein Gewicht überprüft. Somit konnte anhand des Gewichts festgestellt werden, ob eine vollständige Ovariectomie vorlag.

3.4 Histologische Aufarbeitung des Knochenmaterials

3.4.1 Präparation, Fixierung, Entwässerung, Infiltration und Einbettung

Die bei den Versuchsenden entnommenen rechten Tibien wurden in proximale Tibia, Tibia-Schaft und distale Tibia mit einer Knochensäge unterteilt und zusammen mit dem 1. Lendenwirbel in dafür speziell vorgesehene Körbchen mit der dazugehörigen Beschriftung gelegt. Das Material wurde zur Fixierung in ein Schliffglas in 40 % EtOH gelegt und für 48 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank auf einen Magnetrührer gestellt.

In einer aufsteigenden Alkoholreihe, d.h. jeweils für 2-3 Tage in 70% EtOH, 95% EtOH, 100% Isopropanol und 100% Xylol wurde das Material ebenfalls im Kühlschrank auf einem Magnetrührer entwässert (SCHENK et al.1984).

Die Infiltration wurde nach der Methode von BARON et al.(1983 b), modifiziert nach ERBEN et al. (1990 a) durchgeführt. Die Infiltration wird in drei Schritten mit einem Methylmethacrylat (MMA) – Gemisch in unterschiedlicher Zusammensetzung jeweils für 3 bis 4 Tage durchgeführt. Alle Gemische wurden ebenfalls im Kühlschrank bei 4 °C auf einen Magnetrührer gestellt.

MMA Lösungen:

MMA Lösung 1: 800 ml Methylmethacrylat

200 ml Dibutylphthalat

MMA Lösung 2: 800 ml Methylmethacrylat

200 ml Dibutylphthalat

10 g Benzoylperoxid

MMA Lösung 3: 800 ml Methylmethacrylat

200 ml Dibutylphthalat

30 g Benzoylperoxid

Für die Einbettung der Knochen wurde eine frische MMA 3 Lösung angesetzt . Die Knochen wurden einzeln in Rollrandgläser, welche mit MMA-Böden beschichtet waren, gelegt mit dem Polymerisationsgemisch aufgefüllt, fest verschlossen und in

ein Wasserbad mit der Ausgangstemperatur von 26°C gestellt. Das Wasserbad wurde zweimal täglich um 0,5 °C erhöht, so dass nach 5 Tagen eine Temperatur von 31°C erreicht war. Das Wasserbad wurde dann abgestellt und die Rollrandgläser langsam, noch im Wasserbad, auf Raumtemperatur heruntergekühlt.

3.4.2 Herstellung der Knochenschnitte

Vor dem Schneiden mit dem Mikrotom HM 360 (Fa. Microm, Walldorf) mussten die Blöcke aus den Rollrandgläsern herausgelöst und der Ebene entsprechend getrimmt werden.

Anschließend wurde aus der Medianebene der Wirbelkörper bzw. aus der Sagitalebene der Tibien mit dem Mikrotom 5 µm dicke Knochenschnitte angefertigt. Die Knochenschnitte wurden dann direkt auf mit Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger übertragen, mit 96% EtOH geglättet und anschließend mit einer Folie (Kisol-Folie, Fa. Kettenbach, Eschenburg) bedeckt. Danach mussten die Schnitte für 48 Stunden bei 42°C in einer Objektträgerpresse im Trockenschrank getrocknet werden.

3.4.3 Färbung der Knochenschnitte

Nach Auswahl der qualitativ besten Knochenschnitte, hinsichtlich Schnittebene und Auftreten von Artefakten, wurden diese nach folgenden Färbeprotokollen gefärbt:

Mit der *Von Kossa-Färbung* (SCHENK et al., 1984) kann kalzifizierter Knochen intensiv schwarz gefärbt werden. Die so gefärbten Präparate wurden später für die vollautomatische Bildanalyse verwendet.

Für die *Von Kossa-Färbung* wie auch für die *Toluidinblau-Färbung* mussten die Schnitte zunächst durch dreimaliges 20minütiges Eintauchen in Methoxyethylacetat, danach durch jeweils 5minütiges Eintauchen in 70% EtOH, 40% EtOH und Aqua dest. entplastet werden (Methode nach BARON et al., 1983 b, modifiziert nach ERBEN et al., 1990 a).

Anschließend durchliefen die Schnitte der *Von Kossa-Färbung* folgende Schritte:

5% Silbernitrat

10 min

Abspülen in Aqua dest.	3 mal
Natriumcarbonat/Formaldehydlsg ¹	2 min
Abspülen in Leitungswasser	1 mal
Farmer's Reducer ²	30 sec
Fließendes Leitungswasser	20 min
Abspülen in Aqua dest.	1 mal

¹150 ml 6,7 %ige Natriumcarbonatlsg. + 10 ml 38%ige Formaldehydlsg.

²200 ml 10%ige Natriumthiosulfatlsg.+10 ml 10%ige Kaliumferricyanidlsg.)

Danach mussten die Schnitte noch mit Kaisers Glycerogelatine (Fa. Merck, Darmstadt) eingedeckelt werden.

Für die *Toluidinblau-Färbung*, die zur Differenzierung verschiedener Knochenzellen und zur Abgrenzung von Osteoid zu mineralisiertem Knochen verwendet wird (BARON et al., 1983 b), wurden die Schnitte wie bereits oben erwähnt entplastet, um dann gefärbt zu werden:

Toluidinblau-Färbelösung ³	10 min
Pufferlösung ⁴	1 min
Pufferlösung ⁴	1 min
1-Butanol 3 mal frisch	90 sec
1-Butanol/Xylol (50/50)	90 sec
Xylol	90 sec

³ 4 g Toluidinblau in 200 ml Pufferlsg., ph 3,7

⁴ 1,58 g Zitronensäure, 0,75g di-Natriumhydrogenphosphat in 1000 ml Aqua dest.

pH 3,7.

Anschließend wurden die Schnitte in Xylol aufbewahrt, um dann mit DePeX (Fa. Böhlinger, Ingelheim) eingedeckelt zu werden.

Um die in vivo durch zweimalige Calceinapplikation und Alizarin complexone markierten, aktiv in Mineralisation befindlichen Knochenoberflächen mittels

Floureszenzmikroskopie messen zu können, wurden die Schnitte ohne Herauslösen des Plastiks mit Flouromount (Fa. Serva, Heidelberg) eingedeckt und bis zur Auswertung lichtgeschützt aufbewahrt.

3.5 Messungen

3.5.1 Messung der Knochendichte mittels pQCT

Die Messung mittels pQCT (peripheral Quantitative Computerized Tomographie) basiert auf einer reproduzierbaren, empfindlichen, röntgendiagnostischen Methode. Durch sie kann dreidimensional die Knochendichte dargestellt und zwischen dem kortikalen und trabekulären Knochen unterschieden werden (Gasser, 1995).

In diesem Versuch wurden für diese Messungen die in 70% EtOH gelagerten 4. Lendenwirbel und die linken Tibien gemessen und ausgewertet.

Das Interesse bei dieser Auswertung lag vor allem auf den dreidimensionalen Parametern der gesamten Knochenmineraldichte (Total Bone Mineral Density), der kortikalen-subkortikalen Knochendichte (Crt_Sub_BMD). Beide Parameter liegen in mg/cm^3 vor und der Gesamtquerschnittsfläche (Tot_A).

3.5.2 Histomorphometrische Analysen

Für die Quantifizierung der Knochenmorphologie wurden zweidimensionale Parameter verwendet. Ihre Benennung erfolgt nach der von der American Society of Bone and Mineral Research vereinheitlichten und international gültigen Terminologie für den Bereich der Knochenhistomorphometrie (PARFITT et al., 1987).

3.5.2.1 Strukturelle statistische Parameter

Zur Messung der strukturell statistischen Parameter des trabekulären Knochens des 1. Lendenwirbels wie auch der rechten proximalen Tibia benötigte man ein vollautomatisches Bildanalyseverfahren. Für diesen Versuch stand dafür das Bildanalyseverfahren VIDAS (Fa. C. Zeiss, Oberkochen) welches über eine Bosch Messkamera (Fa. Bosch, Stuttgart) an ein Zeiss SV 11 Stereomikroskop (Fa. C. Zeiss, Oberkochen), angeschlossen war, zur Verfügung. An den nach *von Kossa*

gefärbten Knochenschnitten wurde ein jeweils 0,5 mm breiter, an die kraniale und kaudale Epiphysenfuge des Lendenwirbels, bzw. an die proximale Epiphysenfuge der Tibia angrenzender Gewebebereich von der Messung ausgeschlossen, um zu vermeiden, dass die primäre Spongiosa in die Messergebnisse miteinbezogen wird.

Über das Bildanalyzesystem konnten so automatisch die Messfläche Tissue area, (T.Ar), die Summe der Knochenfläche (Bone area, B.Ar), die Anzahl der Knochen trabekel (Trabecula number Tb.N.) und die Summe der Knochenumfänge (Bone perimeter, B.Pm) bestimmt werden. Diese Parameter wurden benötigt, um daraus folgende weiterführende Parameter zu berechnen:

- Bone area (B.Ar/T.Ar in %) welcher den Prozentsatz des kalzifizierten Knochens und Knorpels an der gesamten Masse darstellt,
- Bone Perimeter (B.Pm/T.Ar in mm/mm²) als Gesamtlänge aller in 1mm² Gewebefläche vorhandene Knochenumfängen,
- Trabecular number (Tb.N = $4/\pi \times B.Pm/T.Ar \times 0,5$ in #/mm) als Gesamtzahl voneinander abgegrenzter Trabekel,
- Trabecular number per tissue area NTBTAR (Tb.N/T.Ar in #/mm²) als Anzahl Trabekelanschnitte pro mm² Gewebefläche,
- Trabecular number per bone area NTBBAR (Tb.N/B.Ar in #/mm²) als Anzahl Trabekelanschnitte pro mm² Knochenfläche,
- Trabecular area (Tb.Ar. = B.Ar/Tb.N in mm²) durchschnittliche Fläche eines Trabekelprofilanschnitts,
- Trabecular width Tb.Wi (Tb.Wi. 0 B.Pmx2000 in µm) mittlere Trabekelbreite,
- Trabecular separation Tb.Sp (Tb.Sp = $1/Tb.N \times 1000 - Tb.Th$) = durchschnittlicher Abstand zweier benachbarten Trabekel.

3.5.2.2 Zelluläre statistische Parameter

Um zelluläre histomorphometrische Parameter bestimmen zu können, bedarf es eines halbautomatischen Meßsystems (VIDEOPLAN, Fa. Zeiss, Oberkochen) und eines Zeiss Axioskop-Mikroskops mit Zeichentubus.

Für diese Auswertung wurden die *Toluidinblau* gefärbten Schnittepräparate des

1. Lendenwirbels herangezogen. Um möglichst genau nur den gesamten trabekulären Knochenanteil bestimmen zu können, wurde ein Messfeld angelegt, von dem bei jedem Wirbelkörper 0,5 mm zur kranialen wie auch zur kaudalen Epiphysenfuge freigehalten wurde. Ebenso wurde zur dorsalen wie auch zur ventralen Kortikalis ein Bereich von 0,5 mm freigelassen.

Die Parameter die bei 200-facher Vergrößerung ermittelt wurden, waren:

- Knochenumfang = Bone perimeter, B.Pm,
- Knochenumfang welcher mit Osteoid bedeckt ist, O.Pm,
- Knochenumfang welcher mit Osteoblasten bedeckt ist = Osteoblast perimeter, Ob.Pm,
- Anzahl der Osteoklasten = osteoclasts number, Oc.N,
- Knochenumfang der mit Osteoklasten bedeckt ist = Osteoclasts perimeter, Oc.Pm,
- erodierte Knochenoberfläche = eroded perimeter, E.Pm.

Aus diesen Primärdaten wurden dann der prozentuale Anteil von Osteoid bedecktem Knochenumfang am gesamten Knochenumfang ($O.Pm/B.Pm \times 100$ in %) und die Osteoklastenzahl pro mm mineralisiertem Knochenumfang ($Oc.N/Md.Pm$ in #/mm mit $Md.Pm = B.Pm - O.Pm$) berechnet.

3.5.2.2 Dynamische Parameter

Die dynamischen Parameter wurden mittels eines halbautomatischen Meßsystems (VIDEOPLAN, Fa. Zeiss, Oberkochen) und eines Zeiss Axioskop Mikroskops mit Zeichentubus bestimmt. Intravital wurden die Ratten jeweils am 8. und 3. Tage vor der Tötung mit Calcein markiert. Durch diese Markierung konnte nun mittels einer Quecksilber-Höchstdrucklampe HBO 50 (Fa. Zeiss, Oberkochen) und durch die Fluoromount-Beschichtung das Calcein zu einer intensiv grünen Fluoreszenz angeregt und somit sichtbar gemacht werden.

Bestimmt wurden bei einer 200fachen Vergrößerung der Knochenumfang (bone perimeter, B.Pm) und der mit einer Fluoreszenz Doppelmarkierung bedeckte Knochenumfang (Double-labeled perimeter, dL.Pm). Der Abstand zwischen den beiden Fluoreszenz-Markierungen wurde alle 50µm bei 400facher Vergrößerung

gemessen. Aus dem arithmetischen Mittel dieser Messung und dem Zeitabstand der Doppelmarkierung kann die Mineral Apposition Rate (MAR) errechnet werden welche in $\mu\text{m}/\text{Tag}$ angegeben wird.

Ein weiterer Parameter ist der Mineralizing perimeter (M.Pm). Dieser Parameter definiert den Knochenumfang welcher sich in aktiver Mineralisation befindet. Er errechnet sich als prozentualer Anteil des doppeltmarkierten Knochenumfangs am gesamten Knochenumfang ($\text{M.Pm} = \text{dL.Pm}/\text{B.Pm} \times 100$ in %)

Aus diesen Parametern konnte dann die Bone Formation Rate (BFR) welche eine Aussage über die pro Tag und μm Knochenumfang neu gebildete mineralisierte Knochenfläche gibt, über die Gleichung $\text{BFR} = \text{MAR} \times \text{dL.Pm}/\text{B.Pm}$ in $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}/\text{Tag}$, errechnet werden.

3.6 Statistik

Die Statistik wurde mit Hilfe des Computerprogramms SPSS für Windows 11.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) durchgeführt. Statistische Unterschiede zwischen den scheinovarietomierten und den ovariektomierten pretreatment-Gruppen wurden mit Hilfe des T-Tests nach Student analysiert. Zur Überprüfung der Wirkungen von Calcitriol (Faktor Calcitriol) und der Ovariektomie (Faktor OVX) sowie zur Feststellung von signifikanten Interaktionen zwischen diesen beiden Faktoren wurde eine faktorielle Varianzanalyse (two-way ANOVA) durchgeführt. Dabei wurden getrennte Analysen für die Zeitpunkte „Nach 3 Behandlungszyklen“ und „Nach therapiefreiem Intervall“ durchgeführt. Für alle statistischen Analysen wurde $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Alle Werte wurden als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Gewichtsentwicklung und Versuchsverlauf

Ziel dieses Versuches war es festzustellen, ob eine zyklische Kurzzeitapplikation von hochdosiertem 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ zu einer Erhöhung der Knochenmasse bei scheinoperierten und osteopenischen ovariektomierten Ratten führen würde.

Im Verlauf des Versuches entwickelte sich das Körpergewicht der OVX- und SHAM-Tiere gleichmäßig und es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und den mit Vehikel behandelten Tieren in Bezug auf die Gewichtsentwicklung. Über den gesamten Versuchszeitraum von insgesamt ca. 7 Monaten starben 5 Tiere während des therapiefreien Intervalls aus unbekanntem Gründen (3 Tiere aus der 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-behandelten OVX-Gruppe und 2 Tiere der OVX-Vehikel-Gruppe). Die Gewichtsentwicklung ist in Tabelle 9 und 16 dargestellt.

4.2 Biochemische Parameter

Die ovariektomierten Tiere der Pretreatment-Gruppe zeigten eine deutliche Erhöhung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) und der Phosphat-Konzentrationen im Serum. Die signifikante Erhöhung der Serum-ALP-Aktivität und der Phosphat-Konzentrationen bei den OVX-Tieren war auch zu den späteren Zeitpunkten, also nach den 3 Behandlungszyklen sowie nach dem therapiefreien Intervall, zu verzeichnen. Die Erhöhung der Serumkonzentration von Phosphat ging bei den Pretreatment-OVX-Tieren und bei den OVX-Tieren am Ende des Versuchs mit einer Verringerung der renalen Phosphatexkretion einher. Nach den 3 Behandlungszyklen, also ca. 5 Monate nach der Ovariektomie, war die renale Phosphatexkretion bei den OVX-Tieren jedoch erhöht. Die Serumkonzentrationen von Harnstoff waren bei den OVX-Tieren zu den beiden späteren Zeitpunkten (5 und 7 Monate post-OVX) erniedrigt. Nach drei Behandlungszyklen zeigten die mit Calcitriol behandelten OVX-Tiere erniedrigte Serum-Kreatinin-Spiegel, erhöhte Serum-Phosphor-Konzentrationen und eine deutlich höhere renale Kalzium-

Ausscheidung. Nach dem therapiefreien Intervall waren jedoch keine Effekte der Calcitriol-Therapie mehr zu verzeichnen. Alle Parameter sind in Tabelle 9 und 16 dargestellt.

4.3 Messungen mittels peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT)

Die periphere quantitative Computertomographie bietet als röntgendiagnostisches Verfahren die Möglichkeit, bereits geringe Veränderungen der Knochenmineraldichte, getrennt nach trabekulärem und kortikalem Knochen, zu bestimmen. Im vorliegenden Versuch wurden Veränderungen am 4. Lendenwirbel und an der Tibia gemessen.

4.3.1. Einfluss der Ovariectomie auf die pretreatment-Gruppen

Drei Monate nach der Ovariectomie war im 4. Lendenwirbelkörper der ovariectomierten pretreatment-Gruppe eine deutliche Osteopenie zu verzeichnen. Im Vergleich zu SHAM-Tieren kam es zu signifikanten Abnahmen der gesamten (Abb.4), kortikalen/subkortikalen und trabekulären Knochenmineraldichte. Die Gesamtquerschnittsfläche, die Querschnittsfläche der Spongiosa und die kortikale/subkortikale Querschnittsfläche unterschieden sich jedoch kaum zwischen den Gruppen (Tab. 2).

Noch stärker ausgeprägt als im Lendenwirbel war die Ovariectomie-induzierte Osteopenie an der proximalen Tibia. Dort zeigte sich eine ausgeprägte Abnahme der gesamten, kortikalen/subkortikalen und trabekulären Knochenmineraldichte bei den OVX-Tieren (Tab. 3). Ähnlich wie im Lendenwirbel kam es auch an der proximalen Tibia von OVX-Ratten nicht zu signifikanten Veränderungen der Gesamtquerschnittsfläche, der Querschnittsfläche der Spongiosa oder der kortikalen/subkortikalen Querschnittsfläche gegenüber SHAM-Kontrolltieren. Im Tibiaschaft (Tab. 4) und an der distalen Tibia (Tab. 5) traten keine Ovariectomie-induzierten Veränderungen bei den Pretreatment-Gruppen auf .

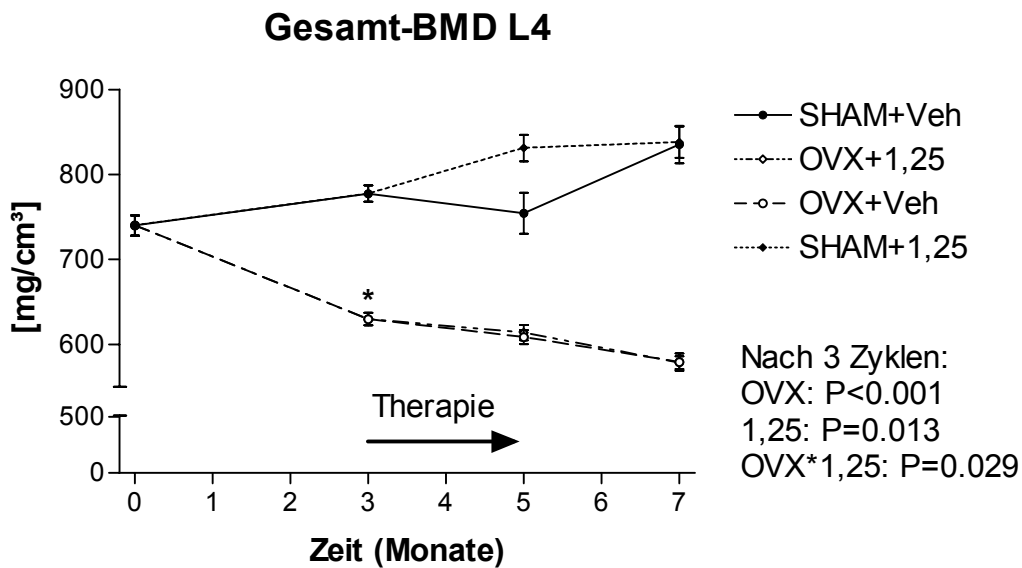


Abbildung 4: Gesamt-B(one) M(ineral) D(ensity)

OVX*1,25 = Interaktion zwischen ovariectomierten Gruppen und Calcitriol behandelten Gruppen

1,25 = Calcitriol

4.3.2 Einfluss der Ovariectomie über den gesamten Versuchszeitraum

Über den weiteren Versuchszeitraum kam es – gegenüber den Pretreatment-OVX-Ratten - zu einer Verstärkung der Osteopenie bei OVX-Tieren am 4. Lendenwirbel (Tab.2 und 10) und an der proximalen Tibia. (Tab. 3 und Tab 11). Die gesamte, kortikale/subkortikale und trabekuläre Knochenmineraldichte (Abb. 4 und 5) war an beiden Knochen nach den 3 Behandlungszyklen (ca. 5 Monate post-OVX) und nach dem therapiefreien Intervall (ca. 7 Monate post-OVX) bei OVX-Tieren signifikant reduziert. Zu beiden Zeitpunkten zeigte sich auch eine signifikante Abnahme der Gesamt-Knochenmineraldichte am Tibiaschaft (Tab. 4 und Tab. 12) und eine signifikante Zunahme der Gesamt-Knochenmineraldichte an der distalen Tibia (Tab. 5 und Tab. 13) von OVX-Ratten. Am Tibiaschaft ging dies mit einer Abnahme der Kortikalisdicke und einer Zunahme des endokortikalen und periostalen Knochenumfangs einher (Tab. 4 und Tab. 12).

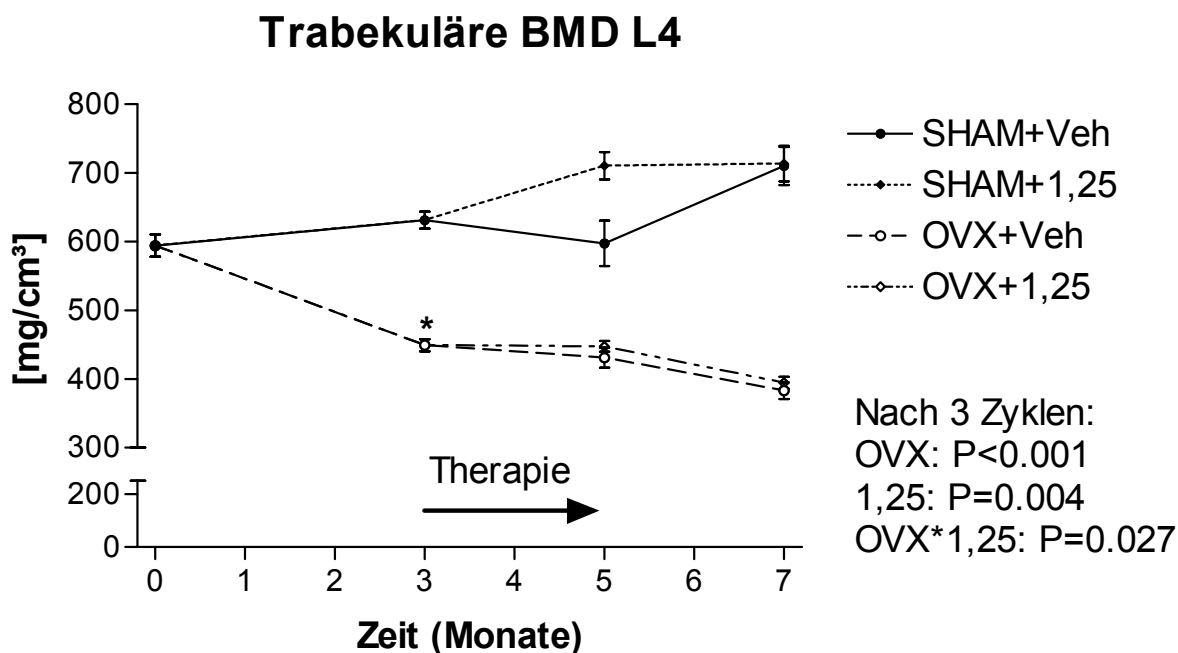


Abbildung 5: Trabekuläre-B(one) M(inal) D(ensity)

OVX*1,25 = Interaktion zwischen ovariektomierten Gruppen und Calcitriol behandelten Gruppen

1,25 = Calcitriol

4.3.3 Einfluss der Calcitriol-Therapie

Nach 3 Behandlungszyklen zeigte sich bei den mit 1,25-Dihydroxycholecalciferol behandelten Tieren gegenüber den mit Vehikeln behandelten Tieren am 4. Lendenwirbel eine signifikante Erhöhung der gesamten und trabekulären Knochenmineraldichte (Abb. 4 und 5). Dieser Effekt war bei den SHAM-Tieren stärker ausgeprägt als bei den OVX-Tieren, was sich bei der faktoriellen Varianzanalyse in einer signifikanten Interaktion zwischen Calcitriol und Ovariektomie ausdrückte (Tab.10). Auch an der proximalen Tibia war eine leichte Zunahme der Knochenmasse nach den 3 Behandlungszyklen zu verzeichnen. Dies erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Tab. 11). Am Tibiaschaft und an der

distalen Tibia konnte kein signifikanter Einfluss der Calcitriol-Therapie festgestellt werden (Tab. 12 und 13).

Die positiven Einflüsse der zyklischen Calcitrioltherapie auf die Knochenmasse gingen jedoch sämtlich über das 9wöchige therapiefreie Intervall hinweg wieder verloren, so dass nach dem therapiefreien Intervall keine signifikanten Effekte der Calcitrioltherapie mehr nachweisbar waren. Alle Ergebnisse sind in den Tabellen 10 - 13 dargestellt (Tab. 10-13), (Abb. 4+5).

4.4 Histomorphometrische Analyse

4.4.1. Einfluss der Ovariectomie

In sehr guter Übereinstimmung mit den pQCT-Messungen zeigte die histomorphometrische Analyse des 1. Lendenwirbelkörpers und der proximalen Tibiametaphyse eine Abnahme der trabekulären Knochenmasse (bone area, B.Ar/T.Ar) bei OVX-Tieren 3 Monate nach der Ovariectomie (Abb. 6). Diese Osteopenie ging mit einer Verschlechterung der Architektur des trabekulären Knochens einher, was sich in einer Reduktion der Trabekelbreite (Tb.Wi) (Abb.7) und der Trabekelfläche (Tb.Ar) sowie in einer Zunahme der Werte für die Trabekelzahl pro Knochenfläche (N.Tb/B.Ar) (Abb.8) und für die trabecular separation (Tb.Sp) (Abb. 9) ausdrückte. Wie die pQCT-Messungen bereits gezeigt hatten, kam es zu den späteren Versuchszeitpunkten zu einer weiteren Verstärkung des Östrogenmangel-Osteopenie bei OVX-Ratten sowohl im Lendenwirbelkörper (Abb.6) als auch in der proximalen Tibiametaphyse. Die Werte für den 1. Lendenwirbel sind in Tabelle 6 und 14, für die proximale Tibiametaphyse in Tabelle 8 und 15 dargestellt.

4.4.2 Einfluss der Calcitriol-Therapie

Nach 3 Behandlungszyklen zeigte sich bei den mit 1,25-Dihydroxycholecalciferol behandelten Tieren gegenüber den mit Vehikeln behandelten Tieren am 1. Lendenwirbel eine signifikante Erhöhung der trabekulären Knochenmasse (bone area, B.Ar/T.Ar) (Abb. 6). Wie die pQCT-Analysen bereits gezeigt hatten, war

dieser Effekt bei den SHAM-Tieren stärker ausgeprägt als bei den OVX-Tieren. Dies erreichte für die histomorphometrischen Messungen jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0.099$).

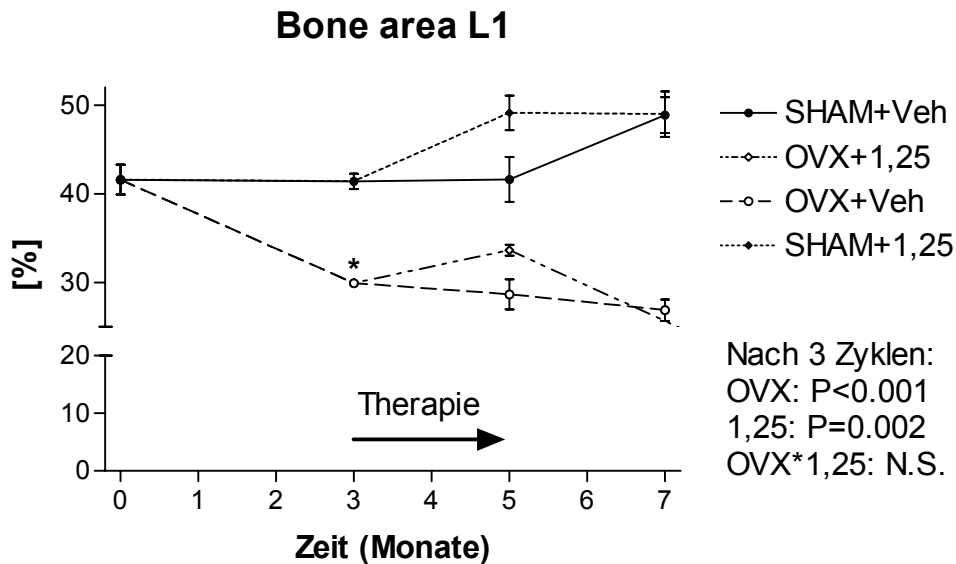


Abbildung 6: Trabekuläre Knochenmasse

OVX*1,25 = Interaktion zwischen ovariectomierten Gruppen und Calcitriol behandelten Gruppen

1,25 = Calcitriol

Die erhöhte trabekuläre Knochenmasse im 1. Lendenwirbel bei Calcitriol-behandelten Ratten (Abb. 6) ging einher mit einer Zunahme der Parameter Trabekelbreite (Tb.Wi) (Abb. 7), Trabekelfläche (Tb.Ar), Knochenumfang pro Gewebefläche (B.Pm/T.Ar) und Trabekelzahl (trabecular number, Tb.N) (Abb. 8) sowie mit einer Abnahme der Werte für die Trabekelzahl pro Knochenfläche (N.Tb/B.Ar) und für den Trabekelabstand (trabecular separation, Tb.Sp) (Abb. 9). Die Calcitriol-Therapie bewirkte also eine Verbesserung der Trabekelarchitektur. Die Werte für den 1. Lendenwirbel sind in Tabelle 6 und 14, für die proximale Tibiametaphyse in Tabelle 8 und 15 dargestellt.

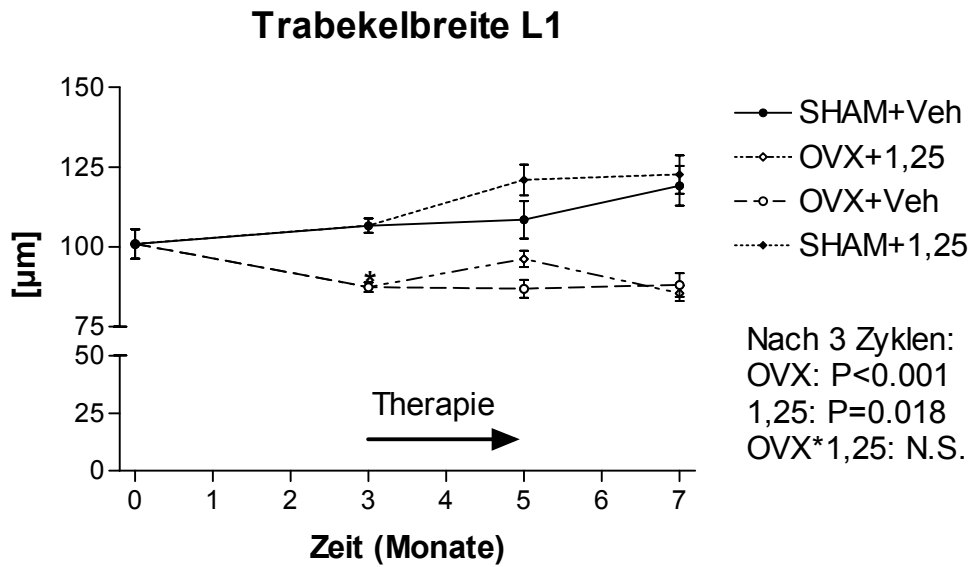


Abbildung 7: Trabekuläre Breite

OVX*1,25 = Interaktion zwischen ovariektomierten Gruppen und Calcitriol behandelten Gruppen

1,25 = Calcitriol

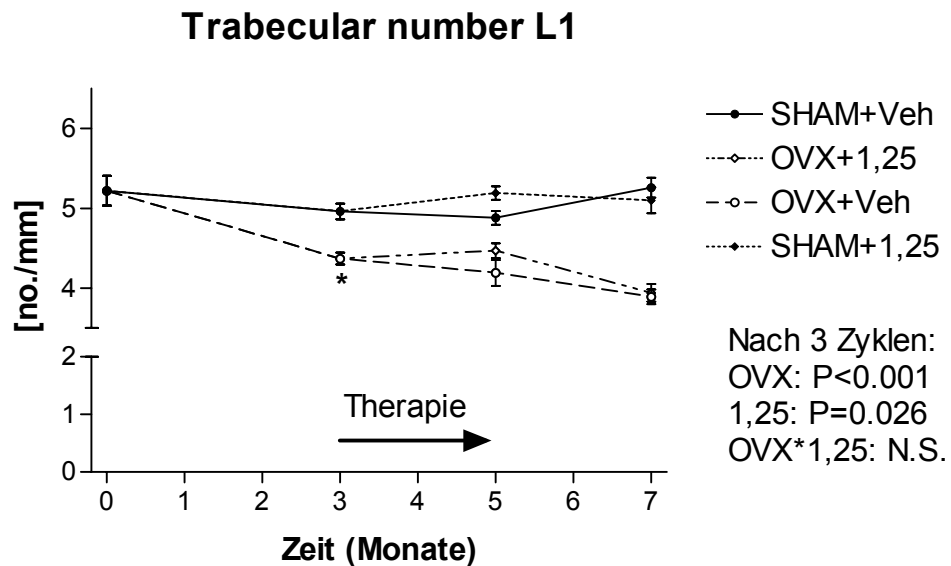


Abbildung 8: Trabekelzahl

OVX*1,25 = Interaktion zwischen ovariektomierten Gruppen und Calcitriol behandelten Gruppen

1,25 = Calcitriol

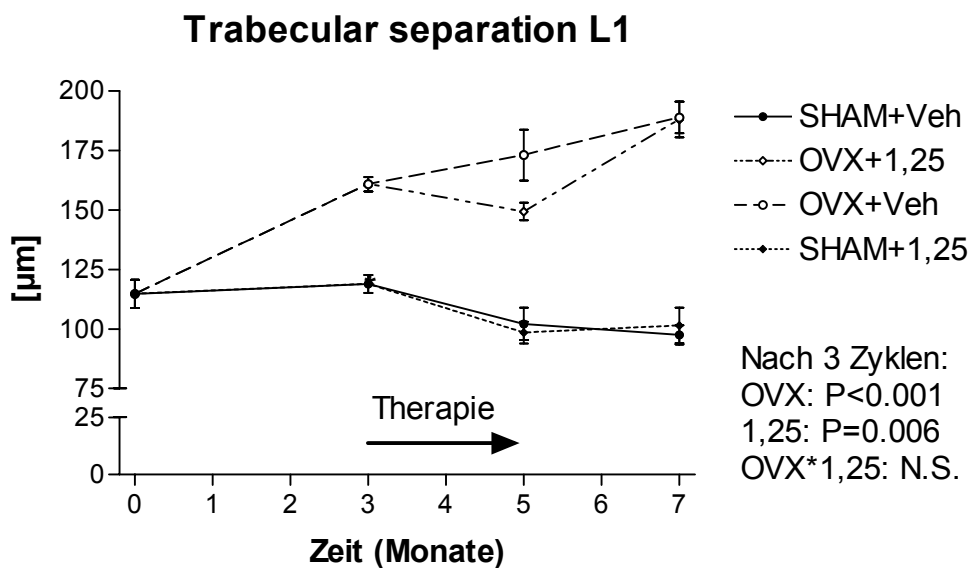


Abbildung 9: Trabekelabstand

OVX*1,25 ~ Interaktion zwischen ovariektomierten Gruppen und Calcitriol behandelten Gruppen

1,25 = Calcitriol

Es war jedoch kein Effekt der zyklischen Calcitrioltherapie auf dynamische (mineralizing perimeter, mineral apposition rate, bone formation rate) oder zelluläre Parameter des Knochenturnovers (z.B. osteoid perimeter, osteoblast perimeter, osteoclast perimeter, osteoclast number) festzustellen. Allerdings zeigten Calcitriol-behandelte SHAM und OVX-Ratten signifikant erhöhte Werte für den mit Alizarin markierten Knochenumfang. Da Alizarin vor Therapiebeginn gegeben wurde, spricht dieser Befund für eine Erniedrigung der Knochenresorption über den gesamten Beobachtungszeitraum von 9 Wochen. Dargestellt für den 1. Lendenwirbel in Tabelle 14. Im trabekulären Knochen der proximalen Tibiametaphyse konnte kein signifikanter Einfluss der Calcitriol-Therapie festgestellt werden (Tab.15).

In Analogie zu den pQCT-Ergebnissen waren am Ende des Versuchs, also nach dem 9wöchigen therapiefreien Intervall, keine signifikanten Effekte der Calcitrioltherapie im Lendenwirbel oder in der proximalen Tibiametaphyse mehr nachweisbar (Tab. 14 und 15) (Abb.6-9).

Tabelle 2: Knochendichtenmessung am 4. Lendenwirbel

		Pretreatment		Nach 3 Behandlungszyklen			
	BASE LINE	SHAM	OVX	SHAM VEH	SHAM VD	OVX VEH	OVX VD
Parameter	GRUPPE 1	GRUPPE 2	GRUPPE 3	GRUPPE 4	GRUPPE 5	GRUPPE 6	GRUPPE 7
Gesamt-BMD°	739,9±34,0	777,5±26,9	629,8±20,9*	754,5±68,3	831,1±44,4	608,6±23,7	613,9±25,6
Kortikale/ Subkortikale-BMD°	959,6±18,7	997,2±18,3*	902,3±23,0*	990,2±33,6	1012,8±29,5	875,3±24,9	865,2±36,0
Trabekuläre-BMD°	594,7±45,8	631,4±35,0*	449,2±24,8*	597,6±94,0	710,3±56,7	431,2±41,1	447,4±22,6
Gesamt-Querschnittsfläche	5,503±0,252	5,435±0,280	5,609±0,274	5,451±0,328	5,103±0,265	5,445±0,375	5,663±0,357
Trabekuläre-Querschnittsfläche	3,308±0,152	3,265±0,169	3,373±0,166	3,271±0,195	3,065±0,158	3,270±0,226	3,404±0,212
Kortikale/ Subkortikale-Querschnittsfläche	2,195±0,100	2,170±0,111	2,236±0,109	2,179±0,134	2,038±0,107	2,175±0,148	2,259±0,145

	Nach therapiefreiem Intervall			
	SHAM VEH	SHAM VD	OVX VEH	OVX VD
Parameter	GRUPPE 8	GRUPPE 9	GRUPPE 10	GRUPPE 11
Gesamt-BMD°	835,2±62,3	838,0±51,8	579,2±28,3	578,4±21,6
Kortikale/ Subkortikale-BMD°	1023,8±42,9	1025,5±27,0	874,3±23,7	856,1±18,7
Trabekuläre-BMD°	710,2±78,4	713,4±73,0	382,9±34,9	3994,4±24,5
Gesamt-Querschnittsfläche	5,743±0,187	5,806±0,332	5,760±0,310	5,759±0,376
Trabekuläre- Querschnittsfläche	3,453±0,115	3,489±0,202	3,460±0,186	3,465±0,220
Kortikale/ Subkortikale-Querschnittsfläche	2,290±0,072	2,317±0,131	2,300±0,124	2,295±0,156

Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben

*p<0,05 gegen SHAM pretreatment

°B(one) M(ineral) D(ensity) = Knochenmineraldichte

Tabelle 3: Knochendichtenmessung an der proximalen Tibia

		Pretreatment		Nach 3 Behandlungszyklen			
	BASE LINE	SHAM	OVX	SHAM VEH	SHAM VD	OVX VEH	OVX VD
Parameter	GRUPPE 1	GRUPPE 2	GRUPPE 3	GRUPPE 4	GRUPPE 5	GRUPPE 6	GRUPPE 7
Gesamt-BMD°	764,1±45,4	808,9±40,1	660,5±17,6*	785,9±32,4	834,7±44,1	619,1±29,9	615,3±19,5
Kortikale/ Subkortikale-BMD°	1041,4±107,0	1118,3±25,1	1072,0±29,8*	1083,9±31,6	1129,3±23,3	1036,1±44,8	1053,6±33,5
Trabekuläre-BMD°	486,8±50,4	499,5±58,1	248,6±17,9*	488,6±36,2	539,8±73,1	202,4±41,8	176,8±14,6
Gesamt-Querschnittsfläche	13,84±4,15	11,75±0,37 *	12,37±0,69	12,71±0,95	12,32±0,86	14,26±1,67	13,50±1,67
Trabekuläre-Querschnittsfläche	6,92±2,070	5,88±0,18 *	6,18±0,35	6,36±0,47	6,16±0,43	7,13±0,83	6,75±0,34
Kortikale/ Subkortikale-Querschnittsfläche	6,92±2,08	5,87±0,19 *	6,19±0,34	6,35±0,48	6,17±0,43	7,13±0,83	6,75±0,0,34

	Nach therapiefreiem Intervall			
	SHAM VEH	SHAM VD	OVX VEH	OVX VD
Parameter	GRUPPE 8	GRUPPE 9	GRUPPE 10	GRUPPE 11
Gesamt BMD°	804,6±52,0	797,8±37,3	610,2±66,8	604,4±19,9
Kortikale/Subkortikale BMD°	1102,5±33,3	1090,0±16,9	1052,2±27,8	1062,7±25,7
Trabekuläre BMD°	506,7±86,6	505,5±63,0	168,7±117,6	146,2±22,2
Gesamt Querschnittsfläche	12,77±1,36	13,35±0,49	13,41±0,72	13,15±0,71
Trabekuläre Querschnittsfläche	6,38±0,68	6,67±0,25	6,71±0,36	6,58±0,35
Kortikale/Subkortikale Querschnittsfläche	6,39±0,68	6,68±0,24	6,70±0,36	6,58±0,36

Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben

*p<0,05 gegen SHAM pretreatment

°B(one) M(ineral) D(ensity) = Knochenmineraldichte

Tabelle 4: Knochendichtenmessung am Tibia Schaft

		Pretreatment		Nach 3 Behandlungszyklen			
	BASE LINE	SHAM	OVX	SHAM VEH	SHAM VD	OVX VEH	OVX VD
PARAMETER	GRUPPE 1	GRUPPE 2	GRUPPE 3	GRUPPE 4	GRUPPE 5	GRUPPE 6	GRUPPE 7
Gesamt BMD°	1123,0±21,8	1119,5±20,8	1106,2±14,7	1106,4±24,7	1126,3±18,4	1071,1±27,6	1045,2±22,4
Gesamt Querschnittsfläche	3,71±0,23	3,76±0,14	3,85±0,09	3,81±0,10	3,77±0,15	3,91±0,20	4,05±0,14
Kortikale BMD°	1369,3±11,0	1378,3±8,0	1380,1±13,1	1393,9±10,3	1396,1±7,3	1382,0±9,9	1380,3±11,1
Kortikale Querschnittsfläche	2,82±0,23	2,84±0,08	2,86±0,11	2,80±0,15	2,81±0,09	2,79±0,12	2,82±0,10
Kortikalis Dicke	0,555±0,038	0,554±0,012	0,547±0,021	0,534±0,029	0,543±0,014	0,519±0,018	0,510±0,016
Periostaler Umfang	6,82±0,21	6,87±0,13	6,95±0,08	6,92±0,09	6,88±0,13	7,00±0,18	7,13±0,12
Endostaler Umfang	3,34±0,17	3,39±0,14	3,52±0,10	3,57±0,10	3,46±0,16	3,74±0,20	3,93±0,14

	Nach therapiefreiem Intervall			
	SHAM VEH	SHAM VD	OVX VEH	OVX VD
Parameter	GRUPPE 8	GRUPPE 9	GRUPPE 10	GRUPPE 11
Gesamt BMD°	1145,9±33,3	1114,9±13,5	1053,2±37,1	1041,1±10,9
Gesamt Querschnittsfläche	3,87±0,19	3,88±0,21	4,02±0,14	4,07±0,14
Kortikale BMD°	1396,2±17,8	1384,9±12,1	1372,7±10,1	1381,8±3,0
Kortikale Querschnittsfläche	2,96±0,18	2,89±0,16	2,85±0,12	2,82±0,08
Kortikalis Dicke	0,573±0,039	0,551±0,018	0,522±0,026	0,506±0,007
Periostaler Umfang	6,97±0,17	6,98±0,19	7,10±0,12	7,15±0,12
Endostaler Umfang	3,37±0,25	3,51±0,12	3,82±0,20	3,97±0,10

Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben

*p<0,05 gegen SHAM pretreatment

°B(one) M(eneral) D(ensity) = Knochenmineraldichte

Tabelle 5: Knochendichtenmessung an der distalen Tibia

		Pretreatment		Nach 3 Behandlungszyklen			
	BASE LINE	SHAM	OVX	SHAM VEH	SHAM VD	OVX VEH	OVX VD
Parameter	GRUPPE 1	GRUPPE 2	GRUPPE 3	GRUPPE 4	GRUPPE 5	GRUPPE 6	GRUPPE 7
Gesamt BMD°	901,5±70,6	871,5±35,3	871,0±20,0	853,2±72,8	905,0±19,4	924,1±50,1	924,3±22,1
Kortikale/Subkortikale BMD°	1144,4±41,2	1131,8±40,1	1133,5±32,0	1126,7±65,1	1169,5±14,8	1183,4±32,9	1182,2±17,6
Trabekuläre BMD°	336,2±155,2	264,5±58,0	256,7±47,1	215,5±102,9	289,3±35,9	320,8±101,7	322,2±49,7
Gesamt Querschnittsfläche	5,76±0,92	6,34±0,43	6,23±0,30	6,18±0,50	5,99±0,30	5,74±0,48	5,87±0,27
Trabekuläre Querschnittsfläche	1,73±0,28	1,90±0,13	1,87±0,09	1,86±0,16	1,80±0,10	1,72±0,14	1,76±0,08
Kortikale/Subkortikale Querschnittsfläche	4,03±0,65	4,44±0,30	4,36±0,20	4,33±0,35	4,19±0,21	4,01±0,34	4,11±0,19

	Nach therapiefreiem Intervall			
	SHAM VEH	SHAM VD	OVX VEH	OVX VD
Parameter	GRUPPE 8	GRUPPE 9	GRUPPE 10	GRUPPE 11
Gesamt BMD°	912,8±52,4	943,0±61,3	871,4±54,9	897,7±28,3
Kortikale/Subkortikale BMD°	1168,3±30,8	1196,3±30,2	1141,3±48,2	1165,7±23,1
Trabekuläre BMD°	315,5±116,1	351,9±136,5	239,5±82,9	271,3±55,5
Gesamt Querschnittsfläche	6,07±0,46	5,81±0,44	6,34±0,48	6,14±0,17
Trabekuläre Querschnittsfläche	1,82±0,13	1,74±0,14	1,90±0,14	1,84±0,05
Kortikale/ Subkortikale Querschnittsfläche	4,25±0,33	4,07±0,31	4,44±0,34	4,30±0,12

Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben

*p<0,05 gegen SHAM pretreatment

°B(one) M(ineral) D(ensity) = Knochenmineraldichte

Tabelle 6: Histomorphometrische Messungen am 1. Lendenwirbel

		Pretreatment		Nach 3 Behandlungszyklen			
	BASE LINE	SHAM	OVX	SHAM VEH	SHAM VD	OVX VEH	OVX VD
Parameter	GRUPPE 1	GRUPPE 2	GRUPPE 3	GRUPPE 4	GRUPPE 5	GRUPPE 6	GRUPPE 7
Tissue area	4,57±0,58	4,90±0,51	5,07±0,44	5,01±0,24	5,22±0,39	5,64±0,66	5,77±0,48
Bone area	41,6±4,77	41,41±2,42	29,94±0,99 *	41,61±7,14	49,13±5,55	28,65±4,80	33,64±1,74
Trabecular number/ Tissue area	2,2754±0,4148	2,1214±0,2440	3,0540±0,7056*	1,7223±0,6092	1,2295±0,4228	2,9831±0,7265	2,8560±0,6100
Trabecular area	0,1920±0,0551	0,2145±0,0364	0,1048±0,0263	0,2916±0,1663	0,4763±0,1821	0,1091±0,0578	0,1327±0,0507
Bone perimeter	8,19±0,83	7,78±0,44	6,86±0,33	7,67±0,38	8,14±0,38	6,58±0,72	7,01±0,41
Trabecular number/ Bone area	5,77±1,65	5,24±0,80	10,29±2,61 *	4,43±2,13	2,60±1,13	11,00±3,96	8,64±2,08
Trabecular width	100,91±12,93	106,65±6,36	87,35±4,23	108,49±16,65	120,93±13,60	86,85±7,99	96,25±7,20
Trabecular number	5,22±0,53	4,96±0,28	4,37±0,21	4,88±0,24	5,19±0,24	4,19±0,46	4,47±0,26
Trabecular separation	114,77±16,74	118,89±10,72	160,90±8,56	120,15±19,25	98,52±12,94	173,14±30,22	149,36±10,05
Osteoid perimeter				1,6200±0,7346	2,0250±2,3033	1,4355±1,1076	1,1948±0,9246
Oblast perimeter				1,5758±0,8225	1,8407±2,1149	1,1389±0,8320	1,0731±0,9389
Osteoclast perimeter				1,5257±0,6039	1,1556±0,4812	1,5204±0,5101	1,3878±0,7205
Eroded perimeter				2,4217±0,6294	3,2781±1,3065	4,5657±1,1774	4,7893±1,9826
Osteoclast number				0,5028±0,2131	0,3767±0,1645	0,4706±0,1655	0,4115±0,2142
Alizarin perimeter				14,387±7,5730	20,9398±9,1170	23,3410±7,8374	32,7880±7,1176
Mineralizing perimeter				6,9469±4,9391	10,2744±5,3145	8,8839±2,1078	5,6460±3,1590
Mineral apposition rate				1,2186±0,2041	1,4739±0,3763	0,9228±0,1480	0,9162±0,1313
Bone formation rate				0,0874±0,0722	0,1628±0,1052	0,0840±0,0306	0,0532±0,0317

Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben

*p<0,05 gegen SHAM pretreatment

Tabelle 7: Histomorphometrische Analyse des 1. Lendenwirbel

	Nach therapiefreiem Intervall			
	SHAM VEH	SHAM VD	OVX VEH	OVX VD
Parameter	GRUPPE 8	GRUPPE 9	GRUPPE 10	GRUPPE 11
Tissue area	5,72±0,48	5,50±0,73	5,94±0,59	5,98±0,42
Bone area	48,88±5,69	49,00±7,24	26,88±3,42	26,46±3,14
Trabecular number/ Tissue area	1,7816±0,7601	1,3195±0,2585	2,5016±0,7114	2,6366±0,4434
Trabecular area	0,3467±0,1734	0,4005±0,1119	0,1189±0,0377	0,1043±0,0262
Bone perimeter	8,26±0,56	8,00±0,72	6,11±0,41	6,19±0,49
Trabecular number/ Bone area	3,74±1,70	2,80±0,88	9,56±3,14	10,22±2,44
Trabecular width	119,17±17,62	122,64±17,02	88,08±10,59	85,49±6,87
Trabecular number	5,26±0,35	5,10±0,46	3,89±0,26	3,94±0,31
Trabecular separation	97,56±11,47	101,48±21,18	188,94±18,89	188,04±21,14
Osteoid perimeter	1,0149±0,6863	0,7863±0,4411	2,2027±1,2617	2,2948±1,2927
Oblast perimeter	0,9870±0,7475	0,6906±0,3579	1,7258±1,2205	1,9251±1,0929
Osteoclast perimeter	1,1306±0,6032	1,0606±0,6513	1,3426±0,5253	1,4094±0,5059
Eroded perimeter	3,6325±0,8679	3,2955±1,7692	4,0158±2,1122	4,5714±2,1966
Osteoclast number	0,3190±0,0933	0,3434±0,1797	0,4324±0,1791	0,4250±0,1630
Alizarin perimeter	18,2164±6,7037	21,4662±7,8042	18,8229±5,2171	25,1355±4,4302
Mineralizing perimeter	6,3008±5,4179	5,2967±3,4413	10,6716±3,8592	10,5776±2,5049
Mineral apposition rate	1,0774±0,1590	1,1015±0,3238	0,9336±0,1167	1,0347±0,0515
Bone formation rate	0,0662±0,0523	0,0629±0,0434	0,1023±0,0455	0,1093±0,0258

Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben

Tabelle 8: Histomorphometrische Analyse der proximalen Tibiametaphyse

		Pretreatment		Nach 3 Behandlungszyklen			
	BASE LINE	SHAM	OVX	SHAM VEH	SHAM VD	OVX VEH	OVX VD
Parameter	GRUPPE 1	GRUPPE 2	GRUPPE 3	GRUPPE 4	GRUPPE 5	GRUPPE 6	GRUPPE 7
Tissue area	12,28±2,64	13,34±0,86	13,56±1,85*	13,28±2,86	12,44±1,55	13,02±1,66	12,95±0,82
Bone area	24,43±6,08	24,89±4,74	12,46±1,59	31,81±4,10	33,96±7,24	10,83±2,91	12,78±2,18
Trabecular number/ Tissue area	4,9005±0,9884	3,7006±0,7902	3,3991±0,4127	3,2069±0,5160	2,9902±0,9101	2,7742±0,3066	2,4379±0,3873
Trabecular area	0,0509±0,0040	0,0733±0,0221	0,0369±0,0044	0,1002±0,0116	0,1307±0,0569	0,0395±0,0096	0,0560±0,0144
Bone perimeter	6,20±1,37	5,67±0,80	3,20±0,38	6,80±0,99	6,82±0,77	2,72±0,53	2,80±0,20
Trabecular number/ Bone area	20,43±1,77	16,12±7,62	27,52±3,20	10,10±1,05	9,67±4,83	27,67±9,27	21,29±8,16
Trabecular width	78,49±3,80	87,47±11,57	77,90±2,94 *	94,14±9,56	98,89±12,59	78,67±8,02	90,33±11,37
Trabecular number	3,95±0,87	3,61±0,51	2,04±0,24	4,33±0,63	4,35±0,49	1,73±0,33	1,78±0,13
Trabecular separation	201,84±55,33	213,72±46,23	437,83±73,10	161,34±31,76	155,38±35,19	537,28±125,87	495,48±48,73

	Nach therapiefreiem Intervall			
	SHAM-VEH	SHAM VD	OVX VEH	OVX VD
Parameter	GRUPPE 8	GRUPPE 9	GRUPPE 10	GRUPPE 11
Tissue area	14,29±1,74	14,85±1,13	14,73±0,78	14,42±1,96
Bone area	28,61±7,20	27,49±3,43	7,70±1,25	11,18±10,18
Trabecular number/ Tissue area	3,4381±1,5419	2,8898±0,7542	2,1418±0,4138	2,5192±0,5764
Trabecular area	0,1089±0,0697	0,1026±0,0314	0,0380±0,0113	0,0499±0,0564
Bone perimeter	6,06±0,45	5,86±0,52	2,00±0,25	2,66±1,57
Trabecular number/ Bone area	14,17±10,12	10,95±4,43	28,89±7,42	30,87±11,39
Trabecular width	93,56±17,68	93,94±9,55	77,24±9,42	76,86±14,63
Trabecular number	3,86±0,29	3,73±0,33	1,27±0,16	1,70±1,00
Trabecular separation	187,28±31,43	196,18±23,78	743,14±114,68	640,87±240,26

Alle Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben

*p<0,05 gegen SHAM pretreatment

Tabelle 9: Biochemische-Analysen

		Pretreatment		Nach 3 Behandlungszyklen			
Parameter	BASE LINE	SHAM	OVX	SHAM VEH	SHAM VD	OVX VEH	OVX VD
Serum-Analyse	GRUPPE 1	GRUPPE 2	GRUPPE 3	GRUPPE 4	GRUPPE 5	GRUPPE 6	GRUPPE 7
Kalzium	2,66±0,16	2,66±0,12	2,56±0,07	2,69±0,12	2,70±0,07	2,61±0,02	2,60±0,04
Kreatinin	33,38±2,33	33,63±1,51	34,00±3,46	32,75±1,16	31,13±0,64	35,25±1,83	33,75±2,54
Phosphat	2,51±0,81	1,77±0,28	2,19±0,24*	1,78±0,51	2,22±0,26	2,27±0,19	2,46±0,07
ALP	44,86±5,10	39,38±4,00	69,00±7,93*	38,38±5,97	42,38±6,16	68,13±8,15	63,38±6,97
Harnstoff	7,81±1,09	7,30±0,60	6,82±0,75	8,60±0,58	8,48±0,63	7,22±0,67	6,77±0,83
Urin-Analyse							
Ca/Kreatinin	2,985±1,536	4,45±1,647	3,66±2,36	5,2±1,46	5,495±1,77	3,64±1,75	7,00±3,88
Kreatinin	4680,5±980,25	4797±2284,7	4361,5±1447,3	10913,5±3371,52	6596,5±2478,0	10016,5±2465,4	10790±3609,0
Phosphor/Kreatinin	19,82±4,28	8,15±3,9	0,65±0,66*	25,675±14,66	18,46±8,63	53,04±20,54	32,05±26,93
Körpergewicht	182±20	201±8	204±57	207±14	207±6	208,00±9,14	209,00±6,25
	Nach therapiefreiem Intervall						
Parameter	SHAM VEH	SHAM VD	OVX VEH	OVX VD			
Serum-Analyse	GRUPPE 8	GRUPPE 9	GRUPPE 10	GRUPPE 11			
Ca	2,60±0,15	2,48±0,09	2,48±0,13	2,50±0,15			
Kreatinin	31,77±1,85	32,85±2,13	31,6±1,34	32,8±2,38			
Phosphat	2,27±0,51	1,87±0,39	2,29±0,31	2,83±0,40			
ALP	37,7±3,86	38,87±5,33	77,2±15,87	73,8±4,60			
Harnstoff	8,67±0,62	8,91±0,62	7,19±0,65	7,24±0,62			
Urin-Analyse							
Ca/Kreatinin	3,88±1,62	6,48±3,42	4,51±1,60	5,21±1,49			
Kreatinin	6279±3704	12207±4355	11434,8±6172	12792±8230			
Phosphor/Kreatinin	18,14±16,98	28,99±14,99	13,52±13,97	14,35±15,38			
Körpergewicht	213,75±10,29	209,87±16,53	213,88±2,66	210,2±6,05			

Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben

Tabelle 10: 2-fach ANOVA der Knochendichtemessungen des 4 Lendenwirbels

2 FACHE ANOVA						
	Nach 3 Zyklen			Nach therapiefreiem Intervall		
	OVX	1,25*	OVX x 1,25 [#]	OVX	1,25*	OVX x 1,25 [#]
Parameter						
Gesamt BMD°	p<0,001	p=0,013	p=0,029	p<0,001	N.S.	N.S.
Kortikale/Subkortikale-BMD°	p<0,001	N.S.	N.S.	p<0,001	N.S.	N.S.
Trabekuläre BMD°	p<0,001	p=0,004	p=0,027	p<0,001	N.S.	N.S.
Gesamt-Querschnittsfläche	p=0,039	N.S.	p=0,035	N.S.	N.S.	N.S.
Trabekuläre Querschnittsfläche	p=0,036	N.S.	p=0,034	N.S.	N.S.	N.S.
Kortikale/Subkortikale Querschnittsfläche	p=0,044	N.S.	p=0,036	N.S.	N.S.	N.S.

°B(one) M(eneral) D(ensity) = Knochenmineraldichte/ *1,25 ~ Calcitriol/ [#]Interaktion zwischen den OVX -und Calcitriol Gruppen

Tabelle 11: 2-fach ANOVA der Knochendichtemessungen der proximalen Tibia

	Nach 3 Zyklen			Nach therapiefreiem Intervall		
	OVX	1,25*	OVX x 1,25 [#]	OVX	1,25*	OVX x 1,25 [#]
Parameter						
Gesamt BMD [°]	p<0,001	N.S.	p=0,044	p<0,001	N.S.	N.S.
Kortikale/Subkortikale BMD [°]	p<0,001	0,024	N.S.	p=0,001	N.S.	N.S.
Trabekuläre BMD [°]	p<0,001	N.S.	p=0,043	p<0,001	N.S.	N.S.
Gesamt Querschnittsfläche	p=0,004	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Trabekuläre Querschnittsfläche	p=0,004	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Kortikale/Subkortikale Querschnittsfläche	p=0,004	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

[°]B(one) M(ineral) D(ensity) = Knochenmineraldichte/ *1,25 ~ Calcitriol/ [#]Interaktion zwischen den OVX -und Calcitriol Gruppen

Tabelle 12: 2-fach ANOVA der Knochendichtemessungen des Tibia Schafts

	Nach 3 Zyklen			Nach therapiefreiem Intervall		
	OVX	1,25*	OVX x 1,25 [#]	OVX	1,25*	OVX x 1,25 [#]
Parameter						
Gesamt BMD°	p<0,001	N.S.	p=0,016	p<0,001	p=0,050	N.S.
Kortikale BMD°	p<0,001	N.S.	N.S.	p=0,080	N.S.	p=0,036.
Gesamt Querschnittsfläche	p=0,004	N.S.	N.S.	p=0,014	N.S.	N.S.
Kortikale Querschnittsfläche	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Kortikalis Dicke	p=0,002	N.S.	N.S.	p<0,001	N.S.	N.S.
Periostaler Umfang	p=0,004	N.S.	N.S.	p=0,014	N.S.	N.S.
Endostaler Umfang	p<0,001	N.S.	p=0,027	p<0,001	p=0,044	N.S.

°B(one) M(ineral) D(ensity) = Knochenmineraldichte/ *1,25 ~ Calcitriol/ [#]Interaktion zwischen den OVX -und Calcitriol Gruppen

Tabelle 13: 2-fach ANOVA der Knochendichtemessungen der distalen Tibia

	Nach 3 Zyklen			Nach therapiefreiem Intervall		
	OVX	1,25*	OVX x 1,25 [#]	OVX	1,25*	OVX x 1,25 [#]
Parameter						
Gesamt-BMD°	p=0,009	N.S.	N.S.	p=0,034	N.S.	N.S.
Kortikale/Subkortikale BMD°	p=0,012	N.S.	N.S.	p=0,039	N.S.	N.S.
Trabekuläre BMD°	p=0,023	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Gesamt Querschnittsfläche	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Trabekuläre Querschnittsfläche	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Kortikale/Subkortikale Querschnittsfläche	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

°B(one) M(ineral) D(ensity) = Knochenmineraldichte/ *1,25 ~ Calcitriol/ [#]Interaktion zwischen den OVX -und Calcitriol Gruppen

Tabelle 14: 2-fach ANOVA der histomorphometrischen Analyse des 1. Lendenwirbels

Parameter	Nach 3 Zyklen			Nach therapiefreiem Intervall		
	OVX	1,25*	OVX x 1,25 [#]	OVX	1,25*	OVX x 1,25 [#]
Tissue area	p=0,040	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Bone area	p<0,001	p=0,002.	N.S.	p<0,001	N.S.	N.S.
Trabecular number/ Tissue area	p<0,001	N.S.	N.S.	p<0,001	N.S.	N.S.
Trabecular area	p<0,001	p=0,036	N.S.	p<0,001	N.S.	N.S.
Bone perimeter	p<0,001	p=0,026	N.S.	p<0,001	N.S.	N.S.
Trabecular number/ Bone area	p<0,001	p=0,043	N.S.	p<0,001	N.S.	N.S.
Trabecular width	p<0,001	p=0,018	N.S.	p<0,001	N.S.	N.S.
Trabecular number	p<0,001	p=0,026	N.S.	p<0,001	N.S.	N.S.
Trabecular separation	p<0,001	p=0,006	N.S.	p<0,001	N.S.	N.S.
Osteoid perimeter	N.S.	N.S.	N.S.	p=0,001	N.S.	N.S.
Osteoblast perimeter	N.S.	N.S.	N.S.	p=0,007	N.S.	N.S.
Osteoclast perimeter	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Eroded perimeter	p=0,002	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Osteoclast number	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Mineralizing perimeter	N.S.	N.S.	N.S.	p=0,003	N.S.	N.S.
Alizarin Perimeter	p=0,002	p=0,014	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Mineral apposition rate	p<0,001	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Bone formation rate	p=0,035	N.S.	p=0,047	p=0,018	N.S.	N.S.

[°]B(one) M(ineral) D(ensity) = Knochenmineraldichte/ *1,25 ~Calcitriol/ [#]Interaktion zwischen den OVX -und Calcitriol Gruppen

Tabelle 15: 2-fach ANOVA der histomorphometrischen Analyse der proximalen Tibiametaphyse

	Nach 3 Zyklen			Nach therapiefreiem Intervall		
	OVX	1,25*	OVX x 1,25 [#]	OVX	1,25*	OVX x 1,25 [#]
Parameter						
Tissue area	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Bone area	p<0,001	N.S.	N.S.	p<0,001	N.S.	N.S.
Trabecular number/ Tissue area	p=0,036	N.S.	N.S.	p=0,013	N.S.	N.S.
Trabecular area	p<0,001	N.S.	N.S.	p=0,001	N.S.	N.S.
Bone perimeter	p<0,001	N.S.	N.S.	p<0,001	N.S.	N.S.
Trabecular number/ Bone area	p<0,001	N.S.	N.S.	p<0,001	N.S.	N.S.
Trabecular width	p=0,006	N.S.	N.S.	p=0,001	N.S.	N.S.
Trabecular number	p<0,001	N.S.	N.S.	p<0,001	N.S.	N.S.
Trabecular separation	p<0,001	N.S.	N.S.	p<0,001	N.S.	N.S.

*1,25 ~ Calcitriol/ [#]Interaktion zwischen den OVX -und Calcitriol Gruppen

Tabelle 16: 2-fach ANOVA der biochemischen Analysen des Serums, Urins und des Körpergewichts

	Nach 3 Zyklen			Nach therapiefreiem Intervall		
	OVX	1,25*	OVX x 1,25 [#]	OVX	1,25*	OVX x 1,25 [#]
Serum-Analyse						
Kalzium	P=0,001	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Kreatinin	p<0,001	p=0,015	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Phosphat	p=0,002	p=0,007	N.S.	p=0,003	N.S.	N.S.
ALP	p<0,001	N.S.	N.S.	p<0,001	N.S.	N.S.
Harnstoff	p<0,001	N.S.	N.S.	p<0,001	N.S.	N.S.
Urin-Analyse						
Ca/Kreatinin	N.S.	p=0,008	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Kreatinin	p<0,001	N.S.	N.S.	p<0,001	N.S.	N.S.
Phosphat/Kreatinin	p=0,003	N.S.	N.S.	p=0,001	N.S.	N.S.
Körpergewicht	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

*1,25 ~ Calcitriol/ [#]Interaktion zwischen den OVX -und Calcitriol Gruppen

5 Diskussion

5.1 Einfluss der Ovariectomie

5.1.1 Einfluss der Ovariectomie auf das Körpergewicht

Über den gesamten Versuchszeitraum wurde das Körpergewicht der OVX-Tiere und der SHAM-Tiere kontrolliert. Es konnte keine signifikante Zunahme in Bezug auf eine Erhöhung des Körpergewichts bei den OVX-Tieren gegenüber den SHAM-Tieren festgestellt werden. Es ist bekannt, dass es bei ad libitum-gefütterten und – weniger ausgeprägt - auch bei paargefütterten jungen OVX-Ratten zu einer deutlichen Zunahme des Körpergewichts kommt (Wronski et al., 1985). Die Tatsache, dass dieser Effekt in unserem Experiment nicht festzustellen war, liegt wahrscheinlich zum einen an der sich über den gesamten Versuchszeitraum erstreckenden Paarfütterung und zum anderen am Stamm (Fischer 344) und am Alter (6 Monate) der verwendeten Ratten.

5.1.2 Einfluss der Ovariectomie auf den Knochen

Aus einer Vielzahl von Studien ist es bekannt, dass die Ovariectomie bei Ratten zu einer ausgeprägten Osteopenie führt, welche in der proximalen Tibia ausgeprägter ist als in den Wirbelkörpern. Diese Östrogenmangel-induzierte Osteopenie bei OVX-Ratten geht mit einem erhöhten Knochen-Turnover einher. Die Knochenresorption überwiegt gegenüber der Knochenformation, was letztendlich zu einer Abnahme der Knochenmasse führt (WRONSKI et al., 1988; WRONSKI et al., 1989).

Diese Daten wurden durch die vorliegende Studie bestätigt, die unter Verwendung von pQCT und Histomorphometrie zeigen konnte, dass 3 Monate nach der Ovariectomie bei OVX-Ratten ein signifikanter Verlust an Knochenmasse vorlag, der sich im Zeitverlauf der Studie weiter verstärkte. Dabei zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen, die mit pQCT und Histomorphometrie gewonnen wurden. Unsere mit pQCT ermittelten Daten decken sich dabei weitgehend mit den Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen, die diese Technik bei

OVX-Ratten einsetzen und als Folge der Ovariectomie eine Reduktion der Gesamt-Knochenmineraldichte, der Spongiosa-Knochenmineraldichte und der kortikalen/subkortikalen Knochenmineraldichte im axialen und appendikulären Skelett zeigen konnten (BREEN et al., 1995).

Die histomorphometrische Analyse des trabekulären Knochens im 1. Lendenwirbelkörper und der proximalen Tibiametaphyse zeigte neben der Verringerung der Knochenmasse auch eine Verschlechterung der Architektur des Knochens bei OVX-Ratten, was sich zum Beispiel in einer Abnahme der Trabekeldicke und in einer gesteigerten Fragmentierung des Trabekelnetzwerks ausdrückte. Auch dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von WRONSKI (1986) und BAGI (1997). Allerdings lag in unserer Studie 5 und 7 Monate nach der Ovariectomie kein erhöhter Knochen turnover mehr vor. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Erhöhung des Knochen turnovers nach der Ovariectomie ca. 1 – 2 Monaten post-OVX maximal ist und sich zu späteren Zeitpunkten wieder dem Niveau von scheinoperierten Kontrolltieren annähert (WRONSKI et al., 1988).

5.2 Skelettwirkung der zyklischen Calcitrioltherapie

Ziel dieser Studie war es, den knochenanabolen Effekt einer zyklischen Monotherapie mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bei weiblichen SHAM- und OVX-Ratten zu testen. Dabei wurde jeweils über 3 Tage hochdosiertes 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (0.2 µg/kg pro Tag) verabreicht. Danach erhielten die Tiere für 18 Tage keine Therapie. Dieser Zyklus von 3tägiger Calcitriol-Applikation, gefolgt von 18 Tagen therapiefreiem Intervall, wurde 3mal wiederholt. Die Gesamtdauer der zyklischen Therapie betrug somit 9 Wochen.

Wie bereits in mehreren Studien gezeigt, führt eine chronische Therapie mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ zu einer Reduktion der Knochenresorption und zu einer Aktivierung der Knochenformation und somit zu einer verminderten Frakturrate (GALLAGHER, 1996; Tilyard, 1993). Es galt nun festzustellen, ob die Monotherapie mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ nach dem ADFR-Schema zu einer positiven Bilanz in der Knochenmasse führte.

Die Gabe von hochdosiertem 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ führt in den ersten Tagen nach Verabreichung zu einer Steigerung der Knochenresorption (BOYCE and

WEISBRODE, 1985) und damit zu einer Aktivierung von Knochen-Remodeling-Einheiten (PARFITT, 1982). Danach kommt es zu einer transienten Unterdrückung der Knochenresorption (BOYCE and WEISBRODE, 1985; ERBEN et al., 1997), die vermutlich durch eine Erniedrigung der PTH-Sekretion vermittelt wird, ähnlich wie unter chronischer Therapie mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (WRONSKI et al., 1986; REICHEL et al., 1989; STERN, 1997; ERBEN et al., 1998;). Wie oben bereits geschildert ist es wahrscheinlich, dass die erhöhten Werte für den mit Alizarin markierten Knochenumfang bei Calcitriol-behandelten Ratten Ausdruck eines antiresorptiven Effekts der zyklischen Calcitrioltherapie in diesem Experiment sind.

Frühere Experimente haben gezeigt, dass es 1 bis 2 Wochen nach einer 3tägigen Calcitrioltherapie zu einer Erhöhung der Knochenformation kommt (ERBEN et al., 1997). Der stimulierende Effekt von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Knochenformation konnte zwar in der vorliegenden Studie am Ende von 3 Calcitriolzyklen nicht dokumentiert werden. Allerdings legen die strukturellen histomorphometrischen Daten nahe, dass im Verlauf des Experiments eine derartige Stimulation der Knochenformation vorhanden gewesen sein muss. So nahm nach 3 Zyklen die gesamte Knochenfläche (bone area, B.Ar/T.Ar) im 1. Lendenwirbel bei den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten OVX-Tieren im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten OVX-Tieren um 17% zu. Ebenso zeigte die Trabekeldicke (Tb.Wi) eine 10%ige, signifikante Zunahme. Obwohl frühere Studien zeigten, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ seinen Haupteffekt in einer Steigerung der Trabekeldicke und nicht in der Zunahme der Anzahl der Trabekel (Tb.N) hat (ERBEN et al., 1998), konnte in dieser Studie eine signifikante Zunahme gegenüber den OVX-Kontrolltieren um 6% festgestellt werden. Der mittlere Abstand zweier Trabekel zueinander (Tb.Sp) verringerte sich um 14% im Vergleich zur Vehikel-OVX-Kontrollgruppe.

Die mit pQCT bestimmten Knochenmineraldichte-Messeungen bestätigten weitgehend die Ergebnisse der histomorphometrischen Analysen. Die Gesamt-Knochenmineraldichte und die Spongiosa-Knochenmineraldichte im 4. Lendenwirbelkörper stiegen nach 3 Calcitriolzyklen bei SHAM- und OVX-Tieren signifikant an. An der Tibia war allerdings kein signifikanter Therapie-Effekt nachweisbar. Möglicherweise liegt dies daran, dass an der Tibia zu Therapiebeginn eine stärkere Osteopenie vorlag (ERBEN et al., 1998).

Nach Absetzen der Calcitrioltherapie und einem therapiefreien Intervall von 9 Wochen war weder im Lendenwirbel noch an der Tibia ein signifikanter Therapieeffekt nachweisbar. Dies zeigt, dass nach Beendigung der zyklischen Calcitrioltherapie die positiven Wirkungen auf die Knochenmasse relativ rasch wieder verloren werden und die Skelettmasse zu ihrem Ausgangszustand zurückkehrt.

Unsere Studie an Ratten hat somit erstmals gezeigt, dass eine zyklische Monotherapie mit Calcitriol in der Lage ist, die Knochenmasse in einem normalen oder osteopenischen Skelett zu erhöhen. Möglicherweise eignet sich diese Therapieform somit auch zur Behandlung der humanen Osteoporose.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, den knochenanabolen Effekt einer zyklischen Monotherapie mit Calcitriol bei weiblichen SHAM- und OVX-Ratten zu testen. Für die Durchführung dieses Versuches wurden 93 weibliche, 6 Monate alte Fischer-344-Ratten in 11 Gruppen à 8 Tiere eingeteilt. Zu Beginn des Versuches wurden 5 Gruppen scheinovarietomiert (SHAM), 5 Gruppen ovarietomiert (OVX) und eine Gruppe als baseline control getötet. Von den verbleibenden je 5 SHAM- und 5 OVX-Gruppen wurde jeweils eine als Pretreatment-Gruppe 3 Monate nach der Ovariectomie getötet. Die verbleibenden 4 OVX- und 4 SHAM-Gruppen wurden unterteilt in je 2 Vehikel-Gruppen und 2 Calcitriol-Gruppen, denen im Abstand von 3 Wochen jeweils über 3 Tage entweder Vehikel (physiol. Kochsalzlösung) oder 0,2 µg/kg KGW Calcitriol subkutan injiziert wurde. 9 Wochen nach Therapiebeginn wurden aus den SHAM- und OVX-Gruppen je eine Vehikel- und eine Calcitriol-Gruppe getötet. Die verbleibenden OVX- und SHAM-Gruppen wurden nach einem therapiefreien Intervall von weiteren 9 Wochen getötet. Alle Tiere erhielten vor der Tötung eine In vivo-Fluorochrom-Doppelmarkierung mit Calcein. Ebenso wurde vor den jeweiligen Versuchsenden von allen Tieren Urin in Stoffwechselläufigen und Serum im Rahmen der Tötung gewonnen. Die Knochenmineraldichte des 4. Lendenwirbels und der proximalen und distalen Tibia sowie des Tibiaschaftes wurde mittels peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT) gemessen. Weiterhin wurden strukturelle, zelluläre und dynamische Parameter im 1. Lendenwirbel und in der proximalen Tibiametaphyse mit quantitativer Histomorphometrie bestimmt. Nach Behandlung mit 3 Zyklen von kurzzeitig appliziertem Calcitriol nahm die histomorphometrisch gemessenen trabekuläre Knochenfläche im 1. Lendenwirbel und die mit pQCT gemessene Knochenmineraldichte im 4. Lendenwirbel bei den mit Calcitriol behandelten SHAM- und OVX-Tieren im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten Tieren deutlich zu. An der Tibia war allerdings kein signifikanter Therapie-Effekt nachweisbar. Unsere Studie hat somit klar gezeigt, dass eine zyklische Monotherapie mit Calcitriol in der Lage ist, die Knochenmasse in einem normalen oder osteopenischen Skelett zu erhöhen. Nach Absetzen der Calcitrioltherapie und einem therapiefreien Intervall von 9 Wochen war allerdings weder im Lendenwirbel noch an der Tibia ein signifikanter Therapieeffekt

nachweisbar. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass sich diese Therapieform möglicherweise auch zur Behandlung der humanen Osteoporose eignet.

7 Summary

Bone anabolic effects of cyclical calcitriol therapy in aged rats

The purpose of this study was to explore the bone anabolic potential of a cyclical calcitriol therapy in female SHAM and OVX rats. For this study, 93 female, 6-month-old Fischer 344 rats were divided into 11 groups, each containing 8 animals. At the beginning of the experiment, 5 groups were sham-operated (SHAM), 5 groups were ovariectomized, and one group was killed as baseline control. Of the remaining 5 SHAM and 5 OVX groups, one group each was killed 3 months after the ovariectomy as pre-treatment control. The remaining 4 OVX and 4 SHAM groups were divided into 2 vehicle and 2 calcitriol groups each. Every 3 weeks, the animals were subcutaneously injected with either vehicle (physiological saline) or 0.2 µg/kg body weight calcitriol over three days. Nine weeks after the beginning of the cyclical therapy, one group of vehicle- and calcitriol-treated SHAM and OVX rats each was killed. The remaining OVX and SHAM groups were killed after a therapy-free interval of 9 weeks. All animals received *in vivo* fluorochrome double labeling with calcein before necropsy. In addition, urine samples of all animals were taken in metabolic cages, and blood was drawn as part of the necropsy procedure for serum analysis. The bone mineral density of the 4th lumbar vertebra, the proximal and distal tibia, and of the tibial shaft was determined by peripheral quantitative computed tomography (pQCT). Structural, cellular, and dynamic parameters in the 1st lumbar vertebra and in the proximal tibial metaphysis were measured by quantitative histomorphometry. After the three short-term calcitriol cycles, cancellous bone area of the 1st lumbar vertebra as measured by bone histomorphometry, and bone mineral density of the 4th lumbar vertebra as determined by pQCT showed a distinct increase in the calcitriol-treated SHAM and OVX groups relative to vehicle-treated rats. However, we found no significant effect of cyclical calcitriol therapy in the tibia. Thus, our study has clearly shown that cyclical monotherapy with calcitriol is able to increase bone mass in a normal and osteopenic skeleton. However, after termination of cyclical calcitriol therapy and a therapy-free interval of 9 weeks, there were no significant effects of calcitriol therapy in the tibia or in the lumbar vertebra any more. Taken together, our results suggest that cyclical calcitriol therapy may also be suitable for the therapy of human osteoporosis.

8 Literaturverzeichnis

ADAMS, J.S. and M.A. GACAD (1985)

Characterization of 1α hydroxylation of vitamin D₃ sterols by cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis

J Exp Med 161, 755–765

ALOIA, J.F. (1990)

Role of calcitriol in the treatment of postmenopausal osteoporosis

Metabolism 39 (Suppl 1), 35-38

ANDERSON, C., R.D.T. CAPE, R.G. CRILLY, A.B. HODSMAN, B.M.J. WOLFE (1984)

Preliminary observations of a form of coherence therapy for osteoporosis.

Calcif Tissue Int 36, 341-343

ARMBRECHT, H.J., K. OKUDA, N. WONGSUWARAT, R.K. NEMANI, M.L. CHEN, M.A. BOLTZ (1992)

Characterisation and regulation of the Vitamin D Hydroxylases

J Ste Biochem Mol Bio 43, 1073-1081

AZRIA, M. (1997)

Treatment with calcitonin for osteoporosis

Ann Rheum Dis Jul, 56, 440-441

BAGI, C.M., E. DELEON, P. AMMANN, R. RIZZOLI, S.C. MILLER (1997)

Histo-Anatomy of the proximal femur in rats: Impact of ovariectomy on bone mass, structur and stiffness

Anat Rec 245, 633-644

BARON, R., A. VIGNERY, M. HOROWITZ (1983 a)

Lymphocytes, macrophages and the regulation of bone remodeling

In: Bone and Miner Res (Ed.: W.A. Peck),

Amsterdam Elsevier Vol 2, 175-184

- BARON, R., A. VIGNERY, L. NEFF, A. SILVERGLATE, A. SANTA MARIA (1983 b)
Processing of undecalcified bone specimens for bone histomorphometry:
Techniques and interpretation
In: Bone histomorphometry: Techniques and interpretation (Ed.: R.R.Recker),
CRC Press, Boca Raton, Florida, 13-35
- BARON, R., R. TROSS, A. VIGNARY (1984)
Evidence of sequential remodeling in rat trabecular bone morphology dynamic
histomorphometry and changes during skeletal maturation
Anat Rec 208, 137-145
- BARTL, R. (2002)
Osteoporosis
INTEGA (Berl) Dec, 43, 1529-1543
- BERRY, V., H. FATHOLD, L.B. PULMAN, H.K. DATTA (1994)
Immunofluorescent evidence for the abundance of focal adhesion kinase in the
human and avian osteoclasts and its downregulation by calcitonin
J Endocrinol 141, 11-15
- BIKLE, D.D., M.K. NEMANIC, E.A. GEE, P. ELIAS (1986)
1,25 Dihydroxyvitamin D₃ production by human keratinocytes: kinetics and
regulation
J Clin Invest 78, 557-566
- BIKLE, D.D., E. GEE, S. PILLAI (1993)
Regulation of keratinocyte growth, differentiation and vitamin D metabolism by
analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D
J Invest Dermatol 101, 713-718
- BLUNT, J W., H.F. DeLUCA, H.K. SCHNOES (1968).
25-Hydroxycholecalciferol. A biologically active metabolite of vitamin D₃
Biochem 7, 3317-3322

BOIVIN, G., P. MESGUICH, J.W. PIKE, R. BOUILLON, P.J. MEUNIER, M.R. HAUSSLER,
P.M. DUBOIS, G. MOREL (1987)

Ultrastructural immunocytochemical localization of endogenous 1,25
dihydroxyvitamin D₃ and its receptors in osteoblasts and osteocytes from neonatal
mouse and rat calvaria
Bone Miner 3, 125-136

BONJOUR, J.P., C. PRESTON, H. FLEISCH (1977)

Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on renal handling of P_i in
thyroparathyroidectomized rats
J Clin Invest 60, 1419-1428

BOYAN, B.D., L.F. SCHWARTZ, L.D. SWAIN (1992)

In vitro studies on the regulation of enchondral ossification by vitamin D
Crit Rev Oral Biol Med 3, 15-30

BOYCE, R.W. and S.E. WEISBRODE (1985)

Histogenesis of hyperosteoidosis in 1,25(OH)₂D₃-treated rats fed high levels of
dietary calcium
Bone 6, 105-112

BREEN, S.A., A.J. MILLEST, B.E. LOVEDAY, D. JOHNSTON, J.C. WATERTON (1995)

Regional analysis of bone mineral density in the distal femur and proximal tibia
using peripheral quantitative Computer Tomography in rat in vivo
Calcif Tissue Int 58, 449-453

BROWN, E.M., G. GAMBA, R. RICCARDI, M. LOMBARDI, R. BUTTERS, O. KIFOR, A. SUN,
M.A. HEDIGER, J. LUTTON, S.C. HERBERT (1993)

Cloning and characterisation of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine
parathyroid
Nat 366, 575-580

CHAMBERS, T.J. and C.J. MAGNUS (1982)

Calcitonin alters behavior of isolated osteoclasts

J Pathol 136, 27-39

CHESNUT, C.H., D.J. BAYLINK, B.A. ROOS, H.E. GRUBER, J.L. IVEY, M. MATTHEWS,
W.B. NELP, K. SISOM (1981)

Calcitonin and postmenopausal osteoporosis

In. Calcitonin, 1981 (Ed.: A. Pecile),

Excerpta Medica, Amsterdam, 247-255

CHRISTENSON, R.H. (1997)

Biochemical markers of bone metabolism: an overview

Clin Biochem 30, 573-593

CHRISTIANSEN, C., M.S. CHRISTIANSEN, P. McNAIR, C. HAGEN, K.E. STOCKLUND,
I. TRASBØL (1980)

Prevention of early postmenopausal bone loss: controlled 2 year study in 315
normal females

Eur J Clin Invest 10, 273-279

COOKE, N.C. and J.G. HADDAD (1997)

Vitamin D binding protein

Acad 87-101

DELLING, G., T.H. DREYER, M. HAHN, M. VOGEL, E.F. RITTINGHAUS,
R.D. HESCH (1990)

Morphologic study of iliac crest spongiosa in patients with osteoporosis treated
according to ADFR with parathyroid hormone and diphosphonates

Z Orthop Ihre Grenzgeb., Jan-Feb, 128, 1-5

DOTY, S.B. (1981)

Morphological evidence of gap junctions between bone cells

Calcif Tissue Int 33, 509-512

- ERBEN, R.G., B. KOHN, W.A. RAMBECK , H. ZUCKER (1990 a)
Histomorphometric analysis of the rat proximal tibial metaphysis by "linear scanning"
Scanning Microsc 4, 625-640
- ERBEN, R.G., B. KOHN, H. WEISER, F. SINOWATZ, W.A. RAMBECK (1990 b)
Role of vitamin D metabolites in the prevention of osteopenia induced by
ovariectomy in axial and appendicular skeleton of the rat
Z Ernaehrungswiss 29 , 229-248
- ERBEN, R.G., H. WEISER, F. SINOWATZ, W.A. RAMBECK, H. ZUCKER (1992)
Vitamin D metabolites prevent vertebral osteopenia in ovariectomized rats
Calcif Tissue Int 50, 228-236
- ERBEN, R.G., A.M. SCUTT, M. DENGSHUN, U. KOLLENKIRCHEN, M. HABEREY (1997)
Short-term treatment of rats with high dose 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates bone
formation and increase the number of osteoblast precursor cells in bone marrow
Endocrinology 138, 4629-4635
- ERBEN, R.G., S. BROMM, M. STANGASSINGER (1998)
Therapeutic efficacy of 1 alpha Dihydroxyvitamin D₃ and Calcium in osteopenic
ovariectomized rats: Evidence for a direct anabolic effect of 1 alpha 25
Dihydroxyvitamin D₃ on bone
Endocrinology 139, 4319-4328
- ERICKSEN, E.F., S.F. HODGSON, R. EASTELL, S.L. CEDEL, W.M. O'FALLON,
B.L. RIGGS (1990)
Cancellous bone remodeling in type 1 (postmenopausal) osteoporosis: quantitativ
assessment of rats of formation, resorption, and bone loss tissue and cellular levels
J Bone Min Res 5, 311-319
- FARLEY, J.R., N.M. TRABEAUX, S.C. HALL, T.A. LINKHART, D.J. BAYLINK (1988)
The antiresorptive agent calcitonin also acts in vitro to direct increase bone
formation and bone cell proliferation
Endocrinology 123, 159-167

- FELIX, R., M.G. CECCHINI, H. FLEISCH (1990)
Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse
Endocrinology 127, 2592-2594
- FELSON, D.T., Y. ZAHNG, M.Z. HANNAN, D.T. KIEL, P. WILSON, J.J. ANDERSON (1993)
Results from the Framingham Osteoporosis study
N Engl J.Med, 329, 1141-1146
- FOURNIR, A., P.H. MORINIERE, R. OPRISIU, P. YVERNEAU-HARDY, P.F. WESTEEL, H. MAZOUS, N. EL ESPER, A. GHAZALI, B. BOUDAILLIEZ (1995)
1 Alpha Hydroxyvitamin D₃ derivatives in treatment of renal bone diseases: Justification and optimal modalities of administration
Nephrol 71, 254-283
- FROST, H.M. (1984)
The ADFR concept revisited
Calcif Tissue Int Jul 36, 349-353
- FROST, H.M. (1990)
Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 1. Redefining Wolff's law: The bone modeling problem
Anat Rec 226, 403-413
- FROST, H.M. (1991)
Skeletal structural adaptations to mechanical usage: II. Fibrous tissue, cartilage and joints
- GALLAGHER, J.C. and R.R. RECKER (1985)
A comparison of the effects of calcitriol or calcium supplements on bone in postmenopausal osteoporosis
In: Vitamin D: A Chemical, Biochemical and Clinical Update (Eds.: Norman et al.), Berlin, de Gruyter, 971-975
- GALLAGHER, J.C. (1990)
The Pathogenesis of Osteoporosis
Bone Miner 9, 215-227

GALLAGHER, J.C., C.W. BISCHOP, J.C. KNUTSON, R.B. MAZESS, H.F. De LUCA (1994)

Effects of increasing doses of 1 Hydroxyvitamin D₂ on Calcium homeostasis in postmenopausal osteopenic women

J Bone Min Res 9 (5), 607-614

GALLAGHER, J.C. (1996)

The role of vitamin D in the pathogenesis and treatment of osteoporosis

J Rheumatol Suppl 45, 15-18

GARABEDIAN, M., Y. TANAKA, M.F. HOLICK, H.F. DeLUCA (1974).

Response of intestinal calcium transport and bone calcium mobilisation to 1,25 dihydroxyvitamin D₃ in parathyroidectomized rats

Endocrinology 94, 1022–1027

GENNARI, C. (1987)

Calcitonins in osteogenic pain

Osteoporos Int 1256-1261

GRAUER A., F. RAUE, H.G. SCHNEIDER, K. FRANK-RAUE, R. ZIEGLER (1990)

In vitro detection of neutralizing antibodies after treatment of Paget's disease of bone with nasal salmon calcitonin

J.Bone Min Res 5, 387-391

GRAY, R.W., A.E. CALDAS, D.R. WILZ, J. LEHMANN, JR. G.A. SMITH,

H.F. DeLUCA (1978)

Metabolism and excretion of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ in healthy adults

J Clin Endocrinol Metab 46, 756-765

GRIGORIADIS, A.E., J.N.M. HEERSCHE, J.E. AUBIN (1988)

Differentiation of muscle, fat, cartilage and bone from progenitor cells present in a bone derived clonal cell population: effect of dexamethasone

J Cell Bio 106, 2139-2151

GUTTMANN, S. (1981)

Chemistry and structure-activity relationship of natural and synthetic calcitonins
In: Calcitonin 1980. Proc. Int. Symp., Milan 1981 (Ed.: A. Pecile),
Exerpta Medica Int Congr Ser 540, 11-24

HADDAD, J.G. (1987)

Traffic, binding and cellular access of vitamin D sterols
Bone Miner Res, ed: Peck W.A., New York
Elsevier Vol 5, 281-308

HADDAD, J.G. (1992)

Clinical aspects of measurements of plasma vitamin D sterols and the vitamin D
binding protein
Dis Miner Metab 195-216

HARRIS, H. (1989)

The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know
Clin Chem Acta 186, 133-150

HAUSSLER, M.R., P.W. JURUTKA, J.C. HSIEH, P.D. THOMPSON, S.H. SELZNICK,
C.H.HAUSSLER, G.K. WHITFIELD (1995)

New understanding of the molecular mechanism of receptor-mediated genomic
actions of the Vitamin D Hormone
Bone 17, 33-38

HEANEY, R.P. (1990)

Estrogen-calcium interactions in the postmenopause: a quantitativ description
Bone Miner, 11, 67-84

HENRY, H.L. (1997)

The 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α hydroxylase
Academic 57-68

HESCH, R.D., J. HECK, T. SCHETTLER (1985)

human parathyreoid hormone for coherence therapy of osteoporosis
Acta Endocrinol 108, Suppl. 267, 171-172

HOFFMANN, P. (1987)

Diagnostik, Prävention und Therapie der Osteoporose
Ther Umsch 37, 4427-4430

HOWARD, G.A., B.L. BOTTEMILLER, D.J. BAYLINK (1980)

Evidence for the coupling of bone formation to bone resorption in vitro
Metab Bone Dis Rel Res 2, 131-135

JOHNSON, J.A. and R. KUMAR (1994)

Renal and intestinal calcium transport: roles of vitamin D and vitamin D dependent
calcium binding proteins
Sem Nephrol 14, 119-128

JOHNSTON C.C., S. HUI, R.M. WITT, R. APPLIEDORN, R.S. BAKER,
C. LONGCOPE (1985)

Early menopausal changes in bone mass and sex steroids
J Clin Endocrinol Metab 61, 905-911

JONES, G., D. VRIEZEN, D. LOHNES, V. PALDA, N.S. EDWARDS (1987)

Side chain hydroxylation of vitamin D₃ and its physiological implications
Steroids 49, 29-53

JONES, G., J., S.A. STRUGNELL, H.F. DeLUCA (1998)

Current Understanding of the Molecular Actions of Vitamin D
Physiol Rev 78, 1193-1231

KUHLENCORDT, F. (1987)

Clinical aspects of osteoporosis
In: Generalized Bone Disease (Eds.: F. Kuhlencordt, P. Dietsch, E. Keck,
H.-P. Kruse),
Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 3-19

LEAN, J.M., A. MACKAY, J. CHOW, T. CHAMBERS (1996)

Osteocytic expression of mRNA for c-fos and IGF-I; an immediate early gene
response to an osteogenic stimulus
Am J Physiol 270, 937-945

- LIAN, J.B. and G.S. STEIN (1993)
Vitamin D regulation of Osteoblast growth and differentiation
In: Nutrition and Gene expression (Eds.: C.D. Berdanier, J.L. Hargrove),
Boca Raton, FL; CRC Press, 391-429
- LINDGREN, J.U. and T.S. LINDHOLM (1979)
Effect of 1 alpha Hydroxyvitamin D₃ on osteoporosis in rats induced by
oophorectomy
Calcif Tiss Int 27, 161-164
- LINDSAY, R. (1988)
Sex steroids in the pathogenesis and prevention of osteoporosis
In: Osteoporosis: etiology, diagnosis and management (Eds.: B.L. Riggs,
J.L. Melton III),
Raven Press, New York, 333-358
- LIU, L., A. KHASTGIR, J. McCAULEY, T.S. DUNN, J.H. MORRISSEY, S. CHRISTAKOS,
M.R. HUGES, J.E. BOURDEAU (1996)
RT-PCR microlocalization of mRNAs for Calbindin_{D28k} and vitamin D receptor in
murine nephron
Am J Physiol 270, 677-681
- MALLUCHE, H.H., C. MATTHEWS, M.C. FAUGERE, P. FANTI, D.S. ENDRES,
R.M. FRIEDLER (1986)
1,25 dihydroxyvitamin D maintains bone cell activity and parathyroid hormone
modulates bone cell number in dogs
Endocrinology 119, 1298-1304
- MALONE, J.D., S.L. TEITELBAUM, G.L. GRIFFIN, R.M. SENIOR, A.J. KAHN (1982)
Recruitment of osteoclast precursor by purified bone matrix constituents
J Cell Biol 92, 227-230
- MEIKLE, M.C., S. BORD, R.M. HEMBRY, J. COMPSTON, P. CROUCHER,
J.J. REYNOLDS (1992)
Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix
metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines
J Cell Sci 103, 1093-1099

MELSON, G.L., C.R. CHASE, G.D. AUERBACH (1989)

Hormones and their function in osteoporosis

Endocrinology 125, 2324-2329

MERKE, J., E. RITZ, G. SCHETTLER (1986)

New viewpoints on the role of vitamin D. Current knowledge and outlook

Dtsch Med Wochenschr 111 , 345-349

MILLER, S.C. and W.S.S. JEE (1987)

The bone lining cell: A distinct phenotype?

Calcif Tissue Int 41, 1-5

NAVEH-MANY, T., M.M. FRIEDLAENDER, H. MAYER, J. SILVER (1989)

Calcium regulates parathyroid hormone messenger ribonucleic acid (mRNA), but not calcitonin mRNA *in vivo* in the rat. Dominant role of 1,25-Dihydroxyvitamin D

Endocrinology 125, 275-289

NORDIN, B.E.C. (1987)

The definition and diagnosis of Osteoporosis. Editorial

Calcif Tissue Int 40, 57-58

NORMANN, A.W., B.J. FRANKEL, A.M. HELDT, G. GRODSKY (1980)

Vitamin D Deficiency Inhibits Pancreatic Secretion of Insulin

Sci 209, 823-825

PACIFICI, R., C. McMURTRY, I. VERED, R. RUPICH, L.V. AVIOLI (1988)

Coherence therapy does not prevent axial bone loss in osteoporotic women: a preliminary comparative study

J Clin Endocrinol Metab 66, 747-753

PARFITT, A.M. (1982)

The coupling of bone resorption to bone formation:

a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis

Metab Bone Dis Rel Res 4, 1-6.

PARFITT, A.M. (1983)

The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data
In: Bone histomorphometry: Techniques and interpretation (Ed.: R.R. Recker),
CRC Press, Boca Raton, p.143-223

PARFITT, A.M. (1984)

The cellular basis of bone remodeling: The quantum concept reexamined in light of
recent advances in the cell biology of bone
Calcif Tissue Int 36, 37-45

PARFITT, A.M., M.K. DREZNER, F.H. GLORIEUX, J.A. KANIS, H. MALLUCHE,
P.J. MEUNIER, S.M. OTT, R.R. RECKER (1987)

Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units
J Bone Miner Res 2, 595-610

PARFITT, A.M. (1990)

Pharmacologic manipulation of bone remodeling and calcium Homeostasis
Calcium Metabolism Prog Basic
Clin Pharmacol Vol 4, 1-27

PARFITT, A.M. (1994)

Problems in the application of in vitro systems to the study of human bone
remodeling
Calcif Tissue Int 56 (Suppl 1), 5-7

PFEILSCHIFTER, J., O.WOLF, A. NAUMANN, H.W. MINNE, G.R. MUNDY,
R. ZIEGLER (1990)

Chemotatic response of osteoblast-like cells to transforming growth factor beta
J Bone Miner Res 5, 825-883

RASMUSSEN, H. and H.F. DeLUCA (1963)

Calcium homeostasis
Ergeb Physiol 53, 107-173

RASMUSSEN, H., P. BORDIER, P. MARIE, L. AUQUIER, J.B. EISINGER, D. KUNTZ,
F. CAULIN, B. ARGEMI, J. GUERIS, A. JULIEN (1980)

Effect of combined therapy with phosphate and calcitonin on bone volume in
osteoporosis

Metab Bone Dis Rel Res 2, 107

REICHEL, H., H.P. KOEFFLER, A.W. NORMANN (1989)

The role of Vitamin D endocrine system in health and disease

N Engl J Med 320, 980-991

REDDY, G.S. and K.T. TSERNG (1989)

Calcitroic acid, end product of renal metabolism of 1,25-dihydroxyvitaminD₃
through C-24 oxidation pathway

Biochem 28, 1763-1769

REVELL, P.A. (1986)

Normal bone

In: Pathol of bone

Springer, Berlin-Heidelberg, New York, 1-32

RIGGS, B.L. and L.J. MELTON (1983)

Evidence for two distinct syndroms of involutional osteoporosis

Am J Med 75, 899-901

RIGGS, B.L., H.W. WAHNER, L.J. 3rd MELTON, L.S. RICHELSON, H.L. JUDD,
K.P. OFFORD (1986)

Postmenopausale osteoporosis

J Clin Invest May 77, 1487-91

RINGE, J.D. (1985)

Pathogenese und Diagnostik der Osteoporose

Akt Endokr Stoffw 6, 176-180

RINGE, J.D. (1987)

Clinical evaluation of salmon calcitonin in bone pain

Osteoporos Int 47, 1262-1264

RODAN, A. and T.J. MARTIN (1981)

Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption- a hypothesis
Calcif Tissue Int 33, 349-351

SCHENK, R.K., A.L. OHLA, W. HERMANN (1984)

Preparation of calcified tissues for light microscopy
In: Meth of calcif tissue Prep (Ed.: G.R. Dickson),
Elsevier Science Publishers B.V.
Amsterdam–New York–Oxford, 1-56

SHIMURA, F., M. WATANABE, J. SHIMURA, N. HOSOYA (1983)

Effect of pyridoxal 5'-phosphate on the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor
system
J Nutr Sci Vitaminol 29, 533-44

SHINKI, T., C.H. HIN, A. NISHIMURA, Y. NAGAI, Y. OHYAMA, M. NOSHIRO, K. OKUDA,
T. SUDA (1992)

Parathyroid hormon inhibits 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase mRNA
expression stimulated by 1 α,25 dihydroxyvitamin D₃ in rat kidney but not in
intestine
J Biol Chem 267, 13757-13762

SILVER, W. (1996)

The Vitamin D and bone
Pharmacol Rev 32, 47-80

STERN, P.H. (1997)

1,25-Dihydroxyvitamin D₃ interactions with local factors in bone remodeling
In: Vitamin D (Ed.: D. Feldman, F.H. Glörioux, J.W. Pike),
San Diego, CA Academic 22, 341-352

STUMPF, W.E., M. SAR, H.F. DeLUCA (1981)

Sites of action of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ identified by thaw-mount autoradiography
In: Hormonal Control of Calcium Metabolism (Ed.: D.V. Chon, R.V. Talmage,
J.L. Matthews),
Amsterdam Excerpta Med 222–229

- SUDA, T., N.TAKAHASHI, J. MARTIN (1992 a)
Modulation of osteoclast differentiation
Endocr Rev 13, 66-80
- SUDA, T., N. TAKAHASHI, E. ABE (1992 b)
Role of Vitamin D in bone resorption
J Cell Biochem 49, 53-58
- SUDA, T., N. UDAGAWA, N. TAKAHASHI (1996)
Cells of bone: osteoclast generation
In: Principles of bone biology (Eds.: J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, G.A. Rodan),
Academic Press, San Diego 87-102
- TANAKA, H., E. ABE, C. MIYAURA, T. KURIBAYASHI, K. KONNO, Y. NISHII,
T. SUDA (1982)
1- α -dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukemia cell line (HL-60). The
presence of a cytosol receptor and induction of differentiation
Biochem J 204, 713–719
- THAKKER, R.V., L.J. FRAHER, S. ADAMI, R. KARMALI, J.L. O'RIORDAN (1986)
Circulating concentrations of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ in patients with primary
hyperparathyroidism
Bone Miner Res 1, 137–142
- TILYARD, M.W. (1993)
Treatment of postmenopausal osteoporosis with 1,25-dihydroxyvitamin D₃
Osteoporos Int Suppl 1, 194-195
- WASSERMANN, R.H. and C.S. FULLMER (1995)
Vitamin D and intestinal calcium transport: facts, speculations and hypothesis
J Nut 125, 1971-1979
- WRONSKI, T.J., P.L. LOWRY, C.C. WALSH, L.A. IGNASZEWSKI (1985)
Skeletal alterations in ovariectomized rats
Calcif Tissue Int 37, 324-328

WRONSKI, T.J., C.C. WALSH, L.A. IGNASZEWSKI (1986)

Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats

Bone 7, 119-123

WRONSKI, T.J., M. CINTRON, L.M. DANN (1988)

Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats

Calcif Tissue Int 43, 179-183

WRONSKI, T.J., L.M. DANN, S.L. HORNER (1989)

Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats

Bone 10, 295-301

YASUMURA, S., J.F. ALOIA, C.M. GUNDBERG, J. YEH, A.N. VASWANI, K. YUEN, A.F. LOMONTE, K.J. ELLIS, S.H. CHON (1987)

Serum osteocalcin and total body calcium in normal pre- and postmenopausal women and postmenopausal osteoporotic patients

J Clin Endocrinol Metab 64, 681-685

ZAIDI, M. (1990)

Calcium receptors on eucaryotic cells with special references to the osteoclast

Biosci Rep 10, 493-507

ZIEGLER, R. (1991)

Fluoride therapy of osteoporosis

Ther Umsch Feb 48 (2), 84-90

ZIEROLD, C., H.M. DARWISH, H.F. DeLUCA (1994)

Identification of a vitamin D-response element in the rat calcidiol (25-hydroxyvitamin D₃) 24-hydroxylase gene

Proc Natl Acad Sci USA 91, 900-902

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Nägele
Vorname:	Katrin, Susanne
Geburtsdatum:	22.12.1970
Geburtsort:	Stuttgart
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Heiner Nägele und Ursula Nägele, geb. Rothacker

Schulbildung

1977-1981	Vogelsang-Grundschule, Stuttgart
1981-1987	Schloßrealschule für Mädchen, Stuttgart
1987-1990	Wirtschaftsgymnasium West, Stuttgart
Juni 1990	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

1990-1994	Studium an der PH Ludwigsburg
11.11.1994	1. Staatsexamen für das Lehramt an Grund und Hauptschulen in Baden-Württemberg
Januar-Mai 1994	Tierärztliches Praktikum in der Schwarzwaldtierklinik, Neulach
Juni-September 1994	Auslandsaufenthalt in Lateinamerika
Nov 1994 - Dez 2001	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Seit April 2002	Promotion am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung an der Ludwigs-Maximilians-Universität München

10 Danksagung

Für die Überlassung des Themas und für seine hervorragende Betreuung und sein immer offenes geduldiges Ohr gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. R.G. Erben. Bei Prof. Dr. H.-J. Gabius bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung sowie die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Dr. Dr. R.G. Erben. Ohne die Geduld und ständige Hilfsbereitschaft von Frau Karin Begsteiger und Frau Siglinde Lutz wäre die zügige Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen. Dank gilt auch Frau Dr. Karin Weber. Ein besonderer Dank gilt Frau Claudia Bergow die nicht nur durch Kompetenz und Geduld sondern auch durch viel Kreativität und Witz das Gelingen dieser Arbeit mit beeinflusst hat.

Bei allen Mitdoktoranden möchte ich mich ganz herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Atmosphäre bedanken.

Danken möchte ich auch dem Tierpflegerpersonal, besonders Frau Opitz, für die Pflege und Hilfe bei der Betreuung der Ratten.

Meinem Freund Jakob danke ich ganz herzlich für seine Geduld,

Bei Herrn Rainer Nägele, Frau Carmen Knebel und Frau Nicola Strohmaier möchte ich mich für die vielen Ohren und die tatkräftige Unterstützung bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Familie Werth.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir dies alles ermöglichte und eine große Unterstützung war.