

Modulation der Skelettwirkung von Calcitriol durch Applikationsroute und durch Parathormon

Martin Philipp Herber

**Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand:
Prof. Dr. H.-J. Gabius**

**Angefertigt unter der Leitung von
Priv.-Doz. Dr. Dr. R.G. Erben**

**Modulation der Skelettwirkung von Calcitriol durch
Applikationsroute und durch Parathormon**

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

**Von
Martin Philipp Herber
aus München**

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. R.G. Erben
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. R. Schulz

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Vitamin D	3
2.1.1	Struktur, Synthese, Transport und Abbau von Vitamin D.....	3
2.1.2	Regulation der 1,25(OH) ₂ D ₃ -Biosynthese.....	6
2.1.3	Der Vitamin-D-Rezeptor und Genomische Wirkungen des Vitamin-D-Hormons.....	7
2.2	Die Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ auf die Synthese und Sekretion von Parathormon	8
2.3	Physiologische Funktionen des Vitamin-D-Hormons	12
2.3.1	Kalzämische Effekte von 1,25(OH) ₂ D ₃	12
2.3.1.1	Funktionen des Vitamin-D-Hormons im Darm.....	13
2.3.1.2	Funktionen von 1,25(OH) ₂ D ₃ in der Niere.....	14
2.3.1.3	Vitamin-D-Effekte am Knochen.....	15
2.3.1.4	Nicht-kalzämische Vitamin-D-Wirkungen.....	16
2.4	Pharmakologische Effekte von Vitamin D	17
2.4.1	Vitamin-D-Effekte am Tiermodell der Ratte.....	17
2.4.2	Osteoporose.....	19
2.4.3	Rachitis und Osteomalazie.....	20
2.4.4	Psoriasis.....	21
2.4.5	Der Einfluss von Vitamin-D-Hormon auf das Immunsystem.....	21
2.4.6	Antiproliferative Effekte von Vitamin D.....	22
2.4.7	Die Toxizität von Vitamin D.....	24

3.	MATERIAL UND METHODEN	25
3.1	Tierversuche	25
3.1.1	Versuch 1: Die Skelettwirkung von Calcitriol in Abhängigkeit von der Applikationsform	25
3.1.2	Versuch 2: Die Skelettwirkung von Calcitriol an parathyreoidektomierten Ratten	27
3.1.2.1	Parathyreoidektomie.....	27
3.1.2.2	Implantation der Pumpen	29
3.1.2.3	Fütterung	29
3.1.3	Vorexperiment zur Bestimmung einer physiologischen PTH Substitution	30
3.2	Knochenmineraldichte-Messung mittels peripherer quantitativer Computer-Tomographie	31
3.2.1	Einleitung	31
3.2.2	Messprinzip	31
3.2.3	Messung	31
3.2.4	Auswertung der Messung.....	32
3.3	Histologie und Histomorphometrie	33
3.3.1	Herstellung der histologischen Präparate.....	33
3.3.1.1	Präparation und Fixierung.....	33
3.3.1.2	Infiltration und Einbettung.....	33
3.3.1.3	Schneiden und Aufziehen der Schnitte	33
3.3.1.4	Entplasten und Färben.....	34
3.3.2	Fluorochrom - Markierungen	34
3.3.2.1	Calcein - Markierung	34
3.3.2.2	Präparate.....	35
3.3.3	Histomorphometrische Messungen	35
3.3.3.1	Statische Parameter	35
3.3.3.2	Dynamische Parameter.....	36

3.4	Biochemische Analyseverfahren	37
3.4.1	Serumanalyse	37
3.4.2	Elektrolytbestimmung	37
3.4.3	Urinanalyse.....	37
3.4.3.1	Elektrolyte und Kreatinin	37
3.4.3.2	Deoxypyridinolin	37
3.4.3.3	PTH Messung mit ELISA	38
3.4.3.4	PTH Messung mit IRMA	38
3.4.4	Bestimmung von Gesamtkalzium im Serum.....	38
3.5	Statistik	39
4.	ERGEBNISSE	40
4.1	Versuch 1: Die Skelettwirkung von Calcitriol in Abhängigkeit von der Applikationsform	40
4.1.1	Histomorphometrische Messungen an der proximalen Tibiametaphyse und dem ersten Lendenwirbel.....	41
4.1.1.1	Statische histomorphometrische Messungen an der sekundären Spongiosa der proximalen Tibiametaphyse	41
4.1.1.2	Statische histomorphometrische Messungen an der sekundären Spongiosa des ersten Lendenwirbelkörpers	42
4.1.1.3	Dynamische histomorphometrische Parameter in der sekundären Spongiosa der proximalen Tibiametaphyse	43
4.1.1.4	Dynamische histomorphometrische Parameter in der sekundären Spongiosa des ersten Lendenwirbelkörpers	44
4.1.2	Knochenmineraldichte-Messung mittels peripherer quantitativer Computer Tomographie (pQCT) an der linken Tibia und dem vierten Lendenwirbelkörper im Versuch 1	45
4.1.2.1	Knochenmineraldichte-Messungen an der linken Tibia.....	45
4.1.2.2	Knochenmineraldichte-Messungen am vierten Lendenwirbelkörper	47
4.1.3	Serum- und Urinparameter zur Analyse von Veränderungen im Stoffwechsel durch die Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	49
4.1.3.1	Serumparameter im Versuch 1	49
4.1.3.2	Urinparameter im Versuch 1	50

4.2	Versuch 2: Die Skelettwirkung von Calcitriol an parathyreoidektomierten und PTH-substituierten Ratten	51
4.2.1	Histomorphometrische Messungen an der proximalen Tibiametaphyse und dem ersten Lendenwirbelkörper	52
4.2.1.1	Statische histomorphometrische Messungen an der sekundären Spongiosa der proximalen Tibiametaphyse	52
4.2.1.2	Statische histomorphometrische Messungen an der sekundären Spongiosa des ersten Lendenwirbelkörpers	53
4.2.1.3	Dynamische histomorphometrische Parameter in der sekundären Spongiosa der proximalen Tibiametaphyse	54
4.2.1.4	Dynamische histomorphometrische Parameter in der sekundären Spongiosa des ersten Lendenwirbelkörpers	55
4.2.2	Knochenmineraldichte-Messungen mittels peripherer quantitativer Computer Tomographie (pQCT) an der linken Tibia und dem vierten Lendenwirbelkörper im Versuch 2.....	56
4.2.2.1	Knochenmineraldichte-Messungen an der linken Tibia.....	56
4.2.2.2	Knochenmineraldichte-Messungen am vierten Lendenwirbelkörper	57
4.2.3	Serum- und Urinparameter zur Analyse von Veränderungen im Stoffwechsel durch den veränderten PTH-Status und durch die Verfütterung von 1,25(OH) ₂ D ₃ im Versuch 2.....	59
4.2.3.1	Serumparameter im Versuch 2	59
4.2.3.2	Urinparameter im Versuch 2	60
5.	DISKUSSION	63
5.1	Die Skelettwirkung von Calcitriol in Anhängigkeit von der Applikationsform	63
5.1.1	Vergleich der an proximaler Tibiametaphyse und ersten Lendenwirbelkörper histomorphometrisch erhobenen Befunde im Versuch 1	63
5.1.2	Vergleich der Knochenmineraldichte-Messungen an der Tibia und dem vierten Lendenwirbelkörper im Versuch 1.....	65
5.1.3	Vergleich der Serum- und Urinparameter im Versuch 1	66
5.2	Generelle Betrachtung des Versuchsaufbaus im Versuch 2	68
5.2.1	Vergleich der an proximaler Tibiametaphyse und ersten Lendenwirbelkörper histomorphometrisch erhobenen Befunde im Versuch 2	68
5.2.2	Vergleich der Knochenmineraldichte-Messungen an der Tibia und dem vierten Lendenwirbelkörper im Versuch 2.....	69
5.2.3	Vergleich der Serum- und Urinparameter im Versuch 2	70
5.2.4	Epilog	71

6.	ZUSAMMENFASSUNG	72
	SUMMARY.....	74
7.	LITERATURVERZEICHNISS	76
8.	DANKSAGUNG	
9.	LEBENS LAUF	

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Vitamin D wurde in den zwanziger Jahren als antirachitisches Mittel entdeckt. Der Mangel an Vitamin D führt zu Beeinträchtigung der Knochenmineralisierung; bei wachsenden Organismen resultiert daraus die Rachitis, bei Ausgewachsenen die Osteomalazie (DeLuca, 1988). Die Verabreichung von Vitamin D an rachitische Tiere und Menschen führt zu einer verstärkten Mineralisierung des Skeletts (Suda et al., 2003).

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde Vitamin D eine direkte Stimulierung der osteoblastären Knochenformation und der Knochenmineralisation nachgesagt, allerdings herrscht gegenwärtig keine vollständige Klarheit über die Richtigkeit dieser These. Heute wird als bewiesen erachtet, dass Vitamin D, in seiner aktiven Form, dem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, neben Parathormon, die Hauptrolle in der Regulation des in engen Grenzen gehaltenen Kalziumspiegels spielt. Darm, Knochen und die Nieren stellen die drei wichtigsten Organsysteme der Kalziumhomöostase dar. Der Einfluss von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf alle drei Organsysteme bewirkt einen gesteigerten Serumkalziumspiegel, hieraus wiederum resultiert eine vermehrte Knochenmineralisierung. Folglich kann Vitamin D ein indirekter Effekt auf die Mineralisierung am Knochen zugesprochen werden (Suda et al., 2003). In wie weit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ direkt an der Mineralisation des Knochens beteiligt ist, wird allerdings nach wie vor kontrovers diskutiert. Für erwiesen gilt dagegen die Feststellung, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine knochenprotektive Wirkung, einen antiresorptiven Effekt auf den Knochen ausübt. Ob es sich hierbei um einen eigenständigen molekularen Mechanismus von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ handelt, oder ob dieser Effekt allein auf die Unterdrückung von Parathormon (PTH) durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zurückgeführt werden kann, ist unter anderem Bestandteil dieser Studie.

Die Applikation von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in physiologischen Dosen bewirkt eine Suppression der durch PTH induzierten Knochenresorption in vivo (Suda et al., 2003). Dabei unterdrückt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ indirekt über die Erhöhung des Kalziumspiegels die PTH-Sekretion in den Nebenschilddrüsen (Silver et al., 2002; Brown et al., 1999). Es wird auch ein direkter Effekt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ am Knochen diskutiert, hier soll $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Expression von Resorptionsmediatoren unterdrücken. Mit Hilfe parathyreoidektomierter Ratten, so genannter PTX-Tiere, denen über eine osmotische Minipumpe PTH substituiert wird und die damit unabhängig der Effekte von Calcitriol einen physiologischen PTH-Blutspiegel aufweisen, lassen sich weitere Erkenntnisse im komplexen Zusammenspiel von Calcitriol und PTH gewinnen. Suda et al. (2003) beschreibt Untersuchungen über die Expression von Genen, die zur Knochenresorption beitragen. Sudas Team vertritt dabei die Meinung, dass durch die

tägliche Administration einer physiologischen Calcitriol-Dosis die Knochenresorption durch die Unterdrückung der Expression von Resorptionsmediatoren verhindern werden kann.

In der vorliegenden Studie sollen die Auswirkungen unterschiedlicher Applikationsarten von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf den Knochen durch die histomorphometrische Auswertung von unentkalkten Knochen, der Knochenmineraldichte-Messung mittels peripherer Computer Tomographie und der Analyse gewonnener Serum- und Urinparameter untersucht werden. Erwünschtes Ziel der Studie sind neue Erkenntnisse, ob die Applikationsform von Calcitriol einen wichtigen Einfluss auf die generierten Effekte ausübt. Im zweiten Versuch sollen nun, basierend auf den erlangten Erkenntnissen über die Applikationsform, Einblicke in die Interaktion Calcitriol/PTH gewonnen werden. Mit Hilfe des PTX-Ratten-Modells sollen Antworten auf die Fragen nach einem direkten oder indirekten antiresorptiven Effekt von Calcitriol am Knochen gefunden werden. Ziel ist es hier, mögliche Unterschiede direkt am Knochen anhand der oben erwähnten Analyseverfahren zu dokumentieren.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 VITAMIN D

2.1.1 Struktur, Synthese, Transport und Abbau von Vitamin D

Vitamin D oder Calciferol ist nicht nur ein Vitamin, vielmehr umfasst der Begriff eine Gruppe von Substanzen, die ihrer chemischen Struktur nach Steroide sind. Die biologisch aktiven Metaboliten von Vitamin D werden auf Grund ihrer Eigenschaften (z.B. die Fähigkeit des Organismus zur Eigensynthese, die endokrine Kontrolle derselben und die rezeptorvermittelten Effekte) heute als Hormone angesehen (Vitamin-D-Hormon oder $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$).

Vitamin D_3 (Cholecalciferol), selbst biologisch nicht aktiv, wird entweder über die Nahrung aufgenommen und im Dünndarm resorbiert oder in der Epidermis selber synthetisiert. Ausgehend von Cholesterol, entsteht in den Leberzellen durch das Enzym Cholesteroldehydrogenase, 7-Dehydrocholesterol (7-DHC). Dieses stellt das Hauptreservoir für die Vitamin-D-Eigensynthese des Körpers dar (Esvelt et al., 1979). 7-DHC gelangt über den Blutweg – wegen seiner hydrophoben Eigenschaften vorwiegend an Transportproteine gebunden – zu den Keratinozyten der Haut. Dort findet es sich in allen Schichten der Epidermis und Dermis; die höchsten Konzentrationen von 7-DHC kommen im Stratum Basale und im Stratum Spinosum vor. Unter allen Schichten der Haut besitzen diese die größte Fähigkeit zur Synthese von Cholecalciferol (Bender, 1990). Unter Einfluss von UV-Strahlen der Wellenlänge 290-315 nm (Hollick, 1995) kommt es zu einer Ringöffnung am B-Ring des Sterangerüsts. Hierbei stellt UVB Strahlung mit 296.5 nm die optimale Wellenlänge zur Umwandlung in Provitamin D dar. Bei einer Wellenlänge von 310 nm wird nur 1 Prozent des Ertrags als bei 296.5 nm umgewandelt (Bender, 1990). Nach der photochemischen Isomerisierung von 7-DHC zu Provitamin D_3 verbleibt dieses, in der Doppellipidmembran eingeschlossen, in dem thermodynamisch instabilen s-cis Zustand (Hollick, 1995). Es folgt die langsame, temperaturabhängige Isomerisierung zum stabilen Vitamin D_3 (Cholecalciferol) durch die Verschiebung einer Doppelbindung im Molekül (Bender, 1990). Hierbei handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion: Cholecalciferol, an Plasma-Vitamin-D Binding Protein (DBP) gebunden, verlässt die Epidermalzelle und begünstigt damit die weitere intrazelluläre Synthese.

Eine übermäßige Exposition der Haut gegenüber UVB-Strahlung bewirkt keine wesentlich erhöhte Plasma-Konzentration von Vitamin D_3 . Die Konzentration bleibt mit 100-200 nmol/l

stets unter der toxischen Grenze von ca. 400 nmol/l. Grund ist eine reversible photochemische Umwandlung von 7-Dehydrocholesterol. Der durch Licht katalysierte Schluss des B-Ringes am Molekül erzeugt entweder 7-DHC oder Lumisterol (die 19-Methyl-Gruppe ist hier gegenseitig angeordnet). Zusätzlich können das Provitamin D zu dem biologisch inaktiven Tachysterol und das photosensitive Cholecalciferol in das 5,6-trans-Cholecalciferol sowie in biologisch inaktive Suprasterole photo-isomerisiert werden (Bender, 1990).

Eine Ganzkörperexposition von unter 18 mJ/cm² hat keinen erkennbaren Einfluss auf die Cholecalciferol-Plasma-Konzentration. Dadurch ist in gemäßigten Regionen (über und unter dem nördlich bzw. südlichen 40. Breitengrades), in denen im Winter die Sonneneinstrahlung unter dieser Grenze liegt, eine bezeichnende kutane Synthese von Vitamin D₃ unwahrscheinlich. Hier kommt es zu deutlichen, saisonal bedingten Schwankungen der Cholecalciferol-Plasma Konzentration (Matsouka et al., 1989).

Da Vitamin D₃ von sich aus noch über keine biologische Aktivität verfügt, gelangt es gebunden an Transportproteine zur Leber, wo der erste Schritt der Aktivierung stattfindet. Wie andere Steroidhormone bindet Vitamin D₃ an spezifische Proteine (Vitamin D Binding Protein, DBP); diese haben eine hohe Affinität gegenüber dem Metaboliten und zirkulieren in großer Menge im Plasma. Es wird angenommen, dass 99 Prozent der Vitamin-D-Metaboliten an DBP gebunden sind (Bouillon und Van Baelen, 1981). Bei den Vitamin-D-Bindungsproteinen handelt es sich um eine Gruppe mehrerer sehr ähnlicher Polypeptide (α -Globuline, ca. 58 kDa), sie liegen in großem Überschuss frei im Plasma vor und binden aufgrund ihrer hohen Affinität freies Vitamin D und dessen Metaboliten fast vollständig. Ihre Funktion als Kurzzeitspeicher für Vitamin D (als Langzeitspeicher dient bei Säugetieren das Fettgewebe, bei Fischen die Leber) wird diskutiert (Haddad, 1987). Es wird vermutet, dass DBP zum hormonalen Typus der Transportproteine zählen, die eine ständige Zufuhr von freien Metaboliten gewährleisten. Sie penetrieren die Zielzellen nicht zusammen mit ihren Liganden, begünstigen aber deren zellulären Eintritt (Bouillon, 1981).

In den Hepatozyten findet nun die erste Stufe der Vitamin D₃-Aktivierung statt; Cholecalciferol wird in der Position 25 zu 25-Hydroxycholecalciferol (25(OH)D₃) hydroxyliert. Dieser Vorgang wird von zwei separaten Cytochrom-P450-abhängigen Oxidasen katalysiert. Im Tierexperiment konnte bei Ratten und Hasen eine mitochondriale und eine mikrosomale Form der Calciferol- 25-Hydroxylase festgestellt werden (Helen, 1992 and Dahlback, 1988). Beim Menschen ist bislang eine mitochondriale Form des Enzyms beschrieben worden. Diese

Hydroxylase kann neben Cholecalciferol und Ergocalciferol eine ganze Reihe von C-27 Körpern hydroxylieren, katalysiert aber die 25-Hydroxylierung von Cholecalciferol hiervon am schnellsten. Die mikrosomale Hydroxylase besitzt daneben die Fähigkeit, auch 1α -Hydroxycholecalciferol (Hydroxycalcio) an Position 25 zu hydroxylieren (Bender, 1990). Offenbar hat Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) einen hemmenden Einfluss auf die Enzymaktivität der Calciferol-25-Hydroxylase. Es ist allerdings noch unklar ob diese Hemmung eine wichtige physiologische Rolle spielt. Hauptsächlich wird die Enzymaktivität über die Aufnahmemenge von Cholecalciferol in die Leberzellen kontrolliert (Bell et al., 1984).

Der zentrale Vitamin-D-Regulationsmechanismus, der eine Überschussproduktion von biologisch aktivem Vitamin D verhindert, greift primär in der Niere. Hier erfolgt die biologische Aktivierung von $25(\text{OH})\text{D}_3$ durch eine 1α -Hydroxylierung zu $1\alpha,25$ -Dihydroxycholecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder Calcitriol).

Das beteiligte Enzym, die Calcidiol- 1α -Hydroxylase ist ebenfalls eine Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase und soll neben der Niere auch noch in anderen Organen vorhanden sein (Plazenta, Knochenzellen, Milchdrüsen und Keratinozyten). Ob sie dort allerdings eine signifikante physiologische Rolle erfährt, ist noch nicht nachgewiesen. Jedenfalls deckt eine extra-renale Synthese nicht ausreichend den Bedarf an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Bender, 1990). Die Syntheserate der 1α -Hydroxylase ist gleichzeitig der Steuerungsfaktor für die Hydroxylierung von $25(\text{OH})\text{D}_3$. Sie unterliegt der Regulation durch Parathormon (PTH), Serum-Phosphat und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ selbst (Henry, 1979). Die $1,25$ -Dihydroxycholecalciferol-Synthese ist somit streng an die Niere gebunden, weshalb ein Funktionsverlust oder Gewebeuntergang der Niere - vor allem im Bereich des proximalen Tubulus - häufig mit Störungen des Vitamin-D-Haushaltes und allen daraus resultierenden Folgen verbunden ist (Hollick et al., 1972).

Liegt das Vitamin-D-Hormon $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Überschuss vor, entsteht in der Niere aus $25(\text{OH})\text{D}_3$ vermehrt der Metabolit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, der ebenfalls durch eine Cytochrom-P450-abhängige 24-Hydroxylase katalysiert wird (Jones et al., 1987).

Die Enzymaktivitäten von Calcidiol- 1α -Hydroxylase und 24-Hydroxylase in der Niere unterliegen damit der Regulation in gegenläufige Richtungen. Eine verminderte Anforderung von Calcitriol hat eine vermehrte Synthese von 24-Hydroxycholecalciferol zur Folge; bei Hypocalcämie oder durch den Einfluss von Parathormon dagegen wird die 1α -Hydroxylierung deutlich gesteigert (Juan und DeLuca, 1977). Die Metabolisierung von $25(\text{OH})\text{D}_3$ zu $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gilt außerdem als wichtigste Deaktivierung von $25(\text{OH})\text{D}_3$, da

24,25(OH)₂D₃ gegenüber 1,25(OH)₂D₃ eine ca. 10 000-fach geringere biologische Aktivität besitzt (Norman et al., 2002).

Die 24-Hydroxylierung von 1,25(OH)₂D₃ ist - wie vermutet wird - auch ein wichtiger Schritt bei der Inaktivierung von 1,25(OH)₂D₃ in den Zielzellen. Die Umwandlung von 1,25(OH)₂D₃ zu 1,24,25(OH)₃D₃ (Trihydroxycholecalciferol) findet nicht nur in den Nieren, sondern auch in anderen Zielgeweben des Vitamin-D-Hormons statt. Seit Jahren geht die Forschung davon aus, dass die 1,25(OH)₂D₃-Konzentration, unabhängig vom Kalzium- und Phosphorspiegel im Individuum, einen direkten Stimulus auf die Aktivität der 24-Hydroxylase ausübt (Tanaka, 1974; Kumar, 1984).

So ist die 24-Hydroxylierung ein entscheidender Schritt im Metabolismus von 1,25(OH)₂D₃, allerdings liegen bis heute nur wenige quantitative Ergebnisse über die zentrale Bedeutung von diesem vor.

Der Großteil an Vitamin D wird über die Galle ausgeschieden. Nur 5 Prozent sind wasserlösliche Metaboliten und werden über den Urin ausgeschieden. In der Galle stellen glucuronidierte Konjugate und polare Metaboliten mit ca. 98 Prozent den Hauptteil der Vitamin-D-Metaboliten dar. Der Anteil an Cholecalciferol, Calcidiol und Calcitriol beträgt zwischen 2-3 Prozent. Wahrscheinlich sind alle Vitamin-D-Zielgewebe in der Lage, Calcitriol zu katabolisieren. Ausgehend von der bereits erwähnten 24-Hydroxylierung zu Calcitetrol folgt eine Oxidation zu einem 24-oxo-Derivat. Nach erneuter 23-Hydroxylierung und weiterer Oxidation entsteht als Endprodukt des Vitamin-D-Stoffwechsels die Calcitronsäure, die in der Leber in die Gallenflüssigkeit sezerniert wird (Reddy und Tserng, 1989).

2.1.2 Regulation der 1,25(OH)₂D₃-Biosynthese

Die wichtigste physiologische Funktion von Calcitriol ist die Regulation der Kalzium-Homöostase: Der Vitamin-D-Metabolismus unterliegt daher der Regulation des Kalzium-Gleichgewichts im Organismus.

Hauptsächlich wird die Regulation der 1,25(OH)₂D₃-Bereitstellung über die Enzymaktivitäten von 1- und 24-Hydroxylase bestimmt. Im Allgemeinen erniedrigen Faktoren, die eine der beiden Hydroxylasen stimulieren gleichzeitig die andere. Die Verfügbarkeit von Calcitriol selber ist der Hauptfaktor dafür, dass eine Neusynthese von 1,25(OH)₂D₃ stattfindet. In Vitamin-D-defizienten Tieren mit niedrigem Plasma-Calcitriol-Spiegel ist eine maximale Enzymaktivität der 1-Hydroxylase in der Niere zu erkennen, während nur geringe bis fehlende Aktivität der 24-Hydroxylase nachweisbar ist (Bender, 1990). Soweit heute bekannt,

stellt PTH die wichtigste Einflussgröße für die Stimulation der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Biosynthese dar. Ein Absinken des Blutkalziumspiegels bewirkt eine gesteigerte Sekretion von PTH, welches die Aktivität der 1-Hydroxylase stimuliert und gleichzeitig auf die 24-Hydroxylase eine hemmende Wirkung ausübt. Dabei handelt es sich jedoch nicht um eine *de novo* Synthese von 1-Hydroxylase. Vielmehr wird angenommen, dass PTH über cAMP eine Phosphorylierung intrazellulärer Proteine bewirkt. Dieser molekulare Mechanismus ist jedoch noch nicht komplett geklärt (Ikeda et al., 1987).

Einen weiteren Einflussfaktor auf die Enzymaktivität der 1-Hydroxylase stellt Calcitonin dar: Versuche *in vivo* haben gezeigt, dass es die 1-Hydroxylierung von $25(\text{OH})\text{D}_3$ in der Niere stimuliert. Auch der Plasmaphosphatspiegel übt eine Wirkung auf die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese aus: Hypophosphatämie scheint ebenso wie PTH die 1-Hydroxylase zu stimulieren und die 24-Hydroxylase zu hemmen (Baxter und DeLuca, 1976; Wu et al., 1996). Calcitriol dagegen bewirkt vermutlich eine vermehrte Synthese der 24-Hydroxylase (Zierold et al., 1994).

2.1.3 Der Vitamin-D-Rezeptor und genomische Wirkungen des Vitamin-D-Hormons

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist, wie andere Steroidhormone auch, ein lipophiler Ligand, der den Zellkern direkt penetrieren kann und dort an einen DNA-assoziierten Rezeptor bindet (Haussler et al., 1988). Der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) befindet sich zusammen mit dem Thyroid-Hormon-Rezeptor (TR) und den Retinoid-Acid-Rezeptoren (RAR) im unbesetzten Zustand direkt im Zellkern und wird innerhalb der Steroidrezeptor-Superfamilie der Subfamilie (Klasse II) der Schilddrüsenhormonrezeptoren zugeordnet. Der VDR ist ein Phospho-Protein, welches nach der Bindung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine weitere Phosphorylierung erfährt (Haussler et al., 1988). Der Rezeptor besitzt zwei funktionelle Domänen: Am N-terminalen Ende bilden zwei „Zinkfinger“ die DNA-Bindungsdomäne (DBD). Diese Region ermöglicht nach der Aktivierung des Rezeptors dessen Bindung an so genannte VDREs (Vitamin D responsive elements). Der C-terminale Bereich des Moleküls umfasst die Hormonbindungsdomäne (Haussler et al., 1988).

Eine typische Eigenschaft der Schilddrüsenhormon-Rezeptorengruppe ist die Fähigkeit mit verwandten Rezeptoren Heterodimere zu bilden. Die Ligandenbindung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit dem VDR fördert den Zusammenschluss mit einem Retinoid-X-Rezeptor (RXR). Gemeinsam bilden beide ein VDR-RXR Heterodimer. Dieses Heterodimer besitzt eine hohe Affinität zu den VDREs, welche in der Promotorregion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -kontrollierten Zielgenen liegen (MacDonnald et al., 1993).

Die zentrale Bedeutung des VDR in den klassischen Zielgeweben (Darm, Niere und Knochen) liegt in der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase im Organismus (Walters, 1992). Der VDR stimuliert den transepithelialen Kalziumtransport durch die Enterozyten sowie die Passage von Kalzium aus den renalen Tubuli in den Blutkreislauf. Des Weiteren spielt er eine entscheidende Rolle bei der durch PTH stimulierten Freisetzung von im Knochen gebundenem Kalzium (DeLuca et al., 1990).

Der Vitamin-A-Metabolit 9-cis Retinolsäure (9-cis RA), ein natürlicher Ligand für RXR, verursacht eine Hemmung der durch das VDR-RXR Heterodimer induzierten Transkription. Denn unter der Präsenz von 9-cis RA kommt es zur Spaltung des VDR-RXR-Komplexes. Diese gegenläufigen Wirkungsweisen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und 9-cis RA scheinen einen tief greifenden Einfluss auf durch Calcitriol induzierte Effekte der Zelldifferenzierung und des Mineralhaushalts auszuüben (Haussler et al., 1995; MacDonald et al., 1994). Die Wirkmechanismen sind allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.

Neben den klassischen Vorkommen von VDR sind in den letzten Jahren weitere Organe und Gewebe bekannt geworden, in denen sich VDR finden lässt. Zu diesen nicht-klassischen VDR-haltigen Geweben zählen hämolymphopoetisches Gewebe, glatte, quergestreifte und Herzmuskulatur, Plazenta, Prostata, Testikel, Nebenschilddrüse und Leber. Auch im Lungengewebe und in differenzierten Zellen der Haut wurden Vitamin-D-Rezeptoren nachgewiesen (Walters, 1992).

2.2 DIE WIRKUNG VON $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ AUF DIE SYNTHESE UND SEKRETION VON PARATHORMON

Der Einfluss von Calcitriol auf die Nebenschilddrüse ist infolge der bedeutenden Rolle beider Hormone in der Kalziumhomöostase und im Knochenstoffwechsel Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Wie bereits erwähnt, hat Calcitriol eine genomische Wirkung auf die Synthese von Parathormon. Unter physiologischen Umständen wird die PTH mRNA-Transkription durch die Bindung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an den VDR im Zellkern der Nebenschilddrüsenzellen unterdrückt (Moe und Drüeke, 2003).

Durch die Ligandenbindung von Calcitriol entsteht ein Heterodimer von VDR mit dem Retinoid-X-Rezeptor. Dieser VDR/RXR-Komplex bindet an den spezifischen Sequenzen der Zielgene und reduziert die Transkriptionsrate für das prä-pro-PTH Gen, welches den ersten Schritt in der PTH Synthese darstellt (Kliwer et al., 1992; Silver et al., 1986). Weiterhin besitzt Calcitriol die Möglichkeit, PTH indirekt über erhöhte Kalziumabsorption im Darm zu

unterdrücken (Delmez und Slatopolsky, 1992). Untersuchungen zeigten, dass der Zytoplasmaspiegel von prä-pro PTH mRNA auch direkt über Kalzium reguliert werden kann: bei einem erhöhten Blutkalziumspiegel ist eine deutliche Abnahme des prä-pro-PTH mRNA-Spiegels erkennbar; ein zu niedriger Kalziumspiegel führt allerdings zu keiner signifikanten Erhöhung des prä-pro-PTH mRNA-Spiegels (Russel et al., 1983).

Parathormon war eines der ersten Peptidhormone, das zum Verständnis der Proteintranslation und -synthese eingehender untersucht worden ist. Dies führte zur Erkenntnis, dass PTH zuerst als ein 115 Aminosäuren (AS) langes Molekül übersetzt wird, das prä-pro-PTH, welches im Endoplasmatischem Retikulum (ER) auf 90 AS gespalten und in den Golgi-Apparat als pro-Form transportiert wird (MacGregor et al., 1973).

Gespeichert wird PTH in Vakuolen; durch verschiedene Sekretionsmechanismen wird Parathormon als 84 Aminosäuren großes Molekül in das Blut abgegeben. Wie in vielen endokrinen Zellen spielt auch bei der PTH-Sekretion cAMP eine zentrale Rolle bei der Verbindung von Signaltransduktion und der sekretorischen Antwort der Zelle. Die Adenylat-Zyklase wird seit den 70-er Jahren hierbei als entscheidendes Element angesehen. Unter Einfluss von β -adrenergen Agonisten (z.B. Epinephrin, Dopamin, Cholera Toxin) kommt es auch in den Zellen der Nebenschilddrüse zu einer vermehrten Ausschüttung von PTH (Watson und Hanley, 1992; Brown et al., 1977). Andere Studien ermittelten Protein-Kinase C als einen Hauptmediator der PTH-Sekretion, die durch einen niedrigen Kalziumspiegel aktiviert wird (Kobayashi, 1988). Neueren Ergebnissen zu Folge geht allen diesen Mechanismen ein transmembraner Kalzium-Rezeptor (CaR) voraus: Dieser G-Proteingekoppelte Sieben-Helix-Rezeptor bewirkt - durch hohes Serum-Kalzium aktiviert - in Verbindung mit den vorher genannten Mechanismen eine Reduktion der endokrinen PTH-Sekretion. In einem hypokalzämischen Zustand dagegen erfolgt keine Rezeptorantwort; PTH wird abgegeben. Heute herrscht allgemein die These vor, dass die Nebenschilddrüsenzelle auf eine kontinuierliche Synthese und Sekretion von PTH programmiert ist und der CaR in diesem System als „Bremse“ fungiert (Silver et al., 2002; Brown et al., 1999).

Frühere Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass sich die biologische Aktivität von PTH auf die ersten 34 Aminosäuren beschränkt und die AS 35-84 am C-terminalem Ende des Moleküls eine Verlängerung der Halbwertszeit im Serum gewährleisten (Martin, 1978). Gegenwärtig diskutiert die Forschung zudem die biologische Aktivität von PTH-Molekül-Bruchstücken am Knochen, deren Wirkung sich von der traditionell beschriebenen PTH(1-84) Wirkung vermutlich unterscheidet (Goodman et al., 2002; Nguyen-Yamamoto et al., 2001).

Auch hier ist weitere Forschungsarbeit bis zur vollständigen Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen von Nöten.

Die Hauptaufgabe von PTH im Organismus ist die Aufrechterhaltung des in engen Grenzen verlaufenden physiologischen Plasma-Kalzium-Spiegels, da die Kalziumkonzentration eine Lebensnotwendigkeit in Bezug auf die Muskelkontraktion, als second messenger in hormonsensitiven Zellen und in der Übermittlung neuraler Signale darstellt. Parathormon übt auf die Niere und den Knochen folgende Wirkkraft aus: In der Niere, hauptsächlich in den Epithelzellen der Tubuli, hemmt PTH die Reabsorption von Phosphor und bewirkt die vermehrte Rückresorption von Kalzium. Gleichzeitig nimmt PTH durch Stimulation der renalen 1-Hydroxylase Einfluss auf die Calcitriol-Synthese. Am Knochen bewirkt PTH einen gesteigerten Knochenumbau. Hierfür werden zuerst Osteoklasten zu verstärkter Knochenresorption angeregt, im Anschluss erfolgt eine PTH-medierte Erhöhung der Knochenformation (Bilezikian, 1990).

Übergeordnetes Ziel ist es, die für alle Säugetierzellen so bedeutende Kalziumhomöostase aufrecht zu erhalten. Die Nebenschilddrüse fungiert hierbei als wichtigster Mediator: sie kann PTH in großer Menge, selbst bei abrupten Kalziumabfall, schnell ausstoßen und im Gegenzug bei einem erhöhten Kalziumspiegel die Sekretion zügig drosseln.

Treten in diesem Gleichgewicht der negativen Rückkopplungsmechanismen allerdings pathologische Prozesse in den Vordergrund, entstehen ernste, den gesamten Organismus betreffende Stoffwechselstörungen.

Der Hypoparathyreoidismus bezeichnet eine fehlende oder pathologisch latent niedrige Sekretion von PTH. Ein Hypoparathyreoidismus wird entweder iatrogen durch die Parathyreoidektomie (das chirurgische Entfernen der Nebenschilddrüsen) induziert oder entsteht durch idiopathische Ursachen hauptsächlich autoimmuner Natur. In seltenen Fällen kann es auch zu einer Schädigung der Nebenschilddrüsenzellen durch Metastasen aus anderen Organen kommen.

Durch den Ausfall von Parathormon entsteht eine Hypokalzämie mit Tetanie, eine Hyperphosphatämie verbunden mit einer starken Hypokalzurie und Hypophosphaturie. Als Spätsymptome wurden trophische Störungen besonders an Haaren, Haut und Nägeln und metastatische Verkalkungen in Lunge, Linsen und basalen Hirnganglien beschrieben (Psyhyrembel, 1990). Cohen et al. (1996) beschreibt in einer klinischen Studie am Menschen

das Vorkommen von Anfällen, Fehlbildungen der Gesichtszüge und geistige Unterentwicklung als Symptome eines congenitalen Hypoparathyreoidismus. Beim Versuchstier beschränkt sich die Dokumentation hauptsächlich auf den durch die Parathyreoidektomie gewollt erzeugten Hypoparathyreoidismus im Rahmen der Erforschung des Knochenstoffwechsels und endokrinologischer Studien (Finch et al., 1993, 1992).

Der Hyperparathyreoidismus (HPT) ist die zum Hypoparathyreoidismus gegensätzliche pathologische Form: Hier bewirkt eine übermäßige PTH-Sekretion klinische und morphologische Veränderungen im Organismus. Nach den Ursachen wird der HPT in drei Formen unterteilt: der primäre HPT entsteht meist bei Parathyroideaadenom und - seltener - bei malignen Entartungen der Nebenschilddrüse. Der sekundäre HPT entwickelt sich häufig im Zusammenhang mit der chronischen Niereninsuffizienz (CNI) oder einer Vitamin-D-Mangel-Rachitis. Der tertiäre HPT kommt hingegen selten vor und resultiert aus einem sekundären HPT. Dabei bewirkt die regulatorische Überfunktion eine adenomatöse Wucherung (autonomes Adenom) im bereits hyperplastischen Nebenschilddrüsengewebe (Pschyrembel, 1990).

Aus gesamt- und knochenphysiologischer Sicht ist der sekundäre renale Hyperparathyreoidismus von großer Relevanz. Schon im frühen Stadium der CNI führen Abweichungen der PTH-, Kalzium- und Phosphor-Konzentrationen zu pathologischen Erscheinungen. Dabei entstehen symptomatische Knochenerkrankungen und extraskelettale Verkalkungen. Außerdem ist mit einem erhöhtem Sterberisiko zu rechnen (Moe und Drüeke, 2003).

Die zunehmende Unfähigkeit der Niere, Phosphor auszuscheiden bewirkt einen steten Anstieg der PTH-Ausschüttung, um der Hyperphosphatämie entgegenzuwirken. Fällt allerdings die Glomeruläre Filtrationsrate unter 20-25 ml/min, kann PTH die Phosphorausscheidung nicht mehr steigern; eine Hyperphosphatämie ist die Folge (Slatopolsky und Bricker, 1973). Erhöhter Serum-Phosphor-Spiegel und hohe Aufnahme von Phosphor scheinen, neben der Steigerung der PTH-Sekretion, zusätzlich eine Proliferation der Nebenschilddrüsenzellen zu bewirken. Daraus resultiert eine Hyperplasie der Parathyroidea und eine gesteigerte Parathormon Sekretion (Almaden et al., 1998; Slatopolsky et al., 1996). Durch die reduzierte Nierenfunktion ist die 1α -Hydroxylierung von $25(\text{OH})\text{D}_3$ zum biologisch aktiven $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stark eingeschränkt, zusätzlich hemmt die Hyperphosphatämie die enzymatische Aktivität der renalen 1-Hydroxylase. Eine Hemmung der PTH-Synthese durch Calcitriol, wie sie anfangs beschrieben wurde, fällt aus (Moe und Drüeke, 2003); ein *circulus viciosus* hat begonnen.

Am Knochen entsteht oft eine renale Osteodystrophie; durch den hohen PTH-Blutspiegel erfolgt ein äußerst schneller Knochen turnover. Dabei wird ein in der Struktur minderwertiger Knochen gebildet, und eine verstärkte peritrabekuläre Fibrose oder eine Osteitis fibrosa cystica können die Folge sein (Hruska, 2000).

Im Gegensatz dazu wird die Adynamic Bone Disease bei CNI-Patienten mit relativ niedrigem PTH-Spiegel beschrieben (Goodman et al., 1997). Bei dieser Folgeerkrankung findet allenfalls ein geringer Knochen turnover statt, eine peritrabekuläre Fibrose fehlt, und die Anzahl der Osteoblasten und -klasten ist deutlich verringert (Goodman et al., 1997; Sherrard et al., 1993). Die Patienten sind häufig asymptomatisch, haben allerdings ein erhöhtes Risiko für Knochenbrüche und Hypokalzämie, da der undynamische Knochen nicht in der Lage ist, ausreichend Kalzium zur Verfügung zu stellen (Kurz et al., 1994; Coco und Rush, 2000).

Bei der Erforschung des primären Hyperparathyreoidismus wurde eine weitere Eigenschaft des Parathormons entdeckt: es besitzt, verabreicht in pharmakologischen Dosen, eine knochenanabole Wirkung. Die im ersten Moment paradox klingende Eigenschaft wurde in zahlreichen Tierversuchen und Observationsstudien beim Menschen bestätigt (Watson et al., 1995; Reeve et al., 1980). Parathormon ist heute als Medikament in der Osteoporose-Therapie zugelassen. Allerdings sind nach wie vor viele Fragen offen, und ein hoher Forschungsbedarf ist weiterhin gegeben da Langzeitstudien an Ratten bei hoch dosierter hPTH (1-34) Applikation ein erhöhtes Auftreten von osteogenen Sarkomen ergeben haben (Rubin et al., 2002).

2.3 PHYSIOLOGISCHE FUNKTIONEN DES VITAMIN-D-HORMONS

2.3.1 Kalzämische Effekte von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Funktionen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, die unmittelbar den Kalziumstoffwechsel betreffen, werden auch als „kalzämische Effekte“ von Calcitriol bezeichnet. Sie zielen primär darauf ab, die Kalziumhomöostase im Organismus zu gewährleisten sowie im Zusammenspiel mit PTH die Bereitstellung von Kalzium für die Knochenmineralisation aufrecht zu erhalten. Die wichtigsten Organe für die kalzämischen Wirkungen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sind Darm, Niere und Knochen.

2.3.1.1 Funktionen des Vitamin-D-Hormons im Darm

Die Kalziumabsorption im Darm wird nach heutigem Kenntnisstand in drei Schritte eingeteilt. Zuerst wird das Kalzium aus dem Darmlumen über den Mikrovillisaum der Enterozyten in deren Zytoplasma aufgenommen, anschließend in der Zelle an die basolaterale Membran transportiert und dort in das Kapillargebiet der Lamina propria abgegeben (Fullmer et al., 1996).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ übt in allen drei Schritten eine regulatorische Funktion aus, die für die intestinale Kalziumabsorption notwendig ist (Fullmer, 1992; Wasserman et al., 1992). Kalziumionen werden lumenseitig am Bürstensaum entlang des elektrochemischen Gradienten resorbiert. Hier wird eine nicht-genomische Vermittlung der Resorption durch Calcitriol vermutet (Matsumoto et al., 1982; Bikle et al., 1983).

Aktuellen Studien zufolge, bewirkt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in Dünndarmzellen eine über VDR-medierte vermehrte Expression von epithelialen-Kalzium-Kanälen (ECaCs) (Okano, 2004). Diese epithelialen-Kalzium-Kanäle werden ausschließlich in Geweben welche Kalziumionen transportieren exprimiert. Sie vertreten eine neue Familie von Kalzium-Kanälen die zur Superfamilie der *transient receptor potential* (TRP) Kanälen zählt. Man nimmt an, dass diese Kalzium-Kanäle einen wichtigen Faktor im Rahmen der durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kontrollierten aktiven Kalzium-Aufnahme aus dem Darmlumen in das Blut darstellen. Diese hochsensitiven Kalzium-Kanäle konnten bereits in der Niere und im Darm nachgewiesen werden (Hoenderop, 2002).

Bei Vitamin-D-Mangel wird Kalzium zwar auch in die Zelle aufgenommen, verbleibt aber im Mikrovillibereich und bindet dort an Calmodulin. Ein Großteil des Calmodulins wiederum bildet einen Komplex mit Myosin I, einem 110kDa Calmodulin-bindendem-Protein mit ATPase Aktivität und mechanoenzymatischen Fähigkeiten (Kontraktion zusammen mit Aktin) (Mooseker et al., 1991). Die Forschung geht davon aus, dass dieser Komplex eine Schutzfunktion vor übermäßigem Kalzium-Einstrom in die Zelle bewirkt (Fullmer et al., 1996).

Der transepitheliale Transport von Kalzium erfolgt gebunden an Calbindin D9K bei Säugetieren und an Calbindin D28K bei Vögeln in die Nähe der zur Lamina propria hin gelegenen Kalzium-Pumpen. Diese geben Kalzium entgegen dem Konzentrationsgradienten mittels eines energieverbrauchenden Prozesses in die extrazelluläre Flüssigkeit ab. Die Synthesen von Calbindin und der Kalzium-Pumpe werden durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induziert. Ob allerdings Calcitriol auch einen direkten Einfluss auf die Funktion der Kalzium-Pumpe besitzt

oder dieser eher einen Schutz vor Proteolyse und Lipolyse in der Zellmembran bietet, ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Wasserman und Fullmer, 1989).

Des Weiteren beschreiben einige Autoren unter dem Begriff „*transcaltachia*“ einen Soforteffekt der Kalziumabsorption in den Enterozyten. Dabei kommt es *in vivo* innerhalb weniger Minuten (etwa 2-14 Min.) zu einer verstärkten Kalziumabsorption aus dem Darmlumen durch ladungsgesteuerte Kalziumkanäle, begleitet von einer Steigerung der Proteinkinase-C und -A-Aktivität. Bei einem Vitamin-D-Mangel in den Darmzellen konnte dieser Effekt allerdings nicht nachgewiesen werden (Nemere et al., 1984; Nemere und Norman, 1987, 1990; de Boland und Norman, 1990).

2.3.1.2 Funktionen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Niere

Die Niere ist in zweifacher Hinsicht ein Schlüsselorgan der Kalziumhomöostase. Zum einen erfolgt in den proximalen Tubulusabschnitten die biologische Aktivierung zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, zum anderen ist sie das bedeutendste Regulativ der Kalzium- und Phosphatexkretion bzw. -reabsorption. Bis zu 98 Prozent des in den Primärharn abgegebenen Kalziums werden reabsorbiert. In Abhängigkeit vom Resorptionsort im renalen System greifen dabei verschiedene Resorptionmechanismen. Im proximalen Tubulus findet vorwiegend passiver, parazellulärer Transport statt (ca. 65 Prozent des filtrierten Kalzium-Loads), in der Henleschen Schleife aktiver und passiver Transport (ca. 20 Prozent des filtrierten Kalzium-Loads) und im distalen Tubulus, der Feineinstellung der Kalzium-Ausscheidung, bzw. im Sammelrohr werden noch bis zu 10 Prozent des filtrierten Kalzium-Loads reabsorbiert (Yamamoto et al., 1984; Friedmann und Gesek, 1995). Die wichtigsten endokrinen Faktoren in der Regulation der renalen Kalziumreabsorption sind vermutlich PTH und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Friedmann und Gesek, 1995). Das Zusammenwirken beider Hormone fördert im distalen Tubulus die Rückresorption von Kalzium (Yamamoto et al., 1984). Hier ermöglicht PTH offenbar den aktiven Übertritt von Kalzium durch die Membran und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ steuert diesen Prozess durch die Induktion der Synthese von PTH-Rezeptormolekülen (Friedman und Gesek, 1993). Der Übertritt ins Interstitium an der basolateralen Zellmembran erfolgt vermutlich über einen aktiven Transportmechanismus. Eine Plasmamembran-Kalziumpumpe (PMCA) scheint hier von zentraler Bedeutung zu sein (Friedman und Gesek, 1995). Die beiden bedeutendsten kalziumbindenden Proteine in der Niere sind Calbindin D9K und Calbindin D28K. Beide unterscheiden sich in ihrer Struktur und anscheinend ebenso in ihrer Funktion. Die Forschung nimmt an, dass Calbindin D28K hauptsächlich als intrazellulärer Speicher dient und den transzellulären Kalziumtransport

stimuliert, während Calbindin D9K dagegen bei der basolateralen Ausschleusung von Kalzium über die ATP-abhängige Plasmamembran-Kalziumpumpe eine Wirkung ausübt. Da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ über eine Transkriptionsaktivierung die Syntheserate beider Proteine positiv beeinflusst, spielt es vermutlich auch hier eine entscheidende Rolle bei der renalen Kalziumrückresorption (Bouhtiay et al., 1994; Koster et al., 1995; Liu et al., 1996).

2.3.1.3 Vitamin-D-Effekte am Knochen

Neben seinen statischen und formgebenden Funktionen im Körper stellt der Knochen den größten Kalziumspeicher im Organismus dar. Die gesamte Knochenmasse des adulten Menschen, bestehend aus 4/5 kortikalen und 1/5 trabekulären Anteilen, beinhaltet ca. ein Kilogramm reines Kalzium (Parfitt, 1983).

Das Knochengewebe an sich ist auch im ausgewachsenen Individuum nicht statisch, vielmehr finden hier ständig Resorption und Neusynthese (*bone remodeling*) statt. Für die Regulation des Knochenturnovers ist hauptsächlich Parathormon verantwortlich – ob und in welchem Umfang auch Calcitriol aktiven Einfluss auf den Knochenturnover ausübt, wird derzeit kontrovers diskutiert. Knochenzellen aus der osteoblastären Zelllinie exprimieren intrazellulär Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (VDR) (Narbaitz et al., 1983); Osteoklasten dagegen besitzen im Unterschied zu ihren Vorläuferzellen keine VDR (Suda et al., 1992). Es gilt als sicher, dass Calcitriol die Proliferation von Osteoblasten sowie deren Produktion von Typ I Kollagen, alkalischer Phosphatase und Osteocalcin reguliert (Reichel et al., 1989). Experimente *in vivo* haben außerdem gezeigt, dass die pharmakologische Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ innerhalb weniger Tage zu einer vermehrten Bildung von Knochenmatrix führt und daraus eine Zunahme des Osteoids im trabekulärem Knochen resultiert (Boyce und Weisbrode, 1985). Allerdings liegen auch Anhaltspunkte für eine Beteiligung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an resorptiven Prozessen am Knochen vor: So wurde gezeigt, dass die hoch dosierte, pharmakologische Gabe von Calcitriol eine direkte Stimulation der Knochenresorption induziert (Erben et al., 1997). Ob dieser Effekt in der Tat auch von physiologischer Bedeutung ist, bleibt noch zu klären.

Heute geht die Forschung davon aus, dass die knochenprotektive Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ *in vivo* primär in seinen kalzämischen Effekten in Darm und Niere, also in der Steigerung des Plasmakalziumspiegels zu finden ist. Dieser Annahme liegt zugrunde, dass sich im Tiermodell bei Ratten mit Vitamin-D-Mangel durch die Fütterung mit einer kalzium-, phosphat- und laktoseangereicherten Diät, auch über einen längeren Zeitraum hinweg, keine offensichtliche Beeinträchtigung der Knochenmineralisierung einstellt (Weinstein et al., 1984;

Walters et al., 1992). Daraus resultiert die gegenwärtige Meinung, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ keine physiologisch relevante, direkte Funktion am Knochen besitzt.

2.3.1.4 Nicht-kalzämische Vitamin-D-Wirkungen

Bis Ende der 70er Jahre gingen Wissenschaftler davon aus, dass die hauptsächliche, wenn nicht sogar die einzige Funktion von Vitamin D die Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase ist. 1979 wurde erstmals das Vorkommen von VDR in einer Vielzahl von Geweben beschrieben, die nicht mit dem Kalzium-Metabolismus im Zusammenhang stehen. Sowohl in den Zellkernen von Gonaden, Hypophyse, Thymus, Pankreas, Magen, Brustdrüse und Haut (Hollick, 1995a; Stumpf et al., 1979) als auch in Zellen des Immunsystems wie B- und T- Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen, in Herzmuskelzellen und Myoblasten sowie in verschiedenen Tumorzelllinien ist das Vorkommen von VDR beschrieben worden (Hollick, 1995b; Darwish und DeLuca, 1993).

Wenngleich der exakte Einfluss von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Immunantwort noch nicht geklärt werden konnte, wird angenommen, dass Calcitriol bei immunkompetenten Zellen die Fähigkeit zur Phagozytose induzieren kann, außerdem die Expression von Oberflächen-Antigenen wie dem Fc- und C-3-Rezeptor bewirkt und die lysosomale Aktivität der Zellen verstärkt (Bar-Shavit et al., 1981; Binderup, 1992). Des Weiteren zeigen klinische Studien bei Patienten mit Vitamin-D-Mangel- Rachitis häufig wiederkehrende Infektionen, die hauptsächlich den Respirationstrakt betreffen (Lorente et al., 1976). Aktivierte Makrophagen und T-Lymphozyten haben ebenfalls die Fähigkeit, neben der Expressierung von VDR auch dessen Liganden zu metabolisieren. Sie besitzen eine eigene Calcidiol-1-Hydroxylase und sind damit im Stande, 25-Hydroxyvitamin in die biologisch aktive Form $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ umzuwandeln (Cadranel et al., 1990). Die physiologische Bedeutung dieser Tatsache bedarf jedoch noch weiterer Aufklärung.

In der Haut konnten Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bisher in Epidermiszellen (Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale) sowie in der Wurzelscheide der Haarfollikel und in Hautfibroblasten nachgewiesen werden (Stumpf et al., 1979). Die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist auch hier primär die Hemmung der Proliferation und die Stimulation der Zelldifferenzierung. Es handelt sich vermutlich um einen genomischen Effekt, da dieser bei Patienten mit Mutationen im VDR-Gen fehlt (Hollick, 1994; Hollick, 1995b). Vitamin D und verschiedene Analoga werden bereits erfolgreich bei der Behandlung von Hautkrankheiten, z.B. Psoriasis (Schuppenflechte) oder Ichthyosis (Fischschuppen Krankheit) eingesetzt (Hollick, 1995a).

Eine antiproliferative Wirkung und Stimulation zur Zelldifferenzierung zeigt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an hyperplastischen gutartigen Prostatazellen, ebenso wie an malignen Prostatakrebszellen: beide besitzen VDR (Skowronski et al., 1995).

An Sertolizellen ist ein antiproliferativer Effekt durch die Sofortwirkung von Vitamin D an Kalziumkanälen beschrieben (Akerstrom und Walters, 1992). Gleiche Ergebnisse werden aus Untersuchungen an Nager-Cardiomyozyten genannt. Auch hier erfolgt eine erhöhte, intrazelluläre Kalzium-Aufnahme – eine mögliche Bedeutung von Vitamin D für die Kontrolle der Inotropie der Ventrikelmuskulatur wird deshalb diskutiert (Walters et al., 1987). Dass allerdings $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, wie im Tiermodell gezeigt, auch einen anabolen Effekt auf den menschlichen Skelettmuskel ausübt, konnte in klinischen Feldstudien nicht bewiesen werden (Birge und Haddad, 1975; Grady et al., 1991).

Bei Krebszellen, die VDR exprimieren, wurde *in vitro* und *in vivo* eine Hemmung ihrer Proliferation durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ festgestellt (Eisman et al., 1987; Honma et al., 1983). Der Einsatz von Vitamin D bzw. Vitamin-D-Analoga ermöglicht damit neue Ansätze in der Weiterentwicklung heutiger Krebstherapien.

2.4 PHARMAKOLOGISCHE EFFEKTE VON VITAMIN D

2.4.1 Vitamin-D-Effekte am Tiermodell der Ratte

Zum Verständnis der komplexen Zusammenhänge des endokrinen Systems ist es nötig, neben Versuchen *in vitro* auch Versuche *in vivo* durchzuführen. Um Einblicke in die weitreichenden Vorgänge des Knochenstoffwechsels zu erlangen ist die Ratte als Tiermodell besonders gut geeignet, da bereits eine umfangreiche Datensammlung nahe legt, dass die Skelettreaktion auf Vitamin-D-Metaboliten bei Ratte und Mensch gleichartig ist (Erben, 2001). Anhand des Tiermodells der Ratte könnten also Voraussagen über die Wirkungen von Vitamin-D-Präparaten beim Menschen getroffen und weitere Erkenntnisse im Zusammenspiel von Parathormon und Calcitriol gewonnen werden.

Als Modell bei maligner Hyperkalzämie, induziert durch Parathyreoidektomie und kontinuierliche Infusion von Parathormon, zeigt die Ratte bei Gaben von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine dosisabhängige Linderung der Hyperkalzämie. Als Mechanismus wird ein direkter antiresorptiver Effekt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ am Knochen vermutet (Endo et al., 2000).

Die Forschung erkennt heute an, dass die chronische Administration eines aktiven Vitamin-D-Metaboliten während einer ausreichenden Kalziumzufuhr bei der Ratte zu einer dosisabhängigen Suppression der Knochenresorption führt (Erben et al., 1998a; Erben et al., 1998b). Selbst toxische Dosen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, die bei der Ratte zu Gewichtsverlust führen,

unterdrücken die Knochenresorption (Weber et al., 2001). Der wichtigste Mechanismus *in vivo* von diesem antiresorptiven Effekt bei andauernder Gabe von Vitamin-D-Metaboliten liegt vermutlichmaßen in der Suppression der PTH-Sekretion. Nach wie vor bleibt allerdings zu klären ob es sich dabei um einen direkten oder indirekten Effekt der Vitamin-D-Analoga handelt.

Kurzzeitversuche mit hoch dosiertem Calcitriol zeigten bei der Ratte, dass der Calcitriol-induzierte Zuwachs der osteoblastären Matrix nur bei ausreichender Kalziumzufuhr über das Futter stattfindet und nicht bei Fütterung einer Diät mit niedrigem Kalzium und Phosphorgehalt (Boyce und Weisbrode, 1983). Weitere Studien warfen die Frage auf, ob das Vitamin-D-Hormon überhaupt einen direkten Einfluss am Knochen ausübt. An Ratten mit Vitamin-D-Mangel konnte gezeigt werden, dass bei einer Infusion mit ausreichender Menge an Kalzium und Phosphor eine normale Mineralisation der Knochen bestehen bleibt (Weinstein et al., 1984). Durch die Fütterung einer so genannten *Rescue Diet* – diese ist mit Kalzium und Phosphor angereichert und beinhaltet einen hohen Anteil an Laktose – können Vitamin-D-defiziente Ratten über einen längeren Zeitraum ohne Beeinträchtigung der Knochenmineralisation leben (Walters et al., 1992; Kollenkirchen et al., 1991).

Die weibliche Ratte eignet sich des weiteren als Tiermodell zur Erforschung möglicher Therapieansätze bei der postmenopausalen Osteoporose. Durch Ovariectomie wird ein künstlicher Östrogen-Mangel erzeugt, der bei der Ratte zu einer vermehrten Knochenresorption führt. Tierexperimente zeigten, dass orale Dosen eines Vitamin-D-Analogs in niedriger Dosierung den durch Östrogen-Mangel ausgelösten Knochenverlust am trabekulären und kortikalen Knochen unterdrücken können (Erben et al., 1998a; Shiraishi et al., 2000). Bei der Applikation höherer Dosen eines Vitamin-D-Metaboliten erfolgte auch an langsam oder gar nicht wachsenden Knochenbereichen eine Zunahme des trabekulären Knochens. Diese Zunahmen verzeichneten höhere Werte als bei Kontrolltieren oder SHAM-operierten Tieren gemessen wurden (Erben et al. 1997; Shiraishi et al., 2000).

Die hier aufgeführten Tatsachen sprechen deutlich für den weiteren unverzichtbaren Einsatz der Ratte als Tiermodell zur Vertiefung der Erkenntnisse über den Knochenstoffwechsel und zur Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten bei Erkrankungen und Dysregulationen am Knochen.

2.4.2 Osteoporose

Unter dem Begriff Osteoporose wird eine pathogenetisch uneinheitliche Gruppe von Skelettaffektionen zusammengefasst, die mit einer erhöhten Frakturanfälligkeit einhergehen (Nordin, 1983). Osteoporosen werden *per definitionem* in primäre und sekundäre untergliedert. Während die Erstgenannte idiopathische Anlässe, darunter auch die häufig erwähnte postmenopausale Osteoporose beschreibt, werden unter den sekundären Osteoporosen endokrine, gastrointestinale, maligne und iatrogene Ursachen verstanden (Ringe, 1985).

Das allgemeine pathogenetische Prinzip der Osteoporose besteht generell in einer gegenüber der Norm gesteigerten negativen Skelettbilanz. Hier sind die beiden Hauptdeterminanten zum einen die „peak bone mass“, die höchste im Leben erreichte Knochenmasse, und zum anderen das Ausmaß der nach dem Peak einsetzenden Verlusten (Ringe, 1985). Der Mensch erreicht zwischen dem dreißigsten und fünfunddreißigsten Lebensjahr seine höchste Knochenmasse, im weiteren Leben kommt es danach zu einer kontinuierlichen Altersatrophie am Knochengewebe.

Neueren Untersuchungen zufolge hat die Vitamin-D-Versorgung hierauf maßgeblichen Einfluss (Lethonen-Veromaa et al., 2002). Neben der zeitlichen Komponente, die bei der Entwicklung der Osteoporose eine Rolle spielt, wird eine genetische Prädisposition diskutiert. Auch ein Zusammenhang mit bestimmten Risikofaktoren wird erwägt. Wissenschaftler vermuten zum Beispiel, dass Hypogonadismus, Hyperthyreoidismus und HIV-Infektion die Verlusten am Knochen beschleunigen (Compston et al., 2002).

Nach wie vor stellt die postmenopausale Osteoporose den Großteil der hier geschilderten Erkrankung dar; sie bildet damit einen Fokus für die Erforschung der Pathogenese und möglicher Therapieansätze. Das Nachlassen der endokrinen Ovarialfunktion und der damit einhergehende Östrogenmangel erhöht die Sensibilität des Skeletts gegenüber Parathormon, als deren Folge steigt der Blutkalziumspiegel und die Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird gedrosselt. Dadurch verringert sich die Kalziumresorption im Dünndarm. Der dabei entstehende Kalziummangel wird wiederum durch die vermehrte Freisetzung von Kalzium aus dem Knochen kompensiert (Ringe, 1985; Deftos et al., 1980).

Mögliche therapeutische Ansätze sind zum einem die Gabe von Bisphosphonaten, die einen antiresorptiven Effekt am Knochen bewirken, zum anderen werden knochenanabole Pharmaka, darunter Parathormon, als aussichtsreiche Therapeutika in Erwägung gezogen (Compston, 2002).

Der wirkungsvolle Einsatz von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder seinen Analoga in der Osteoporosetherapie wird nach wie vor kontrovers diskutiert (Fujita, 1992). Neuere Ergebnisse zeigen eine direkte,

anabole Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in hohen pharmakologischen Dosen am Knochen. Allerdings werden durch die kalzämischen Nebenwirkungen im klinischen Einsatz knochenspezifischere Vitamin D Analoga benötigt (Erben et al., 1998a; Erben, 2001). Calcitriol bewirkt am Knochen eine antiresorptive Wirkung durch Suppression von PTH. Eine direkte Einwirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf Osteoblasten sowie eine durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mediierte Stimulation der Calcitoninsynthese wurden ebenfalls nachgewiesen. Hier ist allerdings die Höhe der pharmakologischen Dosis ausschlaggebend (Boyce und Weisbrode, 1985; Rassoul et al., 1995; Erben, 2002).

Über die genauen Mechanismen der pharmakologischen Wirkungen von Vitamin D bzw. seinen Analoga in Hinsicht auf eine erfolgreiche, breit anwendbare Vorbeugung und Behandlung der Osteoporose besteht weiterhin großer Forschungsbedarf.

2.4.3 Rachitis und Osteomalazie

Als Rachitis und Osteomalazie werden Vitamin-D-Mangelsyndrome bei wachsenden bzw. adulten Individuen bezeichnet. Sie entstehen entweder durch eine mangelnde Aufnahme bzw. Eigensynthese von Vitamin D, durch Störungen im Vitamin-D-Metabolismus oder durch Funktionsstörungen im Bereich des Rezeptors oder der Transaktivierung.

Vitamin-D-Mangelernährung oder fehlende Exposition gegenüber UVB-Strahlung sind meist geographisch bedingt oder haben soziokulturelle Ursachen. Allerdings können auch autosomal dominant wie rezessiv vererbte Gendefekte zu den beschriebenen Erkrankungen führen, darunter die Vitamin D abhängige Rachitis Typ I (VDDR I) oder Typ 2 (VDDR II). Bei VDDR I liegt eine Funktionsstörung der renalen $25(\text{OH})\text{D}_3$ - 1α Hydroxylase vor, bei VDDR II bewirken Mutationen im VDR-Gen eine mehr oder minder vollständige Gewebsresistenz gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Eisman, 1988).

Fehlt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, oder zeigt es keine Wirkung, resultiert daraus letztendlich eine Hypokalzämie, die eine vermehrte PTH-Sekretion zur Folge hat und gravierende Störungen des Knochenstoffwechsels nach sich zieht. Der Kalziummangel und die daraus herrührende verringerte Mineralisierung der Knochenmatrix, sowie die fehlregulierte Matrixsynthese bewirken ein defizientes Knochenwachstum und eine mechanische Instabilität des Knochens (Eisman, 1988; Bender 1990).

Bezüglich der zugrunde liegenden Ursachen der Osteomalazie ist die physiologische Substitution bei Vitamin-D-Mangel ausreichend. Sind enzymatische Störungen oder VDR-Defekte der Grund, können pharmakologisch hohe Dosen des aktiven Vitamins eine Kompensation bewirken.

2.4.4 Psoriasis

Die Psoriasis (oder Schuppenflechte) ist eine chronische hyperproliferative Hautkrankheit, hervorgerufen durch epidermale Stoffwechselstörungen und immunologische Prozesse. Klinisch treten scharf begrenzte, erythematöse, mit silberweißen Schuppen bedeckte Herde von verschiedener Größe auf der Haut auf (Kragballe, 1992; Pschyrembel, 1990). Mikroskopisch stehen die Hyperproliferation von Keratinozyten und deren verkürzte Wanderzeit von der Basalmembran zur Hornschicht im Vordergrund.

Wie bereits erwähnt exprimieren Keratinozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten VDR – sie stellen somit Zielzellen für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dar (Milde, 1991). Calcitriol übt eine antiproliferative Wirkung auf menschliche Keratinozyten aus und verstärkt maßgeblich die Transkription von TGF- β -1 (McLane, 1991). Des Weiteren wird angenommen, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, neben dem Einfluss auf das Wachstum von Epidermalzellen auch weitgehend immunologische und entzündliche Prozesse über einen Cytokin-Weg in der Haut steuert (Kragballe, 1992).

Klinische Studien haben gezeigt, dass oral appliziertes $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zwar eine anti-psoriatische Wirkung besitzt, aber durch die kalzämische Wirkung nur ein sehr kleines Dosisfenster besteht und eine sichere Therapie somit fraglich ist. Die topische Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ birgt durch die hohe perkutane Resorption des Vitamin-D-Hormons bei permanenter Anwendung die gleichen Gefahren einer Hyperkalzämie und Hyperkalzurie (Kragballe, 1992; Langner et al., 1991).

Synthetische Analoga zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, darunter Calcipotriol (MC 903, ein 1,24-dihydroxy-Vitamin-D-Derivat) mit zellregulierendem Einfluss und geringerem Risiko hyperkalzämischer Nebeneffekte werden bereits für eine sichere und effiziente Anti-Psoriasis-Therapie verwendet.

2.4.5 Der Einfluss von Vitamin-D-Hormon auf das Immunsystem

Durch radioaktiv markiertes $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde Ende der 70-er Jahre die Erkenntnis gewonnen, dass sich Calcitriol neben den klassischen Zielzellen (Darm, Niere und Knochen) unter anderem auch in den Zellkernen von Makrophagen und Lymphozyten nachweisen lässt. Weitere Untersuchungen haben daraufhin bestätigt, dass Calcitriol immunomodulatorische Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* besitzt (Bouillon et al., 1995). Im Tierexperiment zeigten Tiere mit Vitamin-D-Mangel, wahrscheinlich aufgrund unzulänglicher Funktion der Makrophagen, ein allgemein höheres Infektionsrisiko. Individuen mit einer niedrigen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Produktion, z.B. bei einer chronischen Niereninsuffizienz, haben häufig eine geschwächte Immunabwehr (Gavison und Bar-Shavit, 1989).

Die Ausschüttung zellassoziierter Cytokine konnte in Versuchen *in vitro* durch die Gaben von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dosisabhängig unterdrückt werden. Des Weiteren beschreibt Panichi et al. (2003) eine Hemmung der TNF- α -Produktion durch die Applikation von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in physiologisch verträglichen Dosen bei mononukleären Blutzellen, welche durch Lipopolysaccharide zuvor immunologisch stimuliert worden sind.

Mehrere Arbeitsgruppen dokumentieren eindrucksvolle Ergebnisse bei der Therapie von autoimmunen Erkrankungen wie z.B. systemischer Lupus Erythematosus, rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose und Typ I Diabetes mit Calcitriol (Brown et al., 1999).

Die Forschung vermutet, dass Vitamin D die Produktion von transforming growth factor (TGF)- 1β , und Interleukin-4 stimuliert und daraus eine Hemmung der inflammatorischen Aktivität von T-Zellen resultiert (DeLuca und Cantorna, 2001). Allerdings ist der genaue Suppressionsmechanismus dieser autoimmunen Erkrankungen nach wie vor nicht vollständig geklärt, und viele Ansätze sind eher spekulativer Natur. Trotzdem stellt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aufgrund der augenscheinlichen Wirkungen auf immunkompetente Zellen ein wichtiges und zukunftssträchtiges Molekül bei der Forschung nach sicheren und zuverlässigen Therapien dieser Erkrankungen dar.

2.4.6 Antiproliferative Effekte von Vitamin D

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ besitzt, neben den bereits beschriebenen anti-hyperproliferativen Effekten in Epidermalzellen, auch eine antiproliferative Wirkung in Krebszellen (Eisman et al., 1987). Viele Krebszellen exprimieren, analog zu den gesunden Körperzellen, spezifische, hoch affine Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (VDR). Calcitriol und bestimmte Vitamin-D-Analoga bewirken über diese VDR eine Hemmung der Zellproliferation. Allerdings wurde neben den bislang bekannten Promotorregionen mit einem „VD responsive element“ (VDRE) für Peptide wie z. B. Osteocalcin und Calbindine bis heute kein vergleichbares VDRE in der Promotorregion eines Gens gefunden, das für die Regulation des Zellzyklus verantwortlich sein könnte. Trotzdem steht seit einiger Zeit fest, dass das Proto-Oncogen c-myc durch Calcitriol reguliert wird. Neuere Studien haben ergänzend hinzugefügt, dass das Inhibitor-Protein für Cyclin-abhängige Kinasen p21 (WAF1/CIP1) durch den Einfluss von Calcitriol vermehrt transkribiert wird (Carlberg, 1996; Jiang et al., 1994; Simpson et al., 1987). Nach der nun vorherrschenden Meinung beeinflusst $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wirkungsvoll das Zellwachstum und vermag bei Bedarf sogar die Apoptose der Zelle einzuleiten (Hollick, 2004).

Einige Autoren sehen einen Zusammenhang zwischen der Inzidenz von Darm-, Prostata- und Brustkrebs und der geographischen Wohnlage beim Menschen; das vermehrte Auftreten dieser

Krebsleiden bei Bewohnern über dem 40. Breitengrad wird mitunter hervorgerufen durch Vitamin-D-Mangel, bedingt durch niedrigere Sonneneinstrahlung, so behaupten Hollick (2004) und Garland et al. (1990).

Im Fall des Prostatakarzinoms unterstützen weitere Untersuchungen die Hypothese, dass ein $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Mangel neben den bestehenden Risikofaktoren Alter, Rasse, genetische Disposition und die Höhe des Androgenspiegels einen deutlichen Einfluss auf die Tumorgenese darstellt (Schwartz und Hulka, 1990). Die therapeutische Anwendung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und eines Analogon (hier: EB-1089, mit einer modifizierten C-17 Seitenkette) hat eine deutliche Hemmung der Proliferation von humanen Prostatakrebszelllinien (LNCaP, PC-3) *in vitro* ergeben (Feldman et al., 1995).

Bei Versuchen *in vivo* an Ratten mit N-methyl-N-nitrosourea (MNU), d.h. künstlich induziertem Brustkrebswachstum, konnte die Tumorgenese mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder EB 1089 sowie dem Analogon 22-oxa- $1,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 gehemmt werden (Christakos, 1994).

Untersuchungen *in vitro* an MCF-7 humanen Brustkrebszellen lassen vermuten, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ den Zellzyklus in der G_0/G_1 -Phase zu stoppen vermag, eine vermehrte Transkription der Zellzyklus- Inhibitoren p21 und p27 induziert und gegensätzlich die Transkription von Cyklin A und D1 hemmt.

Zusätzlich zu den anti-proliferativen Effekten zeigen mit 100 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ behandelte MCF-7 Krebszellen morphologische und biochemische Grundzüge einer Apoptose, d.h. die Zellen schrumpfen, das Chromatin wird kondensiert, und Phosphatidylserin wird vermehrt auf der Zelloberfläche exprimiert (Narvaez et al., 2001; Simboli-Campbell et al., 1996; Simboli-Campbell und Welsh, 1996).

Die bis heute erhobenen Daten über die Wirkungen von Vitamin D auf Krebszellen lassen hoffen, dass Vitamin-D-Analoga, welche mit geringeren kalzämischen Nebenwirkungen einen Durchbruch in der Prävention und der Therapie von Tumoren ermöglichen, bald gefunden werden.

2.4.7 Die Toxizität von Vitamin D

Die hohe intrinsische Aktivität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bedingt den bis heute limitierten Einsatz dieses Hormons in Hinsicht auf Therapien bereits erwähnter sowie weiterer Krankheiten. Der hohe kalzämische Effekt, die induzierte Hyperkalzämie und Hyperkalzurie von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ überschattet bisweilen die pharmakologisch erwünschte Wirkung am Zielgewebe und provoziert schwerwiegende Nebenwirkungen, unter anderem Nierenkalzinose und Herzrhythmusstörungen (verkürztes QT-Intervall).

Hauptsächlich drei Faktoren im Vitamin-D-System, *per se* oder gemeinsam, stellen eine Grenze für eine sichere Aufnahme von Vitamin D dar: die Kapazität von Vitamin-D-Binding-Protein (DBP), die enzymatische Aktivität der 1α -Hydroxylase und die Belastungsgrenze des Körpers $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu metabolisieren und auszuscheiden.

An DBP gebundene Vitamin-D-Metaboliten haben keine biologische Wirkung. Es wird vermutet, dass DBP als eine Art „Puffersystem“ zum Schutz vor einer Vitamin-D-Vergiftung agiert (Mendel, 1989). Die 1α -Hydroxylase hingegen zeigt unter einer Vitamin-D-Hypervitaminose keine eingeschränkte Aktivität, sondern reagiert mit einer unangemessen hohen Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Intoxikation (Vieth, 1990). Ferner diskutiert die Forschung, ob bei Heranwachsenden eine vergleichbar niedrigere Metabolisierung von Calcitriol erfolgt und somit eine höhere Gefahr der induzierten Hyperkalzämie bei $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gaben der Fall ist. Überzeugende Beweise stehen allerdings aus (Halloran, 1990; Vieth, 1990).

Die genannten Fakten unterstreichen nochmals die derzeitige Forschungstendenz, verstärkt Vitamin-D-Analoga zu Therapiezwecken zu synthetisieren, um auf die vielfältigen, heilenden Wirkungen dieses Sterols nicht auf Kosten unerwünschter Nebenwirkungen verzichten zu müssen.

3. MATERIAL UND METHODEN

Die zu Grunde liegenden Versuche wurden von der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 211-2531-111/01 genehmigt und am Institut für Physiologische Chemie und Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt.

3.1 TIERVERSUCHE

3.1.1 Versuch 1 : Die Skelettwirkung von Calcitriol in Abhängigkeit von der Applikationsform

Für dieses Experiment wurden 72 weibliche, sechs Monate alte Fischer-344-Ratten verwendet, die aus einer einheitlichen Lieferung von Charles River Wiga, Sulzfeld, stammen. Die Ratten wurden in neun Gruppen zu je acht Tieren eingeteilt und paarweise in Makrolonkäfigen vom Typ III gehalten.

Im Rahmen des Versuchs erfolgte eine zweiwöchige Behandlung mit Vehikel, 0.05 oder 0.10 µg/kg KG Calcitriol entweder oral über das Futter, oral über Schlundsonde, oder über subkutane Injektion (siehe Versuchsplan Versuch 1). Das Vehikel bestand aus Ethanol/Propandiol (1:9, Ethanol absolut und 1,2-Propandiol, Fa. VWR, Darmstadt) für die orale Gabe über das Futter, aus physiol. Kochsalzlösung/Ethanol (95:5) für die subkutane Applikation, sowie aus 0.1 Prozent Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan-Monolaurate, Fa. Sigma, Taufkirchen) für die Schlundsondenapplikation.

Alle Tiere dieses Versuchs wurden restriktiv mit einer pulverisierten Diät gefüttert (9 g/Tier/Tag) um sicherzustellen, dass in den Gruppen 1–3 die komplette Dosis über das Futter aufgenommen wird. Die Diät bestand aus gemahlenem Alleinfuttermittel Typ 1324 (Fa. Altromin, Lage) das, mit Ausnahme der Gruppen 2 und 3, mit Vehikel versetzt worden war, um eine einheitliche Akzeptanz zu gewährleisten. Vehikel und Calcitriol wurden nach dem Durchweichen des Futters mit Waschbenzin (Petroleumbenzin reinst, Fa. Sigma, Taufkirchen) eingemischt. Das Futter wurde schließlich 48h offen unter dem Abzug bis zum vollständigen Abdampfen des Waschbenzins belassen.

Den Gruppen 4-6 wurde einmal täglich zwischen 11 und 13 Uhr Vehikel, 0.05 oder 0.1 µg Calcitriol/kg KG per Schlundsonde (Knopfkanüle gebogen 1.2x60 mm, Fa. Heiland, Hamburg) gelöst in destilliertem Wasser und 0.1 Prozent TWEEN 20 verabreicht.

Dagegen wurden die Tiere der Gruppen 7-9 mit Vehikel und Calcitriol gleicher Dosierung durch subkutane Injektion behandelt.

Am 5. und 1. Tag vor dem Versuche erhielten die Tiere eine Fluorochrom-Doppelmarkierung mit Calcein (20 mg/kg KG, Fa. Sigma, Taufkirchen). Dabei wurde allen Ratten Calcein, gelöst in aqua ad injectabilia mit einem 14-prozentigen Zusatz von Natriumbikarbonat, subkutan injiziert.

Zur Uringewinnung wurden alle Tiere 14 Stunden vor der Tötung in Stoffwechselfäfigen nüchtern gehalten. Leitungswasser stand ihnen ad libidum zur Verfügung. Am Versuche wurden die Ratten durch Blutentzug aus der Aorta abdominalis unter Ketamin/Xylazin-Narkose (Ketamin, Hostaket[®], Fa. Hoechst, Wiesbaden, und Xylazin, Rompun[®] 2%, Fa. Bayer, Leverkusen) schmerzlos getötet.

Das gewonnene Serum wurde aliquotiert und für die weitere Diagnostik bei -35° gelagert. Die rechte proximale Tibia und der 1. Lendenwirbel wurden vom Weichgewebe gesäubert und unentkalkt in MMA eingebettet. Die linke Tibia und der 4. Lendenwirbel wurden ebenfalls entfleischt, anschließend in 70 Prozent Ethanol eingelegt und für die Knochenmineraldichte-Messung mittels pQCT gelagert.

Tabelle 1 : Versuchsplan für Versuch 1

Gr.	N	0	1	2 Wochen
01	8	Vehikel oral (Futter)		F--F-†
02	8	0.05µg Calcitriol/kg KG/Tag oral (Futter)		F--F-†
03	8	0.10µg Calcitriol/kg KG/Tag oral (Futter)		F--F-†
04	8	Vehikel oral (Schlundsonde)		F--F-†
05	8	0.05µg Calcitriol/kg KG/Tag oral (Schlundsonde)		F--F-†
06	8	0.10µg Calcitriol/kg KG/Tag oral (Schlundsonde)		F--F-†
07	8	Vehikel subkutan		F--F-†
08	8	0.05µg Calcitriol/kg KG/Tag subkutan		F--F-†
09	8	0.10µg Calcitriol/kg KG/Tag subkutan		F--F-†

Gr. = Gruppe; N = Anzahl der Tiere; F = Calcein; † = Tötung;

3.1.2 Versuch 2 : Die Skelettwirkung von Calcitriol an parathyreoidektomierten Ratten

3.1.2.1 Parathyreoidektomie

Für Versuch 2 wurden 72 weibliche, sechs Monate alte Fischer-344-Ratten scheinoperiert (n = 24) oder parathyreoidektomiert (n = 48, siehe Versuchsplan Versuch 2). Alle verwendeten Tiere wurden von Charles River Wiga, Sulzfeld im Alter von 3 Monaten gekauft und bis zu dem Versuchbeginn weitere drei Monate, identisch den Ratten aus Versuch 1, gehalten. Die Parathyreoidektomie (PTX) wurde basierend auf der von Waynforth (Waynforth, 1988) beschriebenen Methode durchgeführt.

PTX und scheinoperierte (SHAM) Tiere wurden mit einer antagonisierbaren 3-fach Anästhesie in Narkose gelegt. Zur Betäubung erhielten die Ratten intramuskulär von kaudal in die Oberschenkelmuskulatur aus einer Mischspritze Medetomidin (0.15 mg/kg KG, Domitor®, Fa. Pfizer, Karlsruhe), Midazolam (2 mg/kg KG, Dormicum®, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) und Fentanyl (0.005 mg/kg KG Fentanyl B. Braun, B. Braun AG, Melsungen) injiziert. Die Antagonisierung *post operationem* wurde subkutan verabreicht; sie bestand aus Atipamezol (0.75 mg/kg KG Antisedan®, Fa. Pfizer, Karlsruhe), Flumazenil (0.2 mg/kg KG Anexate®, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) und Naloxon (0.12 mg/kg KG Naloxon-ratiopharm®, ratiopharm GmbH, Ulm).

Allen Tieren wurde postoperativ zur Analgesie Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma GmbH, München) und Sulfonamid/Trimethoprim (100 µl/Tier, Borgal® 7.5%, Fa. Hoechst, Wiesbaden) als Antibiotika-Prophylaxe subkutan verabreicht. Die Operation wurde mit Hilfe einer Stereolupe (Modell Stemi SV 6, Fa. Zeiss, Oberkochen) zusammen mit einer Kaltlichtquelle (Modell KL1500 electronic Fa. Schott, Mainz) durchgeführt.

Nach Rasur des Felles im ventralen Halsbereich und Hautdesinfektion wurde in der Medianen eine ca. 1,5 cm lange Hautinzision vorgenommen. Die darunter liegenden Faszien und Muskelschichten wurden in der Medianlinie stumpf getrennt. Nach Darstellung des Kehlkopfbereiches wurde die Kapsel der Schilddrüse geöffnet und die Nebenschilddrüse dargestellt, diese wurde mit einer Mikropinzette fixiert und aus dem umliegenden Schilddrüsengewebe mit Hilfe einer feinen Schere herausgeschnitten. Auftretende Blutungen konnten mit einem Tropfen Epinephrin (1:10, Adrenalin, Jenapharm GmbH & Co. KG, Jena) gestoppt werden. Die Wunde wurde schichtgerecht verschlossen, die Haut mit 1 bis 2 Michel-Klammern (7.5x1.75 mm, Fa. Heiland, Hamburg) geschlossen und mit Alu-Spray (Alvetra GmbH, Neumünster) überdeckt. Die Kontrolltiere (SHAM) wurden entsprechend in Narkose

gelegt; die Schild- und Nebenschilddrüsen wurden in ihrer Kapsel beidseitig dargestellt, die Wunde wurde in gleicher Weise verschlossen.

Um einer narkosebedingten Polyphagie entgegenzutreten wurden die Tiere während der Aufwachphase in leeren Makrolonkäfige gehalten; erst nach ca. einer Stunde konnten die wachen Tiere wieder in mit Einstreu bestückte Käfige zurückgebracht werden.

Der Erfolg der Parathyreidektomie ist über die Messung des ionisierten Kalziums zwei Tage *post operationem* überprüft worden. Hierfür wurde den Ratten während einer kurzen Äthernarkose ca. 50 µl Blut aus einer Schwanzvene entnommen und mit Hilfe eines Elektrolyt-Messgerätes (Modell 9180 Electrolyte Analyzer, AVL Scientific Corporation, Georgia, USA) der Blutspiegel an ionisiertem Kalzium bestimmt. Lag dieser um oder unter 1 mmol/l – so zeigten es zahlreiche Vorversuche und Verlaufsmessungen an Probetieren – kann von einer erfolgreich verlaufenen Operation ausgegangen werden.

Den Ratten der Gruppen 7 – 9 wurden anschließend osmotische Minipumpen (Modell 2002, Fa. ALZET, USA) subkutan am Rücken implantiert. Diese 3 cm langen und 0.7 cm im Durchmesser großen Pumpen gewährleisten eine kontinuierliche Abgabe von 0.5 µl/h ihrer Füllung über einen Zeitraum von zwei Wochen. (siehe Abb. 1, Alzet, osmotische Minipumpe).

Jede Pumpe wurde individuell, dem Gewicht des Tieres entsprechend, mit Ratten- PTH(1-34)-Lösung gefüllt (rPTH (1-34)), Bachem AG, Bubendorf, Schweiz). Als Trägerlösung wurde eine physiologische Kochsalzlösung mit 1 mM HCl und 2 Prozent hitzeinaktiviertem Ratten-Serum verwendet (Dobnig, 1997).

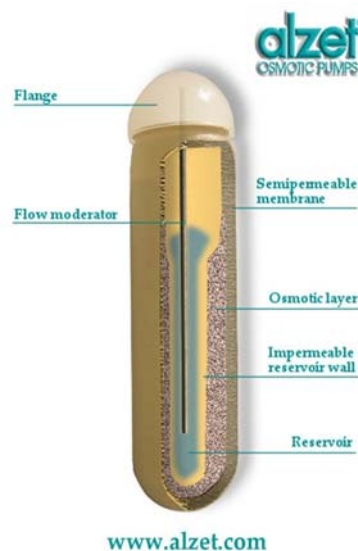


Abb.1 osmotische Minipumpe

3.1.2.2 Implantation der Pumpen

Unter Äthernarkose wurde nach Abscheren des Fells und nach Desinfektion der Haut im Lendenwirbelbereich median ein ca. 0,5 cm langer Hautschnitt angebracht. Nach Mobilisierung der Haut konnte die Pumpe in das subkutane Gewebe implantiert werden. Die Hautinzision wurde mit 1 bis 2 Michel-Klammern verschlossen und mit Alu-Spray überdeckt.

3.1.2.3 Fütterung

Alle Tiere des Versuchs 2 erhielten gemahlene Alleinfuttermittel Typ 1324 der Firma Altromin, in das, analog zu Versuch 1, Vehikel, 0.05 oder 0.10 µg/Calcitriol/kg KG in Ethanol/Propandiol (1:9) eingemischt wurde (siehe Versuch 1). Die restriktive Fütterung (9g/Tier/Tag) sollte bei allen Ratten sicherzustellen, dass in den Gruppen 2, 3, 5, 6, 8 und 9 die komplette Dosis über das Futter aufgenommen wurde.

Tabelle 2 : Versuchplan für Versuch 2

Gr.	N	0	1	2Wochen
01	8	SHAM + Vehikel oral (Futter)		F-F-†
02	8	SHAM + 0.05 µg Calcitriol/kg KG/Tag oral (Futter)		F-F-†
03	8	SHAM + 0.10 µg Calcitriol/kg KG/Tag oral (Futter)		F-F-†
04	8	PTX + Vehikel oral (Futter)		F-F-†
05	8	PTX + 0.05µg Calcitriol/kg KG/Tag oral (Futter)		F-F-†
06	8	PTX + 0.10 µg Calcitriol/kg KG/Tag oral (Futter)		F-F-†
07	8	PTX + rPTH + Vehikel oral (Futter)		F-F-†
08	8	PTX + rPTH + 0.05µg Calcitriol/kg KG/Tag oral (Futter)		F-F-†
09	8	PTX + rPTH + 0.10 µg Calcitriol/kg KG/Tag oral (Futter)		F-F-†

Gr. = Gruppe; F = Calcein; † = Tötung; PTX = Parathyreoidektomie; rPTH = Ratten-PTH(1-34)

3.1.3 Vorexperiment zur Bestimmung einer physiologischen PTH-Substitution

Vor Beginn der eigentlichen Versuchsreihe war es erforderlich, die genaue Konzentration an Parathormon (PTH) für die Füllung der Pumpen experimentell zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden parathyreoidektomierten Ratten (n = 17, davon 16 weiblich, 1 männlich) osmotische Minipumpen implantiert, die 2, 4, 6, 7 und 8 µg/kg KG/Tag Ratten-PTH (rPTH 1-34) abgeben.

Vorab wurde das gelöste PTH in einem Experiment *in vitro* für zwei Wochen im Inkubator bei 37°C auf seine Stabilität für den Einsatz *in vivo* geprüft.

Vor der Implantation der Pumpen wurde den Ratten Blut aus einer Schwanzvene abgenommen, um die Kalzium- sowie die PTH-Blutkonzentration zu bestimmen (Calcium-Arsenazo III, Fa. Sigma, Taufkirchen, und Rat PTH IRMA Kit, Immunotopics Inc., San Clemente, USA). Nach zwei Wochen wurden die Tiere, wie in Versuch 1 beschrieben, getötet. Aus dem gewonnenen Serum wurde erneut Gesamt-Kalzium und die PTH-Konzentration bestimmt (siehe Tabelle 1).

Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (n = 8, alle weiblich) war nun ersichtlich, dass das Aufrechterhalten eines physiologischen Blutkalziumspiegels bei den parathyreoidektomierten Ratten mit einer Dosis von 8 µg/kg/Tag PTH zu erreichen ist. Der PTH-Blutspiegel wurde als sekundär aussagekräftig bewertet, da er einer großen physiologischen Schwankung unterworfen ist.

Tab.1 Blutkalzium- und PTH-Spiegel von PTX-Ratten bei der Applikation unterschiedlicher Dosen vom rPTH (1-34) mittels osmotischer Minipumpe vor und zwei Wochen nach Implantation der Pumpen

PTH in µg/kg KG/Tag	Anzahl der Tiere	Serumparameter vor PTH- Substitution		Serumparameter nach PTH Substitution	
		Kalzium [mmol/l]	PTH [pg/l]	Kalzium [mmol/l]	PTH [pg/l]
2	4	2.19 (0.13)	62.51 (51.53)	1.97 (0.29)	74.44 (29.89)
4	4	2.09 (0.27)	10.71 (1.42)	2.03 (0.17)	78.14 (27.78)
6	2	2.25 (0.35)	12.61 (0.71)	2.48 (0.47)	97.78 (5.02)
7	2	2.00 (0.00)	12.44 (0.65)	2.29 (0.11)	80.06 (10.91)
8	5	2.10 (0.24)	10.64 (9.90)	2.53 (0.15)	110.80 (42.43)
Kontrolle	8	2.54 (0.23)	96.30 (57.20)		

Werte: Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern)

3.2. KNOCHENMINERALDICHTE-MESSUNG MITTELS PERIPHERER QUANTITATIVER COMPUTER TOMOGRAPHIE

3.2.1 Einleitung

Die periphere quantitative Computertomographie (pQCT) ist eine nichtinvasive, röntgendiagnostische Methode, die aufgrund ihrer Sensitivität geeignet ist, auch bei kleinen Tieren wie Ratten Veränderungen der Knochenmineraldichte und der geometrischen Eigenschaften reproduzierbar zu analysieren und dreidimensional darzustellen (Lind et al., 2001; Gasser, 1995). In der hier beschriebenen Versuchsreihe wurde ein XCT Research M der Firma Stratec Medizintechnik, Pforzheim, als vollautomatisches Messgerät zur Bestimmung der Knochendichte und -geometrie eingesetzt. Das Gerät verwendet eine speziell entwickelte Röntgenröhre mit besonders kleinem Fokus (Handbuch XCT2000, Stratec Medizintechnik, Pforzheim).

3.2.2 Messprinzip

Die aus der Röntgenröhre emittierten Photonen werden nach Transmission von zwölf gegenüberliegenden Detektoreinheiten registriert. Durch die Absorption von Röntgenstrahlen durch ein Objekt entsteht ein Absorptionsprofil. Durch mathematische Faltung von möglichst vielen Absorptionsprofilen aus verschiedenen Winkelstellungen lassen sich Querschnittsbilder berechnen, die dem ursprünglichen Objekt weitgehend entsprechen. Bei diesem Verfahren ist jedem Bildpunkt ein entsprechender Schwächungskoeffizient zugeordnet, der in $1/\text{cm}$ angegeben wird. Durch Kalibrierung mit Phantomen bekannter Hydroxyapatit-Konzentration lassen sich die Schwächungskoeffizienten in Dichtewerte (mg/cm^3) umrechnen. Durch diese Kalibrierung wird nur der Mineralanteil des Knochens berücksichtigt.

3.2.3 Messung

Die pQCT Messung erfolgt in zwei Schritten, beim Übersichtsscan (SV-Scan) wird das Objekt planar in 1 mm-Abständen der Länge nach mäanderförmig abgetastet, der Messstrahl wird quer durch das Objekt geführt. Man erhält ein farblich codiertes digitales Rasterbild, ähnlich einem Röntgenbild, mit hellen knochendichten Anteilen und dunklen Weichteilanteilen. Auf diesem Bild können die gewünschten Messorte für die eigentliche Messung (CT-Scan) bestimmt werden.

Von den Tieren beider Versuche wurden jeweils die linke Tibia und der 4. Lendenwirbel für die pQCT Analyse verwendet. Die Knochen sind in einem Kunststoff-Reagenzgefäß, gefüllt mit 70 Prozent Ethanol, durch eine kleine Feder fixiert für die Messung bereitgestellt worden. Die Messorte für den CT-Scan sind bei der Tibia einmal 2 mm distal der proximalen Epiphysenfuge und 2 mm proximal der Verwachsung von Fibula mit dem Tibiaschaft. Am L4 wurde am SV-Scan Bild die Längsmittelpunkt am Wirbelkörper bestimmt und dort, sowie jeweils 2 mm kranial und kaudal der Mitte die Markierungen für den CT-Scan gelegt.

3.2.4 Auswertung der Messung

Nach abgeschlossenem CT-Scan wurden die für die Berechnung relevanten Knochenareale, die so genannte „Region Of Interest“ (ROI), definiert. Am Tibiaschaft wurden eventuelle Anteile der Fibula von der Auswertung ausgeschlossen. Am 4. Lendenwirbel beschränkte sich die Auswertung auf den Wirbelkörper.

Das Programm überprüfte daraufhin alle Bildpunkte innerhalb einer ROI auf ihre Dichte und entfernte alle Bildpunkte, die eine geringere Dichte als der Schwellenwert haben. Diese können als Weichteilgewebe betrachtet werden. Als Schwellenwert für die Detektion von kortikalem Knochen wurde 710 mg/cm^3 verwendet. Die Schichtdicke aller Messungen ist 0.2 mm und die Voxelgröße $100 \mu\text{m}$. Auch Kortikalis und Spongiosa werden entsprechend ihrer Dichte unterschieden.

Folgende Parameter der pQCT-Analyse wurden in dieser Arbeit verwendet:

Gesamte Knochenmineraldichte (Total Bone Mineral Density, in mg/cm^3)

Kortikale und subkortikale Knochenmineraldichte (Cortical and Subcortical Bone Mineral Density, in mg/cm^3)

Spongiosadichte (Trabecular Bone Mineral Density, in mg/cm^3)

Gesamtquerschnittsfläche (Total Area, in mm^2)

Querschnittsfläche der Kortikalis und Subkortikalis (Cortical and Subcortical Area, in mm^2)

Querschnittsfläche der Spongiosa (Trabecular Area, in mm^2)

Periostaler Umfang (Periostal Perimeter, in mm)

Endokortikaler Umfang (Endocortical Perimeter, in mm)

3.3 HISTOLOGIE UND HISTOMORPHOMETRIE

3.3.1 Herstellung der histologischen Präparate

Soweit nicht besonders angegeben, stammen alle hier erwähnten Chemikalien von der Firma VWR, Darmstadt.

3.3.1.1 Präparation und Fixierung

Für die histologische Auswertung wurden von allen Ratten aus den Versuchen 1 und 2 die rechte proximale Tibia und der erste Lendenwirbel verwendet. Die Knochen wurden unmittelbar nach der Tötung sorgfältig aus dem Tierkörper herauspräpariert und vorsichtig von Weichteilgewebe gesäubert. Die Fibula wurde schonend von der Tibia getrennt und der proximale Anteil der Tibia mit Hilfe einer elektrischen Knochensäge ca. 10 mm distal vom Schaft getrennt. Anschließend sind die proximale Tibia und der in Gänze belassene, an der rechten Wirbelkörperseite zwecks besserer Infiltration leicht geöffnete erste Lendenwirbel in eine 4 %ige Paraformaldehyd-Lösung (PFA) gegeben worden.

3.3.1.2 Infiltration und Einbettung

Das sich anschließende Einbettprotokoll wurde nach der etablierten Methode von Erben (Erben, 1997) durchgeführt. Der Vorteil dieser immunhistochemischen Einbettung besteht zum einem in der Verwendung von Methylmethacrylate (MMA), das sich nach dem Schneiden wieder leicht und vollständig aus dem infiltrierten Gewebe entfernen lässt. Zum anderen werden bei diesem Verfahren keine hohen Temperaturen zur Polymerisation des MMAs benötigt, was die Aktivität von Enzymen und antigenen Strukturen auf und in den Zellen unverändert lässt (Baskin et al. 1992; Wolf et al. 1992).

Bei allen Schritten der Infiltration und der anschließenden Einbettung wurde darauf geachtet, dass die Lösungen stets unter 4°C gekühlt verwendet wurden. Die Polymerisation fand bei Temperaturen von -18 bis -20°C statt; die fertigen Blöcke wurden bei -20°C gelagert (Erben, 1997).

3.3.1.3 Schneiden und Aufziehen der Schnitte

Nach dem Trimmen der MMA-Blöcke wurden 5 µm dicke Schnitte der Tibien-Präparate bei Raumtemperatur mit einem Schlittenmikrotom SM 2500 (Fa. Leica, Bensheim) hergestellt. Ein Messer mit 50° Schneidewinkel diente zum Anschneiden der

Blöcke bei einer Schnittdicke von 50 - 60 µm. Für die Semidünnschnitte von 5 µm Dicke wurde ca. 100 µm vor Erreichung der eigentlichen Schnittebene ein 40° - Hartmetallmesser in das Mikrotom eingesetzt. Die Schnittebene war an der Tibia als eine Sagittalebene definiert, die durch die Eminentia intercondylaris, durch die Tuberositas tibiae und durch die Stelle des weitesten Lumens der Tibiadiaphyse verlief.

Aus dem eingebetteten Lendenwirbel sind bei Raumtemperatur mit einem Mikrotom HM 360 microtome (Microm, Walldorf) 5 µm dicke Schnitte angefertigt worden. Am Lendenwirbel war die Schnittebene als die Medianebene festgelegt worden. Während des Schneidens wurden die Blöcke und die Schnitte mit einer Schneidflüssigkeit (WIV, Schwetzingen) feucht gehalten. Alle Schnitte wurden auf mit 3-amino-propyltriethoxy-silane (APES, Sigma, Taufkirchen) vorbehandelten Objektträgern aufgelegt und mit 70% Ethanol vorsichtig geglättet.

Schließlich wurden die Objektträger mit einer polyethylen Folie (Kisol-Folie, Fa. Kettenbach, Eschenburg) abgedeckt, mit einer Gummirolle glatt gestrichen und in einer Objektträgerpresse für zwei Tage bei 42°C im Wärmeschrank getrocknet.

3.3.1.4 Entplasten und Färben

Zum Entplasten wurden die Schnitte dreimalig in 2-Methoxyethylacetat für jeweils 20 Minuten getaucht, danach für je fünf Minuten in 70 Prozent Ethanol und 40 Prozent Ethanol belassen und zuletzt in destilliertem Wasser bis zum Färben gelagert. Anschließend wurden die Schnitte routinemässig mit Von Kossa (Schenk et al. 1984) gefärbt. Diese Methode färbt kalzifizierte Knochen mit Silbernitrat intensiv schwarz ein.

3.3.2 Fluorochrom - Markierungen

3.3.2.1 Calcein - Markierung

Wie erwähnt wurde allen Versuchstieren an den Tagen 5 und 1 vor Versuche Calcein als Knochenmarker subkutan appliziert. Dieser Zeitabstand wurde nach dem optimalen marker interval gewählt, um ein marker interval/formation-period-Verhältnis von unter 0.2 zu gewährleisten (Erben, 2003). Calcein gilt aufgrund seiner besonders stark fluoreszierenden Eigenschaften, der geringen Tendenz zur Ausbleichung und wegen seiner geringen Toxizität als Mittel erster Wahl (Erben, 2003).

Nach Applikation bindet Calcein an neu mineralisiertes Zahn- und Knochengewebe durch Bildung von Chelat-Komplexen mit Kalzium-Ionen an der Oberfläche neu entstandener

Apatit-Kristalle. Wie die Forschung vermutet, liegt der Grund für die selektive Bindung an neuzeitlich entstandene mineralisierte Oberflächen im Knochen in der geringeren Größe dieser neu erschaffenen Apatit- Kristalle im Vergleich zu den weitaus größeren älteren (Erben, 2003).

3.3.2.2 Präparate

Die in Abschnitt 3.3.1.2 beschriebenen Schnitte sind für die folgende Fluoreszenz-Mikroskopie nicht entplastet und gefärbt worden. Als Medium zum Eindecken wurde Fluoromount® (Fa. Boehringer Mannheim) verwendet. Um einem Ausbleichen entgegenzuwirken, wurden alle hergestellten Präparate durchgängig dunkel gelagert.

3.3.3 Histomorphometrische Messungen

Für die Auswertung der Knochenmorphologie wurden ausschließlich zweidimensionale Parameter verwendet. Der Benennung aller Messergebnisse liegt die vom Histomorphometry Nomenclature Committee vorgeschlagene Terminologie zugrunde (Parfitt et al. 1987).

3.3.3.1 Statische Parameter

Die Von Kossa gefärbten Schnitte von Tibia und L4 wurden mit dem vollautomatischen Bildanalyseverfahren VIDAS (Fa. Zeiss, Oberkochen) in Verbindung mit einem Stereomikroskop SV 11 (Fa. Zeiss, Oberkochen) und einer digitalen Kamera ausgewertet.

Am eingescannten Knochen wurde als Messbereich durchgängig die Spongiosa-Fläche abzüglich eines 0.5 mm breiten Randes zur Epiphysenfuge hin bestimmt. Endokortikaler Knochen wurde nach Möglichkeit nicht in die Messung mit einbezogen. Nötige interaktive Korrekturen erfolgten nach dem Einscannen. Das Bildanalyse-System bestimmte vollautomatisch die Zahl (Number of Trabeculae, N.Tb), die Summe der Flächen (Total bone area, Tt.B.Ar) und die Summe der Umfänge (Total bone perimeter, Tt.B.Pm) der innerhalb der Messfläche (Tissue area, T.Ar) gelegenen Knochen-trabekel.

Hieraus ergaben sich folgende Parameter:

Bone Area = Tt.B.Ar/T.Ar x 100	[%]
Bone Perimeter = Tt.B.Pm/T.Ar	[mm/mm ²]
Trabecular Width = Tt.B.Ar/Tt.B.Pm x 2000	[µm]
Trabecular Number = N.Tb/T.Ar	[/mm ²]
Trabecular Area = Tt.B.Ar/N.Tb	[mm ²]
Trabecular Separation = 1/N.Tb-Tb.Wi	[µm]

3.3.3.2 Dynamische Parameter

Die für die Fluoreszenz-Mikroskopie vorbereiteten Schnitte wurden mit Hilfe des halbautomatischen Meßsystems VIDEOPLAN (Fa. Zeiss, Oberkochen) und einem Axioskop-Mikroskop mit Zeichentubus (Fa. Zeiss, Oberkochen) ausgewertet. Die durch eine Quecksilber-Höchstdrucklampe vom Typ HBO 50 (Fa. Zeiss, Oberkochen) emittierten Wellen regen – in Verbindung mit einem Filtersystem (Zeiss Filter Set Nr. 09) – die im Knochen eingelagerten Calcein- Moleküle zu einer intensiven, grünen Fluoreszenz an (Erben, 2003).

Bei den Tibia- und L4-Schnitten wurde in der ersten Messung der Mineralizing Perimeter (M.Pm= dL.Pm/B.Pm x 100 in %) bei 200facher Vergrößerung ermittelt. Dieser Wert gibt das Verhältnis der Länge der Doppelmarkierungen (Double-labeled perimeter, dL.Pm) bezogen auf den Gesamtumfang (bone perimeter, B.Pm) an.

Bei 400facher Vergrößerung wurde anschließend der Abstand beider Banden der Doppelmarkierungen zueinander gemessen. Aus dem arithmetischen Mittel dieses Wertes und dem Zeitabstand zwischen den beiden Calcein-Applikationen kann die Mineral Apposition Rate (MAR) in µm/Tag berechnet werden.

Die Bone Formation Rate (BFR) kann nun mit der Formel $BFR = MAR \times dL.Pm / B.Pm$ berechnet werden; sie gibt die neu mineralisierte Knochenfläche in µm²/µm/Tag an.

Zusammenfassend wurden somit folgende Parameter bestimmt:

Mineralizing Perimeter	(M.Pm in %)
Mineral Apposition Rate	(MAR in µm/Tag)
Bone Formation Rate	(BFR in µm ² /µm/Tag)

3.4 BIOCHEMISCHE ANALYSEVERFAHREN

3.4.1 Serumanalyse

Aus dem gewonnenen Blut (siehe 3.1) wurde das Serum abgenommen, aliquotiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Ein Aliquot wurde nach Auftauen bei Raumtemperatur zur Bestimmung folgender Serumparameter verwendet:

- Alkalische Phosphatase (ALP)
- Albumin
- Harnstoff
- Kreatinin
- Phosphor

Zur Bestimmung diente ein Hitachi 717 Auto-Analyzer (Fa. Boehringer, Mannheim).

3.4.2 Elektrolytbestimmung

Die Menge an freiem und gebundenem Kalzium wurde durch Flammenphotometrie bestimmt (Modell EFOX 5053, Fa. Eppendorf, Hamburg).

3.4.3 Urinanalyse

3.4.3.1 Elektrolyte und Kreatinin

Von jedem Tier wurde zuerst die Urinmenge gemessen, danach von jeder Probe 125 µl Urin mit 125 µl 2 N HCl, für die Kalzium Bestimmung per Flammenphotometer, in ein Reagenzgefäß pippettiert.

Aus der Verdünnung nach dem Verhältnis 1:2 wurden anschließend 30 µl mit 300 µl destilliertem Wasser (1:22) in ein weiteres Reagenzgefäß zur Bestimmung von Kreatinin und Phosphor pipettiert. Diese Verdünnungsschritte sind erforderlich, um die Ergebnisse im Messbereich des Hitachi 717 Auto-Analyzer zu halten.

3.4.3.2 Deoxypyridinolin

Aus einem weiteren Aliquot mit Nativ-Urin wurde Deoxypyridinolin (DPD) mit einen kompetitiven Enzym Immunoassay (Metra® DPD EIA kit, Quidel Corporation, San Diego, USA) bestimmt. DPD ist ein speziesunabhängiges, knochenspezifisches Molekül, das zusammen mit Pyridinolin (PYD) für die Verkettung (cross-linking) des Typ-I Kollagens in der Knochenmatrix verantwortlich ist. Bei osteoklastärer Aktivität wird DPD freigesetzt und ohne metabolisierende Zwischenschritte über die Niere ausgeschieden. Das DPD/Kreatinin-

Verhältnis gibt daher Aufschluss über den Knochenturnover und über vermehrte oder verminderte Osteoklastentätigkeit (Mona, 1996).

3.4.3.3 PTH - Messung mit ELISA

Die Parathormon-Konzentration im Serum der in Versuch 1 verwendeten Ratten wurde mit dem Rat Intact PTH ELISA Kit (Immunotopics Inc., San Clemente, USA) bestimmt. Dieser Enzyme Linked Immunosorbent Assay arbeitet nach dem „Sandwich-Prinzip“ und gibt Aufschluss über die Serumkonzentration von physiologisch sezerniertem Ratten-PTH (rPTH 1-84).

3.4.3.4 PTH - Messung mit IRMA

Bei den im Versuch 2 sowie im Vorversuch operierten Ratten wurde die PTH-Serumkonzentration mit einem Rat PTH IRMA Kit (Immunotopics Inc., San Clemente, USA) bestimmt. Dieser Immunoradiometric Assay arbeitet ebenfalls nach dem „Sandwich-Prinzip“, doch unterscheidet sich das Verfahren darin, dass hier beide Anti-Rat PTH Antikörper mit der N-Terminalen Region des aus den Aminosäuren 1-34 bestehenden Peptidsegments von rPTH reagieren.

So werden mit diesem IRMA intaktes rPTH(1-84) und das über die Pumpen substituierte rPTH(1-34) gleichsam gemessen. Durch den mit ¹²⁵Jod gelabelten zweiten Anti-PTH Antikörper kann die PTH-Konzentration direkt proportional zur der im Gamma-Zähler angezeigten Radioaktivität extrapoliert werden.

3.4.4 Bestimmung von Gesamtkalzium im Serum

Im PTX-Vorversuch wurde die Blut-Kalzium-Konzentration der PTX-Ratten sowie der Kontrolltiere mit dem Calcium(Arsenazo III)-Test (Fa. Sigma Taufkirchen) gemessen. Der Test arbeitet mit der photometrischen Bestimmung des Arsenazo-Kalzium-Komplexes bei einer Wellenlänge von 600 nm. Arsenazo III (2,2-[1,8 Dihydroxy-3,6 Disulfonaphtyl-2,7 Diazol]-Dibenzoarsensäure) bildet spezifisch mit Kalzium einen purpurroten Farbkomplex, der sich der Kalziumkonzentration in der Probe direkt proportional verhält (Beipackzettel, Arsenazo III Test, Sigma, Taufkirchen).

3.5 STATISTIK

Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe der Software SAS Version 8.02 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen in Klammern angegeben. Für beide Versuche wurde zunächst eine faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Dabei wurden im ersten Versuch der Einfluss der Faktoren *Calcitriol* (0, 0.05 und 0.1 µg/kg pro Tag) und der *Applikationsform* (Futter, Schlundsonde und subkutane Applikation) und die Interaktion zwischen *Calcitriol* und der *Applikationsform* getestet. Im zweiten Versuch wurden die Faktoren *Calcitriol* (0, 0.05 und 0.1 µg/kg pro Tag), der unterschiedliche *PTH-Status* (SHAM, PTX oder PTX-PTH) und die Interaktion der beiden Faktoren untersucht. Um individuelle Unterschiede zwischen einzelnen Behandlungs-Gruppen mit der jeweiligen Kontrollgruppe zu testen, wurde eine einfache Varianzanalyse und - falls die einfache ANOVA signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ergab - ein Least Significant Difference (LSD)-Test als Post hoc-Test durchgeführt. Dabei wurde in allen Tests $p < 0.05$ als statistisch signifikant angesehen und folgende Signifikanzniveaus fanden Verwendung: $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.005$, $p < 0.001$ und $p < 0.0001$.

4. ERGEBNISSE

Alle Werte der im Folgenden dargestellten Ergebnisse sind als Mittelwert angegeben; die Standardabweichung wird in Klammern genannt. Die Ergebnisse der statistischen Tests für einfachen und zweifachen ANOVA werden innerhalb der Tabelle unter den jeweiligen Parametern aufgeführt.

Statistisch nicht signifikante Ergebnisse werden mit n.s in der Tabelle vermerkt.

Mit dem Least Significant Difference Test werden die jeweiligen behandelten Gruppen direkt gegen ihre eigenen Kontrollgruppen auf statistische Signifikanz untersucht, die hochgestellten Buchstaben, die den Werten folgen, stehen für das jeweils erreichte Signifikanzniveau und werden unterhalb jeder Tabelle definiert.

4.1 VERSUCH 1: DIE SKELETTWIRKUNG VON CALCITRIOL IN ABHÄNGIGKEIT VON DER APPLIKATIONSFORM

Im Versuch 1 sollten die antiresorptiven und knochenanabolen Effekte von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Zusammenhang mit der Applikationsform eingehender untersucht werden. Jeweils drei Hauptgruppen erhielten entweder oral über das Futter, per Schlundsonde oder subkutan injiziert Calcitriol in zwei unterschiedlichen Dosierungen verabreicht. Aus Gründen der Praktikabilität und aus dem Bemühen heraus, die Belastung der Tiere in Grenzen zu halten, wurde für die jeweilige Applikationsform eine eigene Kontrollgruppe mitgeführt.

Die gezeigten Ergebnisse entstammen sowohl der statischen und dynamischen Histomorphometrie als auch der Knochenmineraldichte-Messung mittels pQCT an der Tibia und dem Wirbelkörper des ersten bzw. vierten Lendenwirbels. Zusätzlich wurden ausgewählte Parameter aus der Serum- und Urinanalyse zur Vervollständigung des Gesamtbildes mit einbezogen.

4.1.1 Histomorphometrische Messungen an der proximalen Tibiametaphyse und dem ersten Lendenwirbelkörper

4.1.1.1 Statische histomorphometrische Messungen an der sekundären Spongiosa der proximalen Tibiametaphyse

Eine deutliche Zunahme der *Bone Area* (B.Ar/T.Ar) erfolgte in Abhängigkeit der applizierten Dosis von Calcitriol an der proximalen Tibiametaphyse am ausgeprägtesten bei

der subkutanen Anwendung. Gegenüber der Kontrollgruppe findet in den mit 0.05 µg/kg KG Calcitriol eine erkennbare, in den mit 0.1 µg/kg KG Calcitriol *s.c.* behandelten Ratten eine signifikante Erhöhung der Knochenfläche statt (siehe Abb. 2). Die über das Futter behandelten Tiere zeigen im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe – unabhängig von der Dosierung – eine ähnliche, wenngleich nicht signifikante Erhöhung der *Bone Area* (B.Ar/T.Ar). Bei der über Schlundsonde behandelten Gruppe tritt keine entsprechende Steigerung der Knochenfläche auf. Hier ist sogar eine geringe Abnahme der Knochenfläche, verglichen mit der Kontrollgruppe, zu erkennen. Der statistische Vergleich aller mit 1,25(OH)₂D₃ behandelten Gruppen zu ihren Kontrollen weist allerdings keinen signifikanten Effekt von Calcitriol bezüglich der Zunahme der *Bone Area* (B.Ar/T.Ar) auf. Die Art der Applikation dagegen bewirkt signifikante Unterschiede bei der Erhöhung der Knochenfläche. Die Parameter *Trabecular Width* (Tb.Wi), und *Trabecular Area* (B.Ar/N.Tb), der Erstgenannte ist ein Maß für die mittlere Trabekelbreite, Zweitgenannter gibt die mittlere Knochenfläche pro Trabekel an und stellt ein Maß für die Konnektivität von Knochenstrukturen dar, zeigen beide in den einzelnen Gruppen die gleichen Effekte von Calcitriol wie bei der *Bone Area* (B.Ar/T.Ar).

Der Parameter *Trabecular Separation* liefert Aufschluss über den Abstand zwischen den Trabekeln. In der Injektionsgruppe bei applizierten 0.05 µg/kg KG nimmt er leicht, bei 0.1 µg/kg KG signifikant zu und unterstützt damit die genannten Ergebnisse. In der per Schlundsonde mit 0.05 µg/kg KG behandelten Gruppe ist ebenfalls ein signifikanter Anstieg der *Trabecular Separation* beobachtbar. In allen sechs behandelten Gruppen ist die Zahl der Trabekel pro Quadratmillimeter Gewebefläche, die *Trabecular Number* (N.Tb/T.Ar), verglichen zu ihrer Kontrollgruppe erniedrigt, was mit dem Zuwachs der mittleren Trabekelbreite in allen behandelten Gruppen im Einklang steht. Der Parameter *Bone Perimeter* (B.Pm/T.Ar), der die Gesamtlänge des pro Quadratmillimeter Gewebefläche vorhandenen Knochenumfangs angibt, weist eine signifikante Erhöhung in der mit 0.1 µg/kg KG behandelten Injektionsgruppe auf. In der Gesamtbetrachtung zeigen die Ergebnisse an der Tibiametaphyse einen knochenanabolen Effekt, der am stärksten durch die Injektion von Calcitriol induziert wird.

4.1.1.2 Statische histomorphometrische Messungen an der sekundären Spongiosa des ersten Lendenwirbelkörpers

Am ersten Lendenwirbelkörper findet in der Fütterungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe bei der Gabe von 0.05 µg/kg KG Calcitriol eine signifikante, bei der Gabe von 0.1 µg/kg KG eine hochsignifikante Erhöhung der *Bone Area* (B.Ar/T.Ar) statt (siehe Abb.3). Die *Bone Area* (B.Ar/T.Ar) der gespritzten Tiere zeigt, im Unterschied zur proximalen Tibia, keinerlei Zunahme der Knochenfläche. Der statistische Vergleich aller mit 1,25(OH)₂D₃ behandelten Gruppen zu ihren Kontrollen weist einen signifikanten Effekt von Calcitriol auf die Zunahme der *Bone Area* (B.Ar/T.Ar) auf.

Analog zur proximalen Tibiametaphyse tritt auch am Lendenwirbelkörper ein signifikanter Anstieg der *Trabecular Separation* in der per Schlundsonde mit 0.05 µg/kg KG behandelten Gruppe auf. Die mittlere trabekuläre Breite, *Trabecular Width* (Tb.Wi), nimmt ebenfalls in beiden über das Futter behandelten Gruppen signifikant zu (siehe Tab. 2B). Der Parameter *Trabecular Area* (B.Ar/N.Tb) verdeutlicht die Tendenz, dass Calcitriol am Lendenwirbelkörper, über das Futter aufgenommen, den stärksten Effekt am Knochen erreicht.

Abb. 2 und 3: Einfluss von 1,25(OH)₂D₃ in unterschiedlichen Applikationsformen auf den Parameter *Bone Area* (B.Ar/T.Ar) in der sekundären Spongiosa der proximalen Tibiametaphyse (Abb. 2) und des ersten Lendenwirbelkörpers (Abb. 3) im Versuch 1

Abb. 2

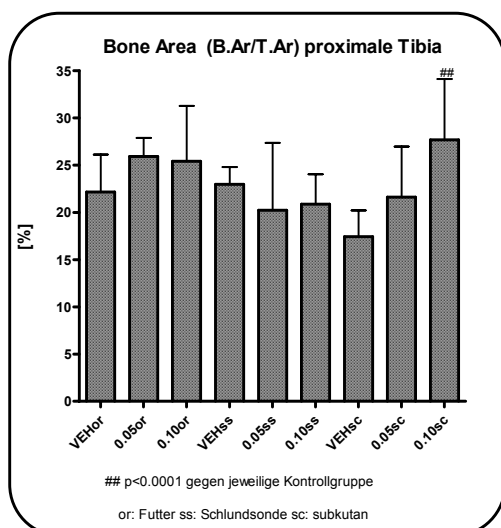


Abb. 3

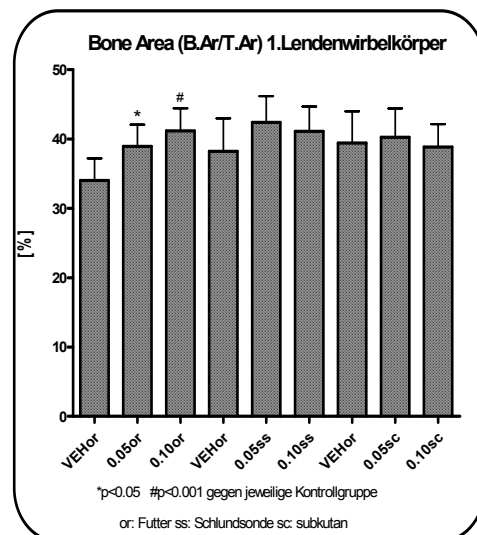


Tabelle 2A: Statische histomorphometrische Parameter in der sekundären Spongiosa der proximalen Tibiametaphyse im Versuch 1

Gruppe		Bone Area (B.Ar/T.Ar) [%]	Bone Perimeter (B.Pm/T.Ar) [mm/mm ²]	Trab. Width (Tb.Wi) [µm]	Trab. Number (N.Tb/T.Ar) [#/mm ²]	Trab. Area (B.Ar/N.Tb) [mm ²]	Trab. Separation [µm]
FUTTER	Vehikel	22.1703 (3.9595)	6.3319 (1.0532)	75.7766 (10.1808)	5.0678 (0.829)	0.0494 (0.0166)	193.7330 (40.1821)
	0.05µg/kg Calcitriol	25.9369 (1.9482)	6.6838 (0.4968)	77.6285 (4.7473)	4.5822 (0.6118)	0.0582 (0.0071)	175.5697 (15.9282)
	0.10µg/kg Calcitriol	25.4304 (5.8446)	6.0018 (1.3082)	84.7841 (7.0780)	3.9950 (0.8438)	0.0671 (0.0177)	203.5352 (45.0956)
SONDE	Vehikel	22.9785 (1.8276)	6.1898 (0.3274)	74.4611 (7.2920)	5.2346 (1.0616)	0.0466 (0.0143)	196.0705 (11.5736)
	0.05µg/kg Calcitriol	20.2202 (7.1456)	5.5149 (1.0731)	72.3681 (14.3549)	4.3004 (0.7503)	0.0504 (0.0254)	236.6846 ^e (56.6588)
	0.10µg/kg Calcitriol	20.8756 (3.1720)	5.9004 (0.7009)	70.8038 (7.2619)	4.4244 (0.8860)	0.0505 (0.0154)	214.1380 (33.2642)
SUBKUTAN	Vehikel	17.4214 (2.7973)	5.4378 (0.8752)	64.1283 (5.1996)	5.0843 (0.9891)	0.0351 (0.0056)	244.6759 (42.9827)
	0.05µg/kg Calcitriol	21.6294 (5.3471)	5.3351 (0.5687)	80.4520 ^c (14.8350)	4.5550 (0.9408)	0.0522 (0.0262)	234.8263 (37.1465)
	0.10µg/kg Calcitriol	27.6774 ^a (6.4616)	6.5933 ^b (0.9926)	84.0267 ^d (15.6218)	4.6209 (1.1087)	0.0649 ^c (0.0247)	176.6634 ^d (35.4212)
2-WayANOVA: Effekt von Calcitriol		n.s	n.s	p<0.05	p<0.05	p<0.01	n.s
2-WayANOVA: Effekt von Art d. Applikation		p<0.05	p<0.05	n.s	n.s	n.s	p<0.05
2-WayANOVA: Interaktion Calcitriol/Appl.		p<0.01	p<0.05	p<0.05	n.s	n.s	p<0.005
1-WayANOVA		p<0.005	p<0.05	p<0.01	n.s	p<0.05	p<0.005

Werte: Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern)

a: p<0.0001; b: p<0.01; c: p<0.005; d: p< 0.001 gegen Vehikel subkutan; e: p<0.05 gegen Vehikel Schlundsonde (Least Significant Difference Test)

4.1.1.3 Dynamische histomorphometrische Parameter in der sekundären Spongiosa der proximalen Tibiametaphyse

An der proximalen Tibiametaphyse erfährt die *Bone Formation Rate* (BFR/B.Pm) in der mit 0.1 µg/kg KG Calcitriol gefütterten Gruppe einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den Kontrolltieren (siehe Abb. 4). Beide anderen Applikationswege zeigen keinen nennenswerten Einfluss auf die BFR. Der *Mineralizing Perimeter* (MPm/B.Pm) und die *Mineral Apposition Rate* (MAR), aus denen sich die BFR errechnet, zeigen die gleichen Verhältnisse in den einzelnen Gruppen wie bei der BFR. Allerdings weisen diese Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und behandelten Gruppen auf.

Tabelle 2B: Statische histomorphometrische Parameter in der sekundären Spongiosa des ersten Lendenwirbelkörpers im Versuch 1

Gruppe		Bone Area (B.Ar/T.Ar) [%]	Bone Perimeter (B.Pm/T.Ar) [mm/mm ²]	Trab. Width (Tb.Wi) [µm]	Trab. Number (N.Tb/T.Ar) [/mm ²]	Trab. Area (B.Ar/N.Tb) [mm ²]	Trab. Separation [µm]
FUTTER	Vehikel	34.0243 (3.1806)	7.0848 (0.6370)	87.5008 (7.4406)	2.2966 (0.6597)	0.1699 (0.0632)	134.1064 (15.4703)
	0.05 µg/kg Calcitriol	38.9607 ^a (3.1331)	7.6352 (0.2109)	102.1164 ^c (8.4332)	2.2832 (0.9595)	0.2061 (0.0821)	125.6902 (8.0240)
	0.10 µg/kg Calcitriol	41.2021 ^b (3.2397)	7.5394 (0.5684)	110.0878 ^b (11.6103)	2.1882 (0.4842)	0.2666 (0.1839)	123.4104 (11.8556)
SONDE	Vehikel	38.2382 (4.7595)	7.3947 (0.5879)	103.7078 (12.0201)	2.5142 (0.5057)	0.1596 (0.0373)	132.3783 (18.4815)
	0.05 µg/kg Calcitriol	42.4065 (3.7798)	7.5818 (0.3197)	111.9037 (9.0636)	2.2729 (0.9089)	0.2220 (0.1094)	119.6378 ^d (10.9700)
	0.10 µg/kg Calcitriol	41.1152 (3.5652)	7.7227 (0.3414)	106.6133 (5.8005)	2.4340 (0.5299)	0.1884 (0.0428)	120.2325 (12.3247)
INJEKTION	Vehikel	39.4235 (4.5627)	7.6334 (0.4536)	103.3635 (9.4294)	2.3873 (0.8669)	0.1874 (0.0535)	125.4443 (14.7859)
	0.05 µg/kg Calcitriol	40.2695 (4.1266)	7.7338 (0.3410)	104.1173 (9.1194)	2.2459 (0.2972)	0.1903 (0.0467)	121.7912 (12.4002)
	0.10 µg/kg Calcitriol	38.8402 (3.2998)	7.9398 (1.1672)	98.6207 (8.2972)	2.2539 (0.6978)	0.2008 (0.0568)	123.9513 (22.4705)
2-WayANOVA: Effekt von Calcitriol		p<0.01	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
2-WayANOVA: Effekt von Art d. Applikation		n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
2-WayANOVA: Interaktion Calcitriol/Appl.		n.s	n.s	p<0.05	n.s	n.s	n.s
1-WayANOVA		p<0.005	n.s	p<0.01	n.s	n.s	n.s

Werte: Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern)

a: p<0.05; b: p<0.001; c: p<0.01 gegen Vehikel Futter; d: p<0.05 gegen Vehikel Schlundsonde (Least Significant Difference Test)

4.1.1.4 Dynamische histomorphometrische Parameter in der sekundären Spongiosa des ersten Lendenwirbelkörpers

Am ersten Lendenwirbelkörper treten hochsignifikante, durch Calcitriol sowie über die verschiedenen Applikationswege induzierte Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf. Bei allen drei Applikationswegen stellt sich eine dosisabhängige Erhöhung der *Bone Formation Rate* (BFR/B.Pm) ein. In der Fütterungsgruppe weisen beide behandelten Gruppen eine hoch signifikante Zunahme der BFR/B.Pm im Vergleich mit ihrer Kontrollgruppe auf. Bei der Schlundsonden- und Injektionsgruppe zeigen die mit 0.1 µg/kg KG behandelten Tiere eine hochsignifikante Erhöhung der BFR/B.Pm (siehe Abb. 5).

Mineralizing Perimeter (MPm/B.Pm) und *Mineral Apposition Rate* (MAR) lassen dieselben Tendenzen wie die BFR erkennen, beide Parameter zeigen signifikante Unterschiede beim direkten Vergleich der Gruppen miteinander (siehe Tab. 3B).

Abb. 4 und 5: Einfluss von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in unterschiedlichen Applikationsformen auf den Parameter *Bone Formation Rate* (BFR) in der sekundären Spongiosa der proximalen Tibiametaphyse (Abb. 4) und des ersten Lendenwirbelkörpers (Abb. 5) im Versuch 1

Abb. 4

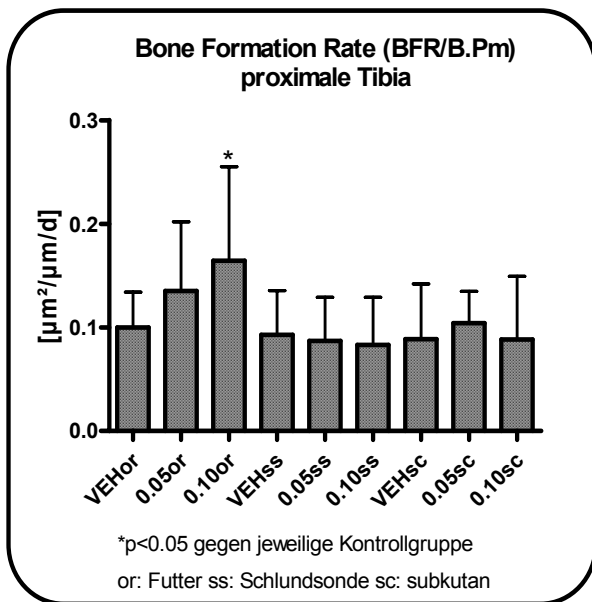
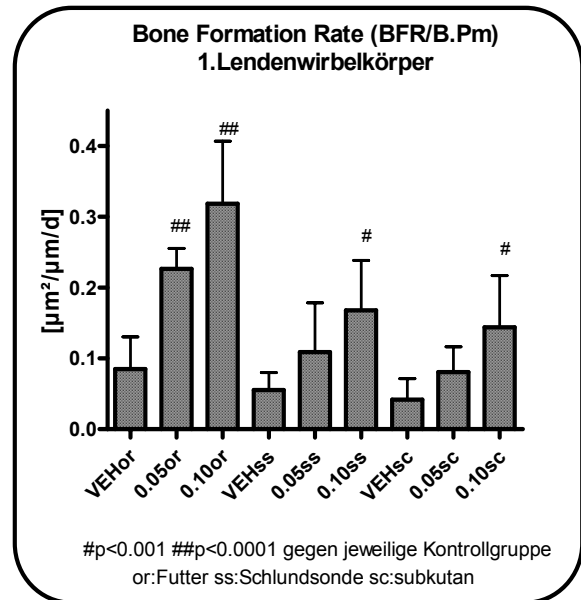


Abb. 5



4.1.2 Knochenmineraldichte-Messungen mittels peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT) an der linken Tibia und dem vierten Lendenwirbelkörper im Versuch 1

Die Knochenmineraldichte-Messung wurde an der Tibia an zwei Stellen durchgeführt: an der proximalen Tibiametaphyse und proximal der Tibiofibulären Aufzweigung. Am vierten Lendenwirbel wurden ausschließlich die kortikalen und trabekulären Anteile des Wirbelkörpers gemessen.

4.1.2.1 Knochenmineraldichte-Messungen an der linken Tibia

Die pQCT-Messung an der proximalen Tibiametaphyse zeigt eine signifikante Erhöhung der *gesamten Bone Mineral Density* (Total BMD) in der mit $0.1 \mu\text{g/kg}$ KG Calcitriol behandelten Fütterungsgruppe sowie in beiden per Schlundsonde behandelten Gruppen (siehe Abb. 6).

Die *kortikale und subkortikale Bone Mineral Density* (Cortical/Subcortical BMD) beweisen ebenfalls signifikante Zunahmen in den mit 0.05 und $0.1 \mu\text{g/kg}$ KG Calcitriol behandelten Gruppen bei der Applikation über Futter und per Schlundsonde. Ein signifikanter Zuwachs der *trabekulären Bone Mineral Density* (Trabecular BMD) zeigt sich bei der über

Schlundsonde mit 0.1 µg/kg KG Calcitriol behandelten Gruppe als auch bei den Tieren, die dieselbe Dosierung Calcitriol subkutan injiziert erhielten. Alle drei Parameter lassen einen signifikanten Effekt von Calcitriol im Vergleich mit den unbehandelten Kontrolltieren erkennen.

Am Tibiaschaft zeigt sich die Total BMD, die Cortical BMD und die *Cortical Thickness* in der mit 0.1 µg/kg KG Calcitriol per Schlundsonde behandelten Tieren signifikant erhöht. Calcitriol hat am Tibiaschaft einen signifikanten Effekt auf die Parameter Cortical BMD und Cortical Area (siehe Tab. 4B). Da die unbehandelte Fütterungsgruppe am Tibiaschaft, im Vergleich zu den anderen beiden Kontrollgruppen, besonders hohe Werte aufweist, ergeben sich hier Signifikanzen, die rein rechnerisch richtig, allerdings nicht aussagekräftig sind.

Tabelle 3: Dynamische histomorphometrische Parameter in der sekundären Spongiosa der proximalen Tibia und dem ersten Lendenwirbelkörper im Versuch 1

Gruppe		proximale Tibia			erster Lendenwirbelkörper		
		MPm/B.Pm [%]	MAR [µm/d]	BFR/B.Pm [µm ² /µm/d]	MPm/B.Pm [%]	MAR [µm/d]	BFR/B.Pm [µm ² /µm/d]
FUTER	Vehikel	5.8854 (2.1815)	1.7784 (0.4682)	0.0998 (0.0344)	5.1371 (2.3715)	1.6190 (0.1815)	0.0852 (0.0453)
	0.05µg/kg Calcitriol	7.0360 (2.5617)	1.8808 (0.3501)	0.1352 (0.0667)	11.9359 ^b (2.1772)	1.9151 ^a (0.1346)	0.2265 ^b (0.0289)
	0.10µg/kg Calcitriol	9.2953 (5.7117)	1.8014 (0.2579)	0.1643 ^a (0.0909)	16.3934 ^b (5.1457)	1.9629 ^a (0.1925)	0.3185 ^b (0.0883)
SONDE	Vehikel	5.3024 (2.1537)	1.7227 (0.1345)	0.0929 (0.0426)	3.4045 (1.5043)	1.6019 (0.1854)	0.0553 (0.0247)
	0.05µg/kg Calcitriol	5.1954 (2.5209)	1.6978 (0.1861)	0.0870 (0.0421)	6.5937 ^c (2.7877)	1.5935 (0.5218)	0.1088 (0.0697)
	0.10µg/kg Calcitriol	5.2050 (2.5945)	1.5912 (0.2373)	0.0832 (0.0458)	8.9376 ^d (3.1786)	1.8563 ^c (0.3158)	0.1680 ^d (0.0705)
SUBKUTAN	Vehikel	5.3515 (2.8749)	1.6159 (0.1200)	0.0886 (0.0533)	2.8248 (1.7075)	1.4509 (0.1897)	0.0418 (0.0296)
	0.05µg/kg Calcitriol	6.8841 (2.3329)	1.5341 (0.1868)	0.1042 (0.0306)	5.7262 (2.3249)	1.3777 (0.1109)	0.0805 (0.0360)
	0.10µg/kg Calcitriol	5.8930 (4.4070)	1.5455 (0.1315)	0.0885 (0.0608)	8.3170 ^e (3.2757)	1.6823 (0.2187)	0.1439 ^e (0.0730)
2-WayANOVA: Effekt von Calcitriol		n.s	n.s	n.s	p<0.0001	p<0.001	p<0.0001
2-WayANOVA: Effekt von Art d. Applikation		n.s	p<0.01	p<0.05	p<0.0001	p<0.001	p<0.0001
2-WayANOVA: Interaktion Calcitriol/Appl.		n.s	n.s	n.s	p<0.05	n.s	p<0.05
1-WayANOVA		n.s	n.s	n.s	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001

MPM: Mineralizing Perimeter; MAR: Mineral Apposition Rate; BFR: Bone Formation Rate

Werte: Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern)

a: p<0.05; b: p<0.0001 gegen Vehikel Futter; c: p<0.05; d: p<0.001 gegen Vehikel Schlundsonde;

e: p<0.001 gegen Vehikel subkutan (Least Significant Difference Test)

4.1.2.2 Knochenmineraldichte-Messungen am vierten Lendenwirbelkörper

Am vierten Lendenwirbelkörper erfolgte durch die Gaben von 0.05 und 0.1 µg/kg KG Calcitriol in den Fütterungs- sowie in den über die Schlundsonde behandelten Gruppen eine signifikante Zunahme der *gesamten Bone Mineral Density* (Total BMD) (siehe Abb. 7), der *kortikalen und subkortikalen Bone Mineral Density* (Cortical/Subcortical BMD) und der *trabekulären Bone Mineral Density* (Trabecular BMD) (siehe Tab. 4C). Hier ist ein signifikanter Effekt von Calcitriol im Vergleich zu den Kontrollgruppen feststellbar.

Tabelle 4A: Knochenmineraldichte-Messungen mittels pQCT an der linken proximalen Tibiametaphyse im Versuch 1

Gruppe		Total BMD [mg/cm ³]	Cortical/ Subcortical BMD [mg/cm ³]	Trabecular BMD [mg/cm ³]	Total Area [mm ²]	Cortical/ Subcortical Area [mm ²]	Trabecular Area [mm ²]
F U T T E R	Vehikel	788.3 (34.3)	1090.6 (33.2)	486.3 (54.8)	11.343 (1.671)	5.669 (0.832)	5.674 (0.839)
	0.05µg/kg Calcitriol	815.8 (30.7)	1123.1 ^b (36.4)	509.6 (32.8)	11.138 (1.405)	5.559 (0.703)	5.579 (0.703)
	0.10µg/kg Calcitriol	827.5 ^a (22.7)	1140.1 ^c (13.9)	515.5 (39.2)	10.560 (0.831)	5.276 (0.420)	5.284 (0.411)
S O N D E	Vehikel	786.7 (32.3)	1099.8 (34.8)	473.5 (36.8)	10.288 (0.954)	5.144 (0.472)	5.144 (0.482)
	0.05µg/kg Calcitriol	816.6 ^d (34.1)	1128.6 ^d (24.2)	504.5 (52.7)	10.620 (0.530)	5.311 (0.265)	5.309 (0.265)
	0.10µg/kg Calcitriol	839.1 ^e (22.6)	1133.3 ^d (14.6)	545.0 ^f (38.6)	10.481 (0.694)	5.208 (0.351)	5.210 (0.343)
S U B K U T	Vehikel	796.6 (23.3)	1120.5 (14.4)	472.4 (38.5)	10.526 (0.483)	5.265 (0.243)	5.261 (0.240)
	0.05µg/kg Calcitriol	804.0 (26.1)	1113.5 (18.8)	494.7 (37.2)	10.545 (0.595)	5.271 (0.299)	5.274 (0.296)
	0.10µg/kg Calcitriol	823.9 (35.5)	1116.6 (24.7)	531.2 ^g (50.7)	10.616 (0.706)	5.309 (0.357)	5.308 (0.349)
2-WayANOVA:Effekt von Calcitriol		p<0.0001	p<0.01	p<0.001	n.s	n.s	n.s
2-WayANOVA:Effekt von Art d. Appl.		n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
2-WayANOVA:Inter- aktion Calcitriol/Appl.		n.s	p<0.05	n.s	n.s	n.s	n.s
1-WayANOVA		p<0.01	p<0.01	p<0.05	n.s	n.s	n.s

Werte: Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern)

a: p<0.01; b: p<0.05; c: p<0.001 gegen Vehikel Futter; d: p<0.05; e: p<0.001; f: p<0.01 gegen Vehikel Schlundsonde; g: p<0.01 gegen Vehikel subkutan (Least Significant Difference Test)

Abb. 6 und 7: Einfluss von 1,25(OH)₂D₃ in unterschiedlichen Applikationsformen auf den Parameter Knochenmineraldichte (*Total Bone Mineral Density*) an der proximalen Tibia (Abb. 6) und dem vierten Lendenwirbelkörper (Abb. 7) im Versuch 1

Abb. 6

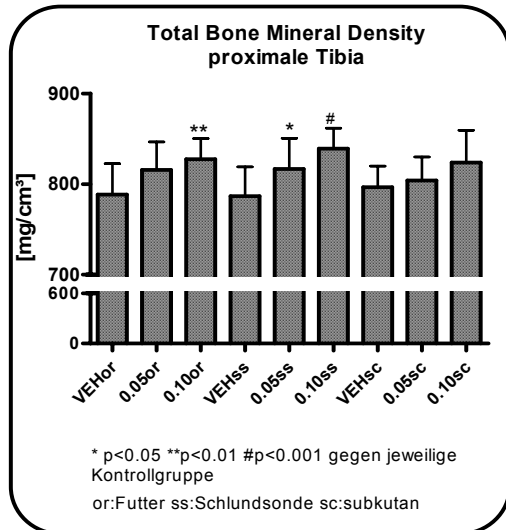


Abb. 7

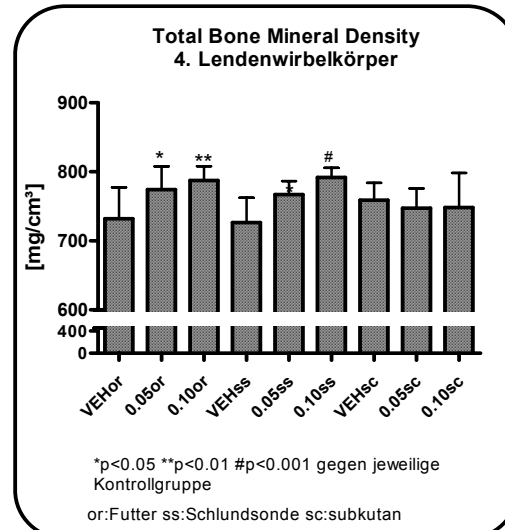


Tabelle 4B: Knochenmineraldichte-Messungen mittels pQCT am linken Tibiaschaft im Versuch 1

Gruppe		Total BMD	Total Area	Cortical BMD	Cortical Area	Cortical Thickness	Peri-cortical Perimeter	Endo-cortical Perimeter
		[mg/cm ³]	[mm ²]	[mg/cm ³]	[mm ²]	[mm]	[mm]	[mm]
F U T E R	Vehikel	1138.0 (30.7)	4.105 (0.214)	1354.9 (15.5)	3.218 (0.210)	0.612 (0.035)	7.180 (0.188)	3.335 (0.178)
	0.05µg/kg Calcitriol	1121.0 (18.2)	3.761 (0.190)	1362.6 (13.0)	2.889 (0.119)	0.567 (0.012)	6.873 (0.172)	3.308 (0.160)
	0.10µg/kg Calcitriol	1115.2 (20.6)	3.763 (0.149)	1364.8 (17.4)	2.848 (0.125)	0.555 (0.021)	6.875 (0.137)	3.388 (0.138)
S O N D E	Vehikel	1070.3 (23.8)	3.761 (0.147)	1346.3 (14.3)	2.755 (0.134)	0.529 (0.023)	6.874 (0.134)	3.553 (0.145)
	0.05µg/kg Calcitriol	1090.3 (25.6)	3.821 (0.180)	1355.0 (12.6)	2.856 (0.148)	0.549 (0.021)	6.928 (0.165)	3.480 (0.127)
	0.10µg/kg Calcitriol	1108.4 ^a (27.5)	3.766 (0.108)	1362.6 ^b (14.3)	2.838 (0.060)	0.552 ^b (0.015)	6.879 (0.099)	3.413 (0.160)
S U B K U T	Vehikel	1093.8 (18.5)	3.735 (0.122)	1353.2 (8.1)	2.805 (0.080)	0.547 (0.016)	6.850 (0.111)	3.416 (0.155)
	0.05µg/kg Calcitriol	1105.2 (20.6)	3.778 (0.078)	1358.1 (6.8)	2.859 (0.072)	0.556 (0.018)	6.890 (0.071)	3.396 (0.130)
	0.10µg/kg Calcitriol	1097.2 (19.7)	3.771 (0.159)	1362.9 (4.9)	2.809 (0.096)	0.542 (0.013)	6.883 (0.145)	3.475 (0.155)
2-WayANOVA: Effekt von Calcitriol		n.s	n.s	p<0.01	p<0.05	n.s	n.s	n.s
2-WayANOVA: Effekt von Art d. Applikation		p<0.0001	p<0.05	n.s	p<0.0001	p<0.0001	p<0.05	p<0.01
2-WayANOVA: Interaktion Calcitriol/Appl.		p<0.01	p<0.001	n.s	p<0.0001	p<0.0001	p<0.01	n.s
1-WayANOVA		p<0.0001	p<0.001	n.s	p<0.0001	p<0.0001	p<0.001	n.s

Werte: Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern)
a: p<0.01; b: p<0.05 gegen Vehikel Schlundsonde (Least Significant Difference Test)

Tabelle 4C: Knochenmineraldichte-Messungen mittels pQCT am vierten Lendenwirbelkörper im Versuch 1

Gruppe		Total BMD [mg/cm ³]	Cortical/ Subcortical BMD [mg/cm ³]	Trabecular BMD [mg/cm ³]	Total Area [mm ²]	Cortical/ Subcortical Area [mm ²]	Trabecular Area [mm ²]
F U T T E R	Vehikel	732.1 (45.2)	955.8 (32.4)	583.6 (54.2)	5.424 (0.210)	2.164 (0.081)	3.260 (0.129)
	0.05µg/kg Calcitriol	774.2 ^a (33.5)	990.5 ^b (25.8)	630.4 ^a (41.2)	5.435 (0.297)	2.173 (0.121)	3.263 (0.176)
	0.10µg/kg Calcitriol	787.6 ^b (20.5)	991.9 ^b (21.2)	651.9 ^b (22.2)	5.578 (0.269)	2.228 (0.112)	3.350 (0.158)
S O N D E	Vehikel	726.3 (36.0)	942.3 (26.4)	582.7 (46.5)	5.602 (0.382)	2.237 (0.156)	3.365 (0.227)
	0.05µg/kg Calcitriol	767.1 ^c (19.4)	977.6 ^c (16.5)	627.1 ^c (23.4)	5.627 (0.140)	2.247 (0.058)	3.380 (0.083)
	0.10µg/kg Calcitriol	791.8 ^d (13.9)	991.9 ^d (15.1)	658.7 ^d (16.4)	5.591 (0.187)	2.235 (0.075)	3.357 (0.113)
S U B K U T	Vehikel	758.8 (25.2)	976.4 (21.9)	614.3 (28.4)	5.557 (0.155)	2.217 (0.061)	3.340 (0.093)
	0.05µg/kg Calcitriol	747.2 (28.9)	961.3 (22.2)	605.0 (37.5)	5.490 (0.356)	2.192 (0.144)	3.299 (0.212)
	0.10µg/kg Calcitriol	748.1 (50.4)	968.0 (33.6)	602.0 62.9	5.292 (0.146)	2.111 (0.062)	3.181 (0.085)
2-WayANOVA: Effekt von Calcitriol		p<0.01	p<0.01	p<0.01	n.s	n.s	n.s
2-WayANOVA: Effekt von Art d. Applikation		n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
2-WayANOVA: Interaktion Calcitriol/Appl.		p<0.05	p<0.01	p<0.05	n.s	n.s	n.s
1-WayANOVA		p<0.01	p<0.001	p<0.01	n.s	n.s	n.s

Werte: Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern)

a: p<0.05; b: p<0.01 gegen Vehikel Futter; c: p<0.05; d: p<0.001; e: p<0.01 gegen Vehikel Schlundsonde (Least Significant Difference Test)

4.1.3 Serum- und Urinparameter zur Analyse von Veränderungen im Stoffwechsel durch die Gabe von 1,25(OH)₂D₃

Die Ergebnisse der Serum- und Urinparameter ergänzen die bereits erwähnten Resultate und liefern weiteren Aufschluss über die durch unterschiedliche Calcitrioldosen hervorgerufenen Veränderungen im Stoffwechsel des Organismus allgemein und über den Knochenstoffwechsel im speziellen.

4.1.3.1 Serumparameter im Versuch 1

Bei den behandelten Tieren der Fütterungs- und Schlundsondengruppe tritt eine signifikante Erniedrigung der Alkalischen Phosphatase (ALP) durch die Gabe von 0.05 und 0.1 µg/kg KG Calcitriol im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen auf. Keinen signifikanten Effekt durch Calcitriol zeigen die Parameter Albumin, Harnstoff und Kreatinin. Im Vergleich mit den unbehandelten Gruppen weisen jedoch Kalziumblutspiegel und PTH-Blutspiegel

signifikante Unterschiede durch die Wirkung von Calcitriol auf. Bei den behandelten Gruppen steigt Kalzium bei Calcitriol-Fütterung und Gabe per Schlundsonde leicht um ein bis zwei Zehntel an, verbleibt aber im physiologischen Referenzbereich um 2.6 mmol/l. Der PTH-Blutspiegel fällt in allen behandelten Gruppen erwartungsgemäß ab. Ein signifikanter Abfall ist allerdings allein in der Injektionsgruppe erkennbar (siehe Tab. 5A).

4.1.3.2 Urinparameter im Versuch 1

Im Vergleich der Verhältnisse von Phosphor und Kreatinin – noch deutlicher von Kalzium und Kreatinin – zeigt sich gegenüber den unbehandelten Tieren eine signifikant verstärkte Exkretion von Kalzium und Phosphor über die Nieren in allen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ behandelten Gruppen (siehe Tab. 5B).

Das DPD-Kreatinin-Verhältnis, das über die osteoklastäre Tätigkeit am Knochen Auskunft gibt, zeigt nur in der Fütterungsgruppe eine erkennbare Abnahme. Bei den mit $0.1 \mu\text{g/kg KG}$ Calcitriol gefütterten Tieren ist diese signifikant. Während in der Schlundsondengruppe keine deutlichen Veränderungen in Bezug zu der Kontrollgruppe vorliegen, steigt das DPD-Kreatinin-Verhältnis bei den Tieren, die Calcitriol subkutan verabreicht erhielten, sogar an.

Tabelle 5A: Serumparameter aus dem Versuch 1

Gruppe	ALP [U/l]	Albumin [g/l]	Harnstoff [mmol/l]	Kreatinin [$\mu\text{mol/l}$]	Phosphor [mmol/l]	Kalzium [mmol/l]	PTH [pg/ml]
F	74.5	40.7	7.1	35.3	2.1	2.5	176.7
U	(11.8)	(1.8)	(0.9)	(6.0)	(0.2)	(0.1)	(137.8)
T	61.9 ^a	41.2	7.1	36.2	2.0	2.6	48.4
T	(10.7)	(1.9)	(0.6)	(3.2)	(0.3)	(0.1)	(43.0)
E	60.9 ^a	41.7	7.0	37.3	2.3	2.7 ^b	64.1
R	(10.7)	(1.5)	(0.3)	(2.9)	(2.4)	(0.2)	(50.5)
S	73.3	39.7	6.7	38.3	2.4	2.5	147.2
O	(22.4)	(1.4)	(1.1)	(3.0)	(0.4)	(0.1)	(44.7)
N	63.9 ^c	40.5	7.3	38.9	2.4	2.6	92.1
D	(11.3)	(1.7)	(0.7)	(2.3)	(0.3)	(0.1)	(71.8)
E	63.4 ^c	40.6	6.9	39.0	2.6	2.6 ^e	76.4
	(6.6)	(1.7)	(0.8)	(3.0)	(0.3)	(0.1)	(48.5)
S	65.1	40.8	7.9	40.8	2.9	2.7	381.8
U	(8.4)	(5.5)	(0.7)	(3.8)	(0.8)	(0.2)	(324.7)
B	68.5	41.4	6.5	39.0	2.4	2.6	184.7 ^d
K	(10.3)	(2.2)	(0.5)	(1.9)	(0.6)	(0.1)	(297.2)
U	68.1	41.2	6.7	38.6	2.3 ^d	2.6	67.1 ^e
T	(11.2)	(1.2)	(1.0)	(8.0)	(0.1)	(0.1)	(49.3)
2-WayANOVA: Effekt von Calcitriol	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	p<0.05	p<0.005
2-WayANOVA: Effekt von Art d. Applikation	n.s	n.s	n.s	p<0.05	p<0.05	n.s	p<0.05
2-WayANOVA: Interaktion Calcitriol/Appl.	n.s	n.s	p<0.05	n.s	n.s	n.s	n.s
1-WayANOVA	n.s	n.s	p<0.05	n.s	p<0.05	p<0.05	p<0.005

Werte: Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern)

a: p<0.05; b: p<0.01 gegen Vehikel Futter; c: p<0.05 gegen Vehikel Schlundsonde; d: p<0.05; e: p<0.001 gegen Vehikel subkutan (Least Significant Difference Test)

Tabelle 5B: Urinparameter aus dem Versuch 1

Gruppe	Kreatinin [mM]	Phosphor/ Kreatinin [mM/mM]	Kalzium/ Kreatinin [mM/mM]	DPD/ Kreatinin [nM/mM]	
F U T E R	Vehikel	5.79 (3.15)	3.47 (1.49)	0.38 (0.12)	47.14 (8.77)
	0.05µg/kg Calcitriol	5.03 (2.52)	6.56 ^a (1.32)	2.55 ^a (1.07)	37.95 (8.19)
	0.10µg/kg Calcitriol	4.86 (2.63)	5.51 ^b (1.30)	2.38 ^a (0.50)	32.84 ^c (7.16)
S O N D E	Vehikel	6.86 (4.71)	2.86 (1.00)	0.50 (0.22)	46.35 (11.02)
	0.05µg/kg Calcitriol	4.57 (1.50)	6.17 ^c (1.54)	1.79 ^c (0.56)	43.39 (5.69)
	0.10µg/kg Calcitriol	3.78 ^d (1.87)	6.55 ^c (1.20)	2.51 ^c (0.61)	45.89 (16.62)
S U B K U T	Vehikel	6.46 (1.51)	3.58 (1.00)	0.56 (0.23)	47.81 (1.92)
	0.05µg/kg Calcitriol	4.36 (2.50)	4.54 (0.85)	1.19 (0.43)	63.60 ^f (9.26)
	0.10µg/kg Calcitriol	5.54 (3.39)	5.78 ^f (2.04)	1.88 ^g (0.68)	53.57 (9.78)
2-WayANOVA: Effekt von Calcitriol		n.s	p<0.0001	p<0.0001	n.s
2-WayANOVA: Effekt von Art d. Applikation		n.s	n.s	p<0.005	p<0.0001
2-WayANOVA: Interaktion Calcitriol/Appl.		n.s	p<0.05	p<0.005	p<0.005
1-WayANOVA		n.s	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001

Werte: Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern)

a: p<0.0001; b: 0.01; c: p<0.005 gegen Vehikel Futter; d: p<0.05; e: p<0.0001 gegen Vehikel Schlundsonde; f: p<0.005; g: p<0.0001 gegen Vehikel subkutan (Least Significant Difference Test)

4.2 VERSUCH 2: DIE SKELETTWIRKUNG VON CALCITRIOL AN PARATHYREOIDEKTOMIERTEN UND PTH-SUBSTITUIERTEN RATTEN

Ziel des zweiten Versuchs war es, die Effekte von Calcitriol bei parathyreidektomierten Ratten mit und ohne Substitution von Parathormon zu studieren. Die aus dem ersten Versuch gewonnenen Erkenntnisse über die Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ je nach Applikationsweise haben wesentlich zur Entscheidung beigetragen, in diesem Versuch Calcitriol eingemischt in das Futter zu verabreichen. Analog zur Fütterungsgruppe im ersten Versuch wurden entweder nur der Trägerstoff (Vehikel, VEH) oder zwei unterschiedliche Dosierungen von Calcitriol an die Tiere verfüttert (0.05 und 0.1 µg/kg KG). Drei Hauptgruppen an Tieren fanden im zweiten Versuch Verwendung: erstens scheinoperierte

Tiere, so genannte SHAM-Tiere, zweitens parathyreoidektomierte Ratten ohne PTH-Substitution (PTX-Tiere) und schließlich PTX-Tiere mit PTH-Substitution (PTX-PTH Tiere).

4.2.1 Histomorphometrische Messungen an der proximalen Tibiametaphyse und dem ersten Lendenwirbelkörper

4.2.1.1 Statische histomorphometrische Messungen an der sekundären Spongiosa der proximalen Tibiametaphyse

Die *Bone Area* (B.Ar/T.Ar) aller mit Calcitriol behandelten Gruppen im Versuch 2 zeigt keine signifikanten Zunahmen im Bezug auf die unbehandelten Kontrollgruppen. In der SHAM-Gruppe ist zwar eine dosisbezogene Zunahme der *Bone Area* (B.Ar/T.Ar) erkennbar, allerdings ist diese nicht signifikant. Der einzig als signifikant anzusehende Effekt von Calcitriol an der proximalen Tibiametaphyse besteht in der Zunahme des *Bone Perimeter* (B.Pm/T.Ar) sowohl in der SHAM- als auch in der PTX-PTH-Gruppe bei der Gabe von 0.05 und 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG Calcitriol (siehe Tab. 6A). Die *Trabecular Area* (B.Ar/N.Tb) weist in der PTX-Gruppe bei der Fütterung mit 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG Calcitriol einen signifikanten Zuwachs auf (siehe Abb. 8). Im Vergleich aller Gruppen mit den Kontrolltieren zeigt allerdings Calcitriol auch hier keinen signifikanten Effekt.

Abb. 8 und 9: Einfluss von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verabreicht über das Futter auf den Parameter *Bone Area* (B.Ar/N.Tb) bei SHAM-, PTX- und PTX-PTH-Tiere in der sekundären Spongiosa der proximalen Tibiametaphyse (Abb. 8) und des ersten Lendenwirbelkörpers (Abb. 9) im Versuch 2

Abb. 8

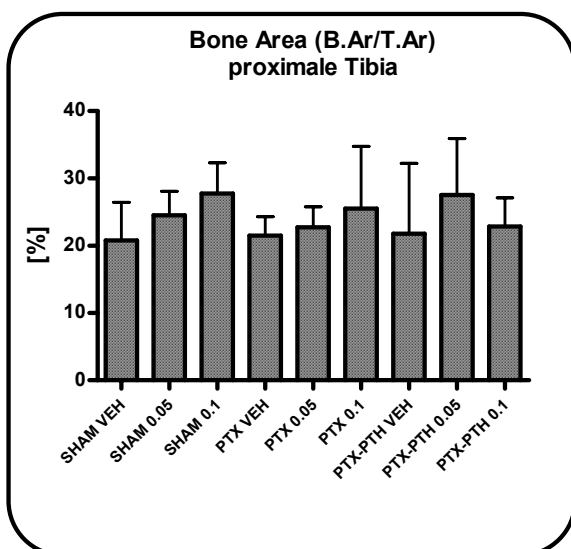
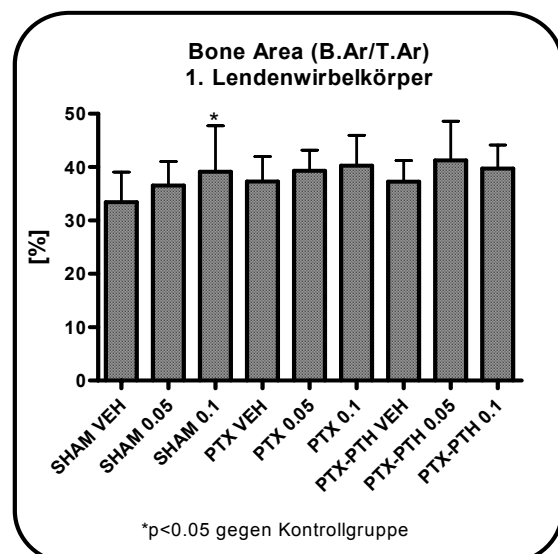


Abb. 9



4.2.1.2 Statische histomorphometrische Messungen an der sekundären Spongiosa des ersten Lendenwirbelkörpers

Am ersten Lendenwirbelkörper zeigt weder Calcitriol noch der PTH-Status der drei Hauptgruppen einen statistisch signifikanten Effekt am Knochen (siehe Tab. 6B). Im direkten Vergleich der mit Calcitriol behandelten Tiere in der SHAM-, PTX-, und PTX-PTH-Gruppe weist die *Trabecular Area* (B.Ar/N.Tb) in der mit 0.1 µg/kg KG Calcitriol gefütterten PTX-Gruppe eine signifikante Zunahme auf (siehe Abb. 9).

Tabelle 6A: Statische histomorphometrische Parameter in der sekundären Spongiosa der proximalen Tibiametaphyse im Versuch 2

Gruppe	Bone Area (B.Ar/T.Ar) [%]	Bone Perimeter (B.Pm/T.Ar) [mm/mm ²]	Trab. Width (Tb.Wi) [µm]	Trab. Number (N.Tb/T.Ar) [1/mm ²]	Trab. Area (B.Ar/N.Tb) [mm ²]	Trab. Separation (µm) [mm ²]	
S H A M	Vehikel	20.7837 (5.6407)	5.2559 (0.0149)	78.0762 (6.5405)	4.1897 (1.1211)	0.0515 (0.0149)	252.7840 (84.0281)
	0.05µg/kg Calcitriol	24.5291 (3.5496)	6.1853 ^a (0.7439)	79.1434 (4.7703)	4.3313 (0.7677)	0.0583 (0.0131)	195.2550 (28.3669)
	0.10µg/kg Calcitriol	27.7658 (4.5415)	6.7608 ^b (1.4451)	92.5285 (18.2236)	4.7455 (2.1661)	0.0740 (0.0243)	237.4483 (141.6930)
P T X	Vehikel	21.4962 (2.7891)	5.7531 (0.5238)	74.5589 (6.4397)	4.5091 (0.6449)	0.0490 (0.0100)	216.9093 (27.8126)
	0.05µg/kg Calcitriol	22.7342 (3.0345)	5.8038 (0.0219)	78.2861 (5.8477)	3.7596 (0.8885)	0.0660 (0.0219)	212.1992 (32.5886)
	0.10µg/kg Calcitriol	25.5140 (9.2390)	5.6695 (0.7635)	87.9014 (22.1758)	3.3227 (1.3745)	0.1072 ^c (0.0831)	212.9013 (53.7556)
P T X P T H	Vehikel	21.7798 (10.4480)	5.1045 (0.9530)	82.8512 (25.4067)	4.0223 (1.1355)	0.0722 (0.0824)	253.0709 (72.1511)
	0.05µg/kg Calcitriol	27.5330 (8.3644)	6.4401 ^d (0.8839)	85.2155 (22.5073)	4.1796 (2.1602)	0.1067 (0.1006)	180.5856 ^e (36.8768)
	0.10µg/kg Calcitriol	22.8328 (4.2789)	6.0617 ^e (0.8887)	75.0292 (4.2789)	4.3583 (0.7714)	0.0536 (0.0115)	205.1278 (40.1362)
2-WayANOVA: Effekt von Calcitriol	n.s	p<0.005	n.s	n.s	n.s	n.s	
2-WayANOVA: PTH-Status	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	
2-WayANOVA: Inter- aktion Calcitriol/PTH	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	
1-WayANOVA	n.s	p<0.05	n.s	n.s	n.s	n.s	

Werte: Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern)

a: p<0.05; b: p<0.005 gegen SHAM Vehikel; c: p<0.05; gegen PTX Vehikel; d: p<0.005; e: p<0.05 gegen PTX-PTH Vehikel (Least Significant Difference Test)

Tabelle 6B: Statische histomorphometrische Parameter in der sekundären Spongiosa des ersten Lendenwirbelkörpers im Versuch 2

Gruppe	Bone Area (B.Ar/T.Ar) [%]	Bone Perimeter (B.Pm/T.Ar) [mm/mm ²]	Trab. Width (Tb.Wi) [µm]	Trab. Number (N.Tb/T.Ar) [1/mm ²]	Trab. Area (B.Ar/N.Tb) [mm ²]	Trab. Separation (µm) [mm ²]	
S H A M	Vehikel	33.4448 (5.6183)	7.4843 (0.9293)	88.8948 (5.9958)	2.9623 (0.4598)	0.1230 (0.0410)	143.3094 (32.1476)
	0.05µg/kg Calcitriol	36.5574 (4.5120)	7.7300 (0.0383)	94.6070 (10.8360)	2.6405 (0.4931)	0.1530 (0.0383)	130.9682 (20.2979)
	0.10µg/kg Calcitriol	39.1255 ^a (8.6242)	8.3576 (2.2385)	106.4806 ^a (28.1720)	3.5601 (1.8488)	0.1460 (0.0622)	163.8876 (79.7073)
P T X	Vehikel	37.3179 (4.6443)	7.8759 (0.8646)	95.1072 (10.9230)	3.1733 (0.5777)	0.1263 (0.0264)	127.0883 (17.0257)
	0.05µg/kg Calcitriol	39.3059 (3.8863)	8.0062 (0.2767)	98.0458 (9.0282)	2.8058 (0.6023)	0.1549 (0.0433)	119.6921 (10.1832)
	0.10µg/kg Calcitriol	40.2640 (5.7013)	7.7543 (0.5511)	104.7445 (20.1806)	2.3641 (0.8087)	0.2361 ^b (0.1698)	121.3249 (11.3871)
P T X P T H	Vehikel	37.2521 (3.9697)	7.6972 (0.4355)	96.7535 (8.5884)	2.8040 (0.5037)	0.1550 (0.0468)	128.8623 (14.0554)
	0.05µg/kg Calcitriol	41.2762 (7.3113)	8.0197 (0.4118)	103.1732 (18.2958)	2.6532 (1.0701)	0.1974 (0.1132)	115.5250 (16.4390)
	0.10µg/kg Calcitriol	39.7488 (4.4176)	8.1890 (0.3667)	96.9615 (9.2941)	3.2532 (0.5421)	0.1321 (0.0319)	116.2308 (12.0877)
2-WayANOVA: Effekt von Calcitriol	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	
2-WayANOVA: PTH-Status	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	p<0.01	
2-WayANOVA: Inter- aktion Calcitriol/PTH	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	
1-WayANOVA	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	

Werte: Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern)

a: p<0.05 gegen SHAM Vehikel; b: p<0.01 gegen PTX Vehikel (Least Significant Difference Test)

4.2.1.3 Dynamische histomorphometrische Parameter in der sekundären Spongiosa der proximalen Tibiametaphyse

In der proximalen Tibiametaphyse nimmt die *Bone Formation Rate* (BFR/B.Pm) in der mit 0.1 µg/kg KG Calcitriol gefütterten PTX-Gruppe signifikant zu. In der SHAM-Gruppe ist keine dosisbedingte Steigerung des Knochenneuzuwachses erkennbar, in der PTX-PTH-Gruppe ein geringer (siehe Abb. 10). Der *Mineralizing Perimeter* (MPm/B.Pm) weist in allen Gruppen die gleichen Verhältnisse wie die *Bone Formation Rate* auf. Die *Mineral Apposition Rate* (MAR) zeigt in allen drei Hauptgruppen keinen nennenswerten Unterschied zu den Kontrollen (siehe Tab. 7).

4.2.1.4 Dynamische histomorphometrische Parameter in der sekundären Spongiosa des ersten Lendenwirbelkörpers

Am vierten Lendenwirbelkörper erfährt die *Bone Formation Rate* (BFR/B.Pm) in der SHAM-Gruppe und in der PTX-Gruppe bei Fütterung von 0.1 µg/kg KG Calcitriol eine signifikante Zunahme. In der PTX-PTH-Gruppe ist eine Steigerung erkennbar, doch ist diese nicht signifikant (siehe Abb. 11). Analog zur Tibiametaphyse weist auch hier der *Mineralizing Perimeter* (MPm/B.Pm) die gleichen Verhältnisse wie die BFR auf.

Bei der *Mineral Apposition Rate* (MAR) divergieren die Werte der drei Kontrollgruppen stark; eine tendenzielle Zunahme der MAR in den behandelten Gruppen ist allerdings erkennbar. Im Vergleich der behandelten Tiere mit den Kontrolltieren zeigt Calcitriol bei allen drei Parametern einen signifikanten Effekt (siehe Tab. 7).

Tabelle 7: Dynamische histomorphometrische Parameter in der sekundären Spongiosa der proximalen Tibia und des ersten Lendenwirbelkörpers im Versuch 2

Gruppe	proximale Tibiametaphyse			erster Lendenwirbelkörper			
	MPM [%]	MAR [µm/d]	BFR/B.Pm [µm ² /µm/d]	MPM [%]	MAR [µm/d]	BFR/B.Pm [µm ² /µm/d]	
S H A M	Vehikel	8.2065 (8.4410)	1.7235 (0.1759)	0.1500 (0.1626)	6.9137 (3.9358)	1.3961 (0.2239)	0.1033 (0.0713)
	0.05µg/kg Calcitriol	6.5268 (4.7592)	1.5684 (0.2605)	0.1058 (0.0778)	8.7270 (3.0179)	1.5450 (0.1176)	0.1347 (0.0468)
	0.10µg/kg Calcitriol	10.4992 (10.8802)	1.7202 (0.1557)	0.1760 (0.1767)	12.6274 ^a (5.5579)	1.5339 (0.2762)	0.1961 ^a (0.0968)
P T X	Vehikel	1.8719 (0.9668)	1.3206 (0.1681)	0.0259 (0.0148)	4.3774 (3.4565)	1.2369 (0.1269)	0.0554 (0.0437)
	0.05µg/kg Calcitriol	4.4838 (4.0223)	1.3541 (0.2136)	0.0647 (0.0653)	8.6896 (2.5112)	1.4799 ^b (0.2532)	0.1319 (0.0521)
	0.10µg/kg Calcitriol	18.1515 ^c (17.1357)	1.5389 (0.1602)	0.2824 ^c (0.2571)	17.4787 ^d (9.0384)	1.7305 ^d (0.2398)	0.3099 ^d (0.1794)
P T X P T H	Vehikel	5.1802 (3.3657)	2.0071 (0.4947)	0.1042 (0.0666)	4.9879 (3.8134)	1.5675 (0.2908)	0.0834 (0.0717)
	0.05µg/kg Calcitriol	8.0656 (10.9835)	1.8431 (0.4975)	0.1719 (0.1917)	7.1414 (7.0093)	1.5918 (0.1752)	0.1116 (0.1063)
	0.10µg/kg Calcitriol	6.1106 (3.5415)	1.9611 (0.3319)	0.1207 (0.0699)	8.2889 (4.5436)	1.7117 (0.1759)	0.1452 (0.0824)
2-WayANOVA: Effekt von Calcitriol		p<0.05	n.s	p<0.05	p<0.0001	p<0.001	p<0.0001
2-WayANOVA: PTH-Status		n.s	p<0.0001	n.s	n.s	n.s	n.s
2-WayANOVA: Interaktion Calcitriol/PTH		n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	p<0.05
1-WayANOVA		p<0.05	p<0.0001	p<0.05	p<0.0001	p<0.001	p<0.0001

Werte: Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern)

a: p<0.005 gegen PTX Vehikel; b: 0.05; c: 0.001; d: 0.0001 gegen PTX Vehikel (Least Significant Difference Test)

Abb. 10 und 11: Einfluss von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verabreicht über das Futter auf den Parameter *Bone Formation Rate* (BFR) bei SHAM-, PTX- und PTX-PTH Tieren in der sekundären Spongiosa der proximalen Tibiametaphyse (Abb. 10) und des ersten Lendenwirbelkörpers (Abb. 11) im Versuch 2

Abb. 10

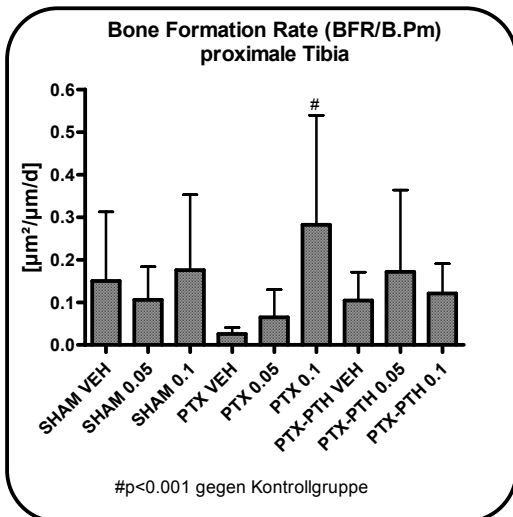
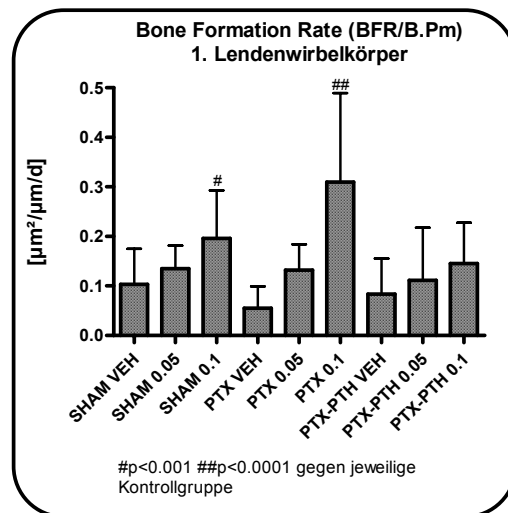


Abb. 11



4.2.2 Knochenmineraldichte-Messungen mittels peripherer quantitativer Computer Tomographie (pQCT) an der linken Tibia und dem vierten Lendenwirbelkörper im Versuch 2

4.2.2.1 Knochenmineraldichte-Messungen an der linken Tibia

Die pQCT-Messung an der proximalen Tibia zeigt eine signifikante Erhöhung der gesamten *Bone Mineral Density* (Total BMD) und der *trabekulären Bone Mineral Density* (Trabecular BMD) in der mit $0.1 \mu\text{g/kg KG}$ Calcitriol gefütterten PTX-Gruppe im direkten Vergleich mit der Kontrollgruppe (siehe Tab. 8). Calcitriol hat allerdings keinen signifikanten Effekt in der Gegenüberstellung der behandelten zu den nicht behandelten Gruppen in allen gemessenen Parametern an der proximalen Tibiametaphyse.

Am Tibiaschaft hingegen liegt ein signifikanter Effekt von Calcitriol auf die Zunahme der Kortikalisdicke (*Cortical Thickness*) vor.

4.2.2.2 Knochenmineraldichte-Messungen am vierten Lendenwirbelkörper

Am vierten Lendenwirbelkörper verrät die pQCT-Messung eine signifikante Erhöhung der *gesamten Bone Mineral Density* (total BMD) und der *trabekulären Bone Mineral Density* (Trabecular BMD) in der mit 0.1µg/kg KG Calcitriol gefütterten PTX-Gruppe im direkten Vergleich mit der Kontrollgruppe. Allerdings zeigen die einfachen und zweifachen ANOVA Verfahren keine signifikante Wirkung von Calcitriol am Lendenwirbelkörper auf.

Tabelle 8A: Knochenmineraldichte-Messungen mittels pQCT an der linken proximalen Tibiametaphyse im Versuch 2

Gruppe		Total BMD [mg/cm ³]	Cortical/ Subcortical BMD [mg/cm ³]	Trabecular BMD [mg/cm ³]	Total Area [mm ²]	Cortical/ Subcortical Area [mm ²]	Trabecular Area [mm ²]
S H A M	Vehikel	831.8 (49.0)	1142.1 (21.4)	521.4 (79.7)	10.829 (0.596)	5.415 (0.296)	5.414 (0.300)
	0.05µg/kg Calcitriol	824.3 (36.3)	1103.2 (119.2)	548.1 (65.8)	10.415 (2.924)	5.166 (1.579)	5.249 (1.345)
	0.10µg/kg Calcitriol	838.9 (37.9)	1144.3 (22.1)	533.8 (60.5)	11.014 (1.080)	5.505 (0.543)	5.509 (0.538)
P T X	Vehikel	823.6 (16.8)	1140.3 (17.0)	506.0 (31.4)	11.005 (0.361)	5.510 (0.179)	5.495 (0.182)
	0.05µg/kg Calcitriol	853.4 (44.1)	1152.4 (19.4)	554.5 (71.8)	11.176 (0.769)	5.588 (0.387)	5.589 (0.382)
	0.10µg/kg Calcitriol	904.7 ^a (80.3)	1156.6 (22.0)	653.3 ^a (140.7)	10.579 (0.451)	5.284 (0.212)	5.295 (0.203)
P T X P T H	Vehikel	842.2 (99.1)	1135.6 (30.7)	548.7 (177.0)	11.364 (1.341)	5.683 (0.670)	5.681 (0.672)
	0.05µg/kg Calcitriol	827.3 (84.7)	1127.6 (38.7)	526.9 (131.8)	11.314 (0.734)	5.658 (0.369)	5.656 (0.365)
	0.10µg/kg Calcitriol	811.4 (42.8)	1117.9 (28.8)	505.6 (60.8)	11.656 (0.626)	5.823 (0.319)	5.834 (0.307)
2-WayANOVA: Effekt von Calcitriol		n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
2-WayANOVA: PTH-Status		n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
2-WayANOVA: Inter- aktion Calcitriol/PTH		n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
1-WayANOVA		n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s

Werte: Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern)
a: p<0.01 gegen PTX Vehikel (Least Significant Difference Test)

Abb. 12 und 13: Einfluss von 1,25(OH)₂D₃ verabreicht über das Futter auf den Parameter *Total Bone Mineral Density* (Total BMD) bei SHAM-, PTX- und PTX-PTH Tieren in der sekundären Spongiosa der proximalen Tibiametaphyse (Abb. 12) und des ersten Lendenwirbelkörpers (Abb. 13) im Versuch 2

Abb. 12

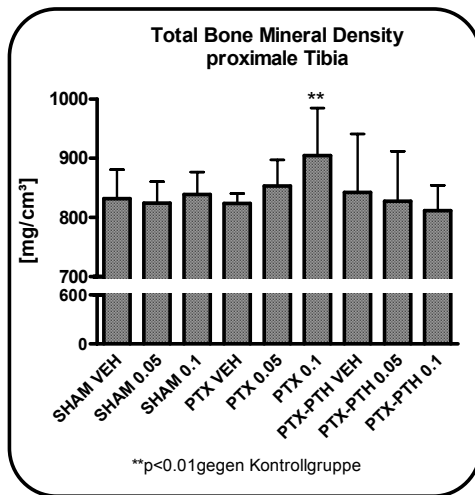


Abb. 13

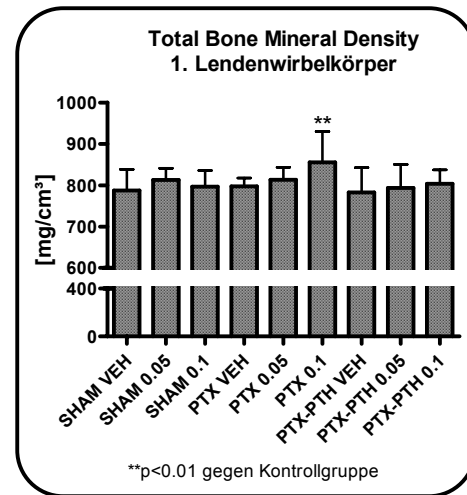


Tabelle 8B: Knochenmineraldichte-Messungen mittels pQCT am Schaft der linken Tibia im Versuch 2

Gruppe		Total BMD	Total Area	Cortical BMD	Cortical Area	Cortical Thickness	Peri-cortical Perimeter	Endo-cortical Perimeter
		[mg/cm ³]	[mm ²]	[mg/cm ³]	[mm ²]	[mm]	[mm]	[mm]
S H A M	Vehikel	1094.7 (14.1)	3.774 (0.154)	1370.2 (6.9)	2.776 (0.131)	0.532 (0.018)	6.885 (0.140)	3.540 (0.080)
	0.05µg/kg Calcitriol	1105.7 (15.3)	3.815 (0.172)	1372.6 (11.5)	2.856 (0.132)	0.550 (0.019)	6.923 (0.156)	3.468 (0.141)
	0.10µg/kg Calcitriol	1090.9 (11.1)	3.769 (0.209)	1370.7 (11.3)	2.774 (0.165)	0.532 (0.019)	6.880 (0.188)	3.535 (0.095)
P T X	Vehikel	1105.0 (24.0)	3.681 (0.094)	1368.7 (9.0)	2.760 (0.085)	0.542 (0.021)	6.801 (0.087)	3.399 (0.164)
	0.05µg/kg Calcitriol	1112.6 (23.5)	3.780 (0.208)	1369.4 (9.7)	2.859 (0.107)	0.556 (0.015)	6.890 (0.192)	3.395 (0.234)
	0.10µg/kg Calcitriol	1119.1 (34.2)	3.688 (0.092)	1364.2 (8.9)	2.794 (0.087)	0.551 (0.027)	6.807 (0.086)	3.346 (0.206)
P T X P T H	Vehikel	1095.4 (16.7)	3.733 (0.094)	1373.7 (13.2)	2.739 (0.099)	0.528 (0.019)	6.848 (0.087)	3.532 (0.102)
	0.05µg/kg Calcitriol	1100.7 (20.9)	3.804 (0.175)	1365.2 (8.5)	2.845 (0.103)	0.548 ^a (0.010)	6.912 (0.159)	3.468 (0.152)
	0.10µg/kg Calcitriol	1104.5 (22.2)	3.766 (0.101)	1370.7 (7.3)	2.814 (0.105)	0.545 (0.021)	6.879 (0.092)	3.358 (0.123)
2-WayANOVA: Effekt von Calcitriol		n.s.	n.s.	n.s.	p<0.05	p<0.05	n.s.	n.s.
2-WayANOVA: PTH-Status		p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0.01
2-WayANOVA: Interaktion Calcitriol/PTH		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1-WayANOVA		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.

Werte: Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern)

a: p<0.05 gegen PTX-PTH Vehikel (Least Significant Difference Test)

4.2.3 Serum- und Urinparameter zur Analyse von Veränderungen im Stoffwechsel durch den veränderten PTH-Status und durch die Verfütterung von 1,25(OH)₂D₃ im Versuch 2

4.2.3.1 Serumparameter im Versuch 2

Die Alkalische Phosphatase (ALP) fällt in allen mit Calcitriol behandelten Gruppen ab, in der SHAM- und PTX-PTH Gruppe signifikant. Analog zu den Resultaten aus Versuch 1 sind auch in diesem Versuch keine erkennbaren Unterschiede im Albumin-Blutspiegel vorhanden. Der Blutkalziumspiegel bleibt in der SHAM-Gruppe trotz Calcitriol-Fütterung unverändert. In der PTX-Gruppe sinkt er erwartungsgemäß deutlich ab, in der mit PTH substituierten Gruppe tritt bei Fütterung von Calcitriol eine erkennbare Zunahme hin zur Hyperkalzämie ein (siehe Tab. 9A). Der Serumparathormonspiegel zeigt eindeutig die durch die Parathyreoidektomie und die Calcitriol-Zufütterung hervorgerufenen Unterschiede auf: in der SHAM-Gruppe sinkt der PTH-Spiegel bei mit 0.05 und 0.1 µg/kg Kg Calcitriol behandelten Tieren ab; die Tiere der PTX-Gruppe zeigen alle einen deutlich verminderten PTH-Spiegel. Die Tiere mit PTH-Substitution lassen in etwa den gleichen PTH-Spiegel erkennen wie die SHAM Vehikel Gruppe (siehe Abb. 12).

Abb. 14: PTH-Blutspiegel nach zweiwöchiger Versuchsdauer mit Substitution von rPTH (1-34) (Gruppen 7 - 9) und oraler Gabe von 1,25(OH)₂D₃ im Versuch 2

Abb.14

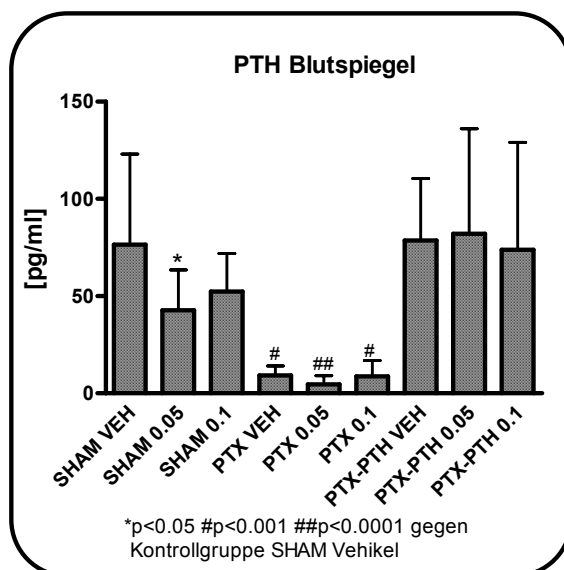


Tabelle 8C: Knochenmineraldichte-Messungen mittels pQCT am vierten Lendenwirbelkörper im Versuch 2

Gruppe		Total BMD [mg/cm ³]	Cortical/ Subcortical BMD [mg/cm ³]	Trabecular BMD [mg/cm ³]	Total Area [mm ²]	Cortical/ Subcortical Area [mm ²]	Trabecular Area [mm ²]
S H A M	Vehikel	787.2 (51.0)	996.5 (27.5)	648.2 (68.3)	5.342 (0.191)	2.133 (0.082)	3.208 (0.110)
	0.05µg/kg Calcitriol	813.0 (27.9)	1004.1 (21.3)	685.6 (33.9)	5.543 (0.261)	2.217 (0.103)	3.326 (0.158)
	0.10µg/kg Calcitriol	796.8 (38.8)	1001.5 (19.2)	660.7 (54.1)	5.505 (0.165)	2.198 (0.062)	3.308 (0.105)
P T X	Vehikel	797.0 (20.6)	1004.6 (20.8)	659.4 (21.4)	5.553 (0.333)	2.214 (0.132)	3.338 (0.201)
	0.05µg/kg Calcitriol	813.5 (29.8)	1013.7 (24.4)	680.5 (34.8)	5.495 (0.380)	2.194 (0.149)	3.301 (0.231)
	0.10µg/kg Calcitriol	855.7 ^a (74.5)	1024.3 (29.8)	743.7 ^b (106.0)	5.366 (0.424)	2.142 (0.168)	3.224 (0.256)
P T X P T H	Vehikel	782.4 (59.9)	980.9 (33.6)	650.8 (78.4)	5.576 (0.202)	2.222 (0.080)	3.354 (0.122)
	0.05µg/kg Calcitriol	793.4 (56.9)	986.2 (33.9)	665.0 (73.4)	5.583 (0.351)	2.233 (0.142)	3.351 (0.209)
	0.10µg/kg Calcitriol	803.5 (33.8)	1000.9 (34.3)	672.3 (36.1)	5.465 (0.321)	2.182 (0.131)	3.283 (0.191)
2-WayANOVA: Effekt von Calcitriol		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
2-WayANOVA: PTH-Status		n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
2-WayANOVA: Inter- aktion Calcitriol/PTH		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1-WayANOVA		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Werte: Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern)
a: p<0.05; b: p<0.01 gegen PTX Vehikel (Least Significant Difference Test)

4.2.3.2 Urinparameter im Versuch 2

In allen mit Calcitriol behandelten Gruppen ist ein starker Anstieg der renalen Phosphor- und Kalzium-Exkretion erkennbar. Das Kalzium-Kreatinin-Verhältnis ist zwar in allen Gruppen überproportional hoch, zeigt aber die gleichen Relationen wie in Versuch 1. Das DPD-Kreatinin-Verhältnis nimmt bei den Tieren mit Calcitriol-Zufütterung ab (siehe Tab. 9B)

Tabelle 9A Serumparameter aus dem Versuch 2

Gruppe		ALP [U/l]	Albumin [g/l]	Harnstoff [mmol/l]	Kreatinin [μmol/l]	Phosphor [mmol/l]	Kalzium [mmol/l]	PTH [pg/ml]
S H A M	Vehikel	84.8 (16.9)	40.6 (1.9)	6.8 (0.7)	31.1 (2.3)	2.3 (0.4)	2.6 (0.11)	76.4 (46.6)
	0.05μg/kg Calcitriol	69.6 ^a (14.2)	40.2 (2.4)	7.1 (0.8)	31.0 (0.3)	2.6 (0.3)	2.6 (0.11)	42.7 (20.7)
	0.10μg/kg Calcitriol	66.5 ^a (9.7)	40.4 (2.9)	6.5 (1.1)	30.8 (2.8)	2.5 (0.2)	2.6 (0.1)	52.3 (19.6)
P T X	Vehikel	80.1 (18.5)	39.9 (1.0)	7.2 (0.8)	30.3 (1.7)	3.6 (0.4)	2.0 (0.1)	9.2 ^b (4.8)
	0.05μg/kg Calcitriol	76.9 (10.4)	40.6 (2.3)	7.0 (1.2)	32.6 (4.0)	2.9 ^d (0.4)	2.4 (0.3)	4.6 ^c (4.5)
	0.10μg/kg Calcitriol	68.4 (24.4)	40.8 (2.7)	7.4 (0.8)	31.4 (3.2)	3.0 ^e (0.2)	2.3 ^e (0.2)	8.7 ^b (8.1)
P T X P T H	Vehikel	80.3 (10.6)	39.8 (2.4)	6.9 (1.3)	29.8 (3.1)	2.4 (0.9)	2.7 (0.3)	78.6 (31.8)
	0.05μg/kg Calcitriol	63.1 ^f (10.6)	39.5 (1.2)	7.2 (0.8)	26.5 (10.1)	2.4 (0.5)	3.0 (0.4)	82.0 (54.0)
	0.10μg/kg Calcitriol	61.5 ^f (13.0)	40.6 (6.1)	9.7 ^g (4.0)	39.0 ^h (11.9)	2.5 (0.4)	3.0 ^f (0.4)	73.8 (55.2)
2-WayANOVA: Effekt von Calcitriol		p<0.01	n.s	n.s	n.s	n.s	p<0.05	n.s
2-WayANOVA: PTH-Status		n.s	n.s	n.s	n.s	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001
2-WayANOVA: Inter- aktion Calcitriol/PTH		n.s	n.s	p<0.05	p<0.01	p<0.05	n.s	n.s
1-WayANOVA		p<0.05	n.s	p<0.01	p<0.05	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001

Werte: Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern)

a: p<0.05; b: p<0.001; c: p<0.0001 gegen SHAM Vehikel; d: p<0.01; e: p<0.05 gegen PTX Vehikel; f: p<0.05; g: p<0.001; h: p<0.01 gegen PTX-PTH Vehikel (Least Significant Difference Test)

Tabelle 9B Urinparameter aus dem Versuch 2

Gruppe		Kreatinin [mM]	Phosphor/ Kreatinin [mM/mM]	Kalzium/ Kreatinin [mM/mM]	DPD/ Kreatinin [nM/mM]
S H A M	Vehikel	7.69 (5.47)	0.61 (0.41)	2.40 (1.13)	57.68 (26.05)
	0.05µg/kg Calcitriol	4.14 ^a (2.16)	2.43 (1.76)	4.31 ^a (1.08)	47.97 (13.48)
	0.10µg/kg Calcitriol	4.90 (3.11)	2.84 ^a (1.27)	4.88 ^b (1.76)	42.91 (14.19)
P T X	Vehikel	7.32 (2.34)	0.10 (0.04)	1.93 (1.10)	54.21 (11.68)
	0.05µg/kg Calcitriol	4.37 (1.41)	2.37 ^c (1.24)	4.80 ^e (1.27)	42.74 (8.81)
	0.10µg/kg Calcitriol	4.54 (3.27)	3.85 ^d (2.09)	4.43 ^f (1.87)	45.32 (15.69)
P T X P T H	Vehikel	5.33 (3.31)	0.89 (1.25)	3.36 (1.44)	90.04 (36.29)
	0.05µg/kg Calcitriol	4.10 (2.96)	4.38 ^g (3.36)	6.49 ⁱ (3.07)	80.18 (34.86)
	0.10µg/kg Calcitriol	6.58 (3.20)	6.21 ^h (3.69)	4.03 (1.87)	54.69 ^g (24.24)
2-WayANOVA: Effekt von Calcitriol		p<0.05	p<0.0001	p<0.0001	p<0.05
2-WayANOVA: PTH-Status		n.s	p<0.005	n.s	p<0.0001
2-WayANOVA: Inter- aktion Calcitriol/PTH		n.s	n.s	n.s	n.s
1-WayANOVA		n.s	p<0.0001	p<0.0001	p<0.001

Werte: Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern)

a: p<0.05; b: p<0.01 gegen SHAM Vehikel; c: p<0.05; d: p<0.001; e: p<0.005; f: p<0.01 gegen PTX Vehikel; g: p<0.005; h: p<0.0001; i: p<0.001 gegen PTX-PTH Vehikel (Least Significant Difference Test)

5. DISKUSSION

In der hier beschriebenen Studie wurden erstmals die Effekte von Calcitriol in Abhängigkeit von der Applikationsform am Knochen untersucht. Dabei fanden sowohl histomorphometrische Analysetechniken als auch computertomographische Messmethoden Anwendung. Des Weiteren entstand durch das Etablieren der Parathyreoidektomie an der Ratte und den im zweiten Versuch erfolgten Verlaufsmessungen von Kalzium und PTH eine umfangreiche Datensammlung zu den Auswirkungen von Calcitriol in Interaktion mit Parathormon auf den Knochen.

5.1 DIE SKELETTWIRKUNG VON CALCITRIOL IN ABHÄNGIGKEIT VON DER APPLIKATIONSFORM

5.1.1 Vergleich der an proximaler Tibiametaphyse und ersten Lendenwirbelkörper erhobenen Befunde im Versuch 1

Die histomorphometrischen Parameter gemessen an der proximalen Tibiametaphyse lassen Rückschlüsse auf die unterschiedliche Wirkung von Calcitriol entsprechend der Art der Applikation zu. Die Hypothese, Calcitriol entfalte das größte Wirkpotential, wenn es oral aufgenommen wird (Francis & Peacock, 1987), kann durch die vorgenommenen Versuche erhärtet werden. An den Zunahmen bei der gesamten Knochenfläche, der *Bone Area*, lässt sich diese Tendenz darstellen: bei den mit 0.05 und 0.10 µg/kg KG Calcitriol über das Futter behandelten Tieren erfolgte eine Zunahme der *Bone Area* um ca. 13 Prozent verglichen mit ihrer eigenen Kontrollgruppe. Dagegen zeigte die Applikation von Calcitriol einmal täglich über eine Schlundsonde keine Auswirkungen auf die gesamte Knochenfläche. Bezieht man die übrigen gemessenen Parameter mit ein, verdeutlicht sich das Ergebnis, dass die einmalig pro Tag erfolgte Gabe von Calcitriol in den Tiermagen keine sichtbaren Veränderungen an der proximalen Tibia bewirkt. Die Veränderungen, die die proximale Tibia unter der Behandlung mit Calcitriol als subkutane Injektion erfährt, erscheinen, auf den Parameter *Bone Area* bezogen, zwar wesentlich deutlicher, doch ergab die hier mitgeführte Kontrollgruppe eine deutlich geringere Gesamtknochenfläche in der Messung als es in beiden anderen Kontrollgruppen der Fall war. Damit weist die mit der 0.1 µg/kg KG Calcitriol injizierte Gruppe zwar den größten Zuwachs bei der *Bone Area* auf, verzeichnet aber in der Summe

aller gemessenen Parameter keine vermehrte Veränderung am Knochen, die auf einen stärkeren Effekt von Calcitriol, als dies bei der oralen Gabe der Fall ist, hinweist.

Am Parameter *Trabecular Area*, der mittleren Fläche von Knochen trabekeln, lassen sich die bisher beschriebenen Erkenntnisse an der proximalen Tibiametaphyse nochmals verdeutlichen. Die *Trabecular Area* erfährt hier gegenüber der Kontrollgruppe in der mit 0.05µg/kgKG gefütterten Gruppe eine Zunahme um 18 Prozent, in der mit 0.1µg/kgKG Calcitriol gefütterten um 36 Prozent. Ein Effekt von Calcitriol auf diesen Parameter ist bei den Tieren, die per Schlundsonde behandelt wurden, nicht zu erkennen. Da auch die *Trabecular Area* der Kontrollgruppe bei den mit Injektionen behandelten Tiere wesentlich niedriger liegt als in beiden anderen Kontrollen, ist zwar innerhalb dieser Applikationsart eine Zunahme der trabekulären Knochenfläche sichtbar, doch bleibt diese stets unter den absoluten Werten der Fütterungsgruppe.

Weiterhin wird die gewonnene Erkenntnis durch Auswertung der dynamischen Histomorphometrie erhärtet. Wie in Abb. 4 ersichtlich ist, wurde eine Zunahme der Knochenformation hauptsächlich über die Fütterung von Calcitriol erreicht. Dabei zeigt sich deutlich eine dosisabhängige Erhöhung der *Bone Formation Rate* in der Fütterungsgruppe, wohingegen in der Schlundsonden- und Injektionsgruppe keine wesentlichen Veränderungen vorliegen. Alle drei Kontrollgruppen weisen hier sehr geringe Unterschiede zueinander auf. Dies kann als weiterer Indikator für die Richtigkeit der Interpretation der Ergebnisse gewertet werden.

Die Verhältnisse am ersten Lendenwirbelkörper zeigen im Hinblick auf die Wirkung von Calcitriol auf diesen Knochen leicht abweichende Ergebnisse an. In der Schlussfolgerung unterstreichen die ermittelten Werte allerdings die bereits getroffene Aussage über das Erreichen einer maximalen Wirkung von Calcitriol bei oraler Applikation. Am ersten Lendenwirbelkörper tritt in der Fütterungsgruppe bei beiden Dosierungen eine im Vergleich zur Kontrollgruppe deutliche Zunahme der *Bone Area* auf. Bei der Applikation von Calcitriol über die Schlundsonde ist am Lendenwirbelkörper eine geringe Zunahme der *Bone Area* erkennbar. Die subkutane Injektion hingegen zeigt an diesem Knochen bei allen statischen histomorphometrischen Parametern keinen Effekt. Ob ein genereller Unterschied in der Wirkung von Calcitriol bezüglich verschiedener Skelettknochen vorliegt, bedarf noch weiterer Aufklärung und soll aus Gründen der Übersicht hier nicht weiter diskutiert werden.

Die Ergebnisse der dynamischen Histomorphometrie zeigen ein klares Bild der durch die verschiedene Applikation von Calcitriol induzierten Wirkungen am Lendenwirbelkörper: bei nahezu identischen Kontrollgruppen steigt die *Bone Formation Rate* in beiden mit Calcitriol gefütterten Gruppen überdurchschnittlich stark an (siehe Abb. 5) und gibt damit weiteren Grund zur Annahme, dass eine orale Aufnahme von Calcitriol zusammen mit den Futter die größtmögliche Wirksamkeit am Knochen erreicht.

5.1.2 Vergleich der Knochenmineraldichte-Messungen an der Tibia und dem vierten Lendenwirbelkörper im Versuch 1

Die periphere Computertomographie (pQCT) ist eine sinnvolle Ergänzung zur histomorphometrischen Analyse, da sie geeignet ist, die Knochenmineraldichte an verschiedenen Stellen des Knochens zu ermitteln. Überdies liefert sie weitere Informationen zur Knochenmorphologie, z.B. über Knochenumfang und verschiedene Knochenflächen.

An der proximalen Tibia zeigt diese Analysemethode bei der Fütterungs- und Injektionsgruppe die gleichen tendenziellen Veränderungen wie sie auch bei der histomorphometrischen Messung dargestellt wurden; es erfolgte eine dosisabhängige Steigerung der *total Bone Mineral Density* in den mit Calcitriol behandelten Tieren. In der per Schlundsonde behandelten Gruppe ist auch eine Zunahme der *total Bone Mineral Density* zu erkennen (siehe Abb. 6), die zeigt, dass, wenn auch keine morphologischen Veränderungen bei dieser Applikationsart deutlich werden, in Hinsicht auf die verstärkte Mineralisierung des Knochens ein Effekt von Calcitriol auftritt.

Die Zunahmen der Knochenmineraldichte von kortikalen- und trabekulären Anteilen am Knochen verhalten sich entsprechend der gesamten Mineraldichte gleich, hier liegen keine Anzeichen vor, dass eine verstärkte Wirkung von Calcitriol auf Rinde oder Spongiosa erfolgte. Die pQCT-Messung der Flächen am Knochen zeigt in allen Gruppen keine Veränderungen im Vergleich mit den Kontrolltieren an.

Am Tibiaschaft zeigen sich keine Unterschiede hinsichtlich eines Effektes von Calcitriol im Vergleich mit den Kontrolltieren. Dieses Ergebnis ist auf die langsamere Reaktion der Tibiadiaphyse hinsichtlich der Wirkung von Calcitriol zurückzuführen, die nach einer zweiwöchigen Behandlungsdauer noch keine Veränderungen erkennen lässt. Langzeitstudien mit Ratten haben Calcitriol-induzierte Effekte an der Tibiadiaphyse aufgezeigt (Weber, 2001).

Am vierten Lendenwirbelkörper sind Veränderungen der Knochenmineraldichte erkennbar. An diesem Knochen treten die größten Zunahmen in der Fütterungs- bzw. Schlundsondengruppe auf (siehe Abb. 7). In der durch Injektion behandelten Gruppe findet am Lendenwirbelkörper keine Zunahme der Knochendichte statt.

5.1.3 Vergleich der Serum- und Urinparameter im Versuch 1

Die alkalische Phosphatase sinkt in der Fütterungs- und Schlundsondengruppe bei Behandlung mit Calcitriol deutlich ab. Die Kontrollgruppe der injizierten Tiere zeigt, ähnlich wie beide behandelten Gruppen, einen wesentlich geringeren Wert. Es fällt daher schwer, aufgrund der vorliegenden Daten eine klare Aussage zu treffen, da durch das Vorkommen der ALP in mehreren Geweben (z.B. Darm, Leber, Leukozyten und Keimzellen) auch andere Ursachen als die einer veränderten Knochenformation für die aufgezeigten Schwankungen verantwortlich sein können. Eine Interpretation aufgrund der vorliegenden Daten wäre eher spekulativer Natur.

Der Serumkalziumspiegel weist bei den einzelnen Applikationsarten geringe Unterschiede auf. Bei der Verfütterung von Calcitriol kommt es zu einem dosisbezogenen Anstieg bis zu 2.7 mmol/l bei der mit 0.1 µg/kg KG behandelten Gruppe. Der laut Waynforth (1980) durchschnittliche Kalziumspiegel bei der Ratte liegt bei 2.6 mmol/l. Es zeigt sich somit in den mit Calcitriol, gleich welcher Applikationsart, behandelten Gruppen ein Auftreten einer milden Hyperkalzämie.

Am PTH-Spiegel sind die erwarteten Effekte von Calcitriol tendenziell sichtbar: mit der Gabe von Calcitriol kommt es zu einem Absinken des PTH-Spiegels (siehe Tab. 5A). Allerdings treten hier in allen Gruppen bedeutende physiologische Schwankungen auf. Dies kann auf die intermittierende Ausschüttung von PTH aus der Nebenschilddrüse und auf die besonders kurze Halbwertszeit von ca. elf Minuten zurückgeführt werden (Dobnig, 1997). Die in den Kontrollgruppen gemessenen PTH-Spiegel von 147 bis 381 pg/ml erscheinen ebenfalls sehr hoch. Durch eigene Vorversuche wurde ein durchschnittlicher PTH-Spiegel von ca. 100 pg/ml ermittelt (siehe Tab. 1). Suda et al. (2003) erwähnt einen PTH-Spiegel von 20 pg/ml bei der Ratte, und Dobnig (1997) spricht bei unbehandelten weibliche Ratten von einem PTH-Spiegel von 10±2 pg/ml. Diese Werte sind allerdings mit Vorsicht zu vergleichen, da ein altersabhängiger Unterschied in der PTH-Sekretion vorliegt und mit wachsendem Alter die PTH-Sekretion zunehmen kann. Die von Dobnig (1997) verwendeten Tiere waren 14 Monate alt bei Versuchsbeginn, die Tiere dieser Studie 6 Monate. Bei Suda et al. (2003) findet sich

keine Angabe über das Tieralter. Weiterhin ist bei dem Vergleich der PTH-Spiegel zu berücksichtigen, dass unterschiedliche Messmethoden Verwendung fanden. In dieser Arbeit sind die PTH-Konzentrationen mit einem Intact PTH ELISA und einem Rat PTH IRMA bestimmt worden, Dobnig (1997) verwendete ebenfalls einen immunoreaktiven PTH-Assay, gibt aber nicht an, ob rPTH(1-84) oder rPTH(1-34) gemessen worden sind. Bei der Konzentrationsangabe in pg/ml ergeben sich daraus Unterschiede, diese sind zurückzuführen auf die Größe, bzw. das Gewicht des gemessenen Moleküls.

Die Urinparameter Phosphor/Kreatinin und Kalzium/Kreatinin zeigen deutlich die gesteigerte Ausscheidung beider Elektrolyte in allen mit Calcitriol behandelten Gruppen. In der Fütterungsgruppe ist das Verhältnis Kalzium/Kreatinin am größten, was auf eine im Vergleich zu den anderen Gruppen nochmals gesteigerte Kalziumresorption im Darm rückschließen lässt. Alle Gruppen zeigen, dass die im Versuch verwendeten Dosen an Calcitriol eine vermehrte Kalziumabsorption bewirken, dass der Organismus aber durch die renale Kompensation eine Hyperkalzämie weitgehend vermeiden kann.

Das Deoxypyridinolin/Kreatinin-Verhältnis (DPD/Krea), ein Marker der Knochenresorption, fällt in den beiden mit Calcitriol gefütterten Gruppen stark ab. Bei der per Injektion behandelten Gruppe kommt es gar zu einem Anstieg, und in der Schlundsondengruppe zeigen alle drei Gruppen kaum Unterschiede. Diese Ergebnisse der Serum- und Urinanalyse unterstreichen nochmals die Annahme, dass Calcitriol, wenn es oral über das Futter verabreicht wird, den größten Effekt am Knochen bewirkt.

Als Ergebnis dieses Versuchs ergibt sich, dass ein Unterschied bei dem durch Calcitriol induzierten Effekt am Knochen hinsichtlich der Art der Applikation gegeben ist. Als Antwort auf die Frage, durch welche Applikationsart Calcitriol eine maximale Wirkung am Knochen erzielt, kann bei der Betrachtung aller gemessenen Parameter die orale Verabreichung von Calcitriol über das Futter genannt werden.

5.2 GENERELLE BETRACHTUNG DES VERSUCHSAUFBAUS IM VERSUCH 2

Wie bereits erwähnt, war es von zentraler Bedeutung, in einem Vorversuch zu ermitteln, mit welcher Dosis von PTH eine künstliche Aufrechterhaltung des physiologischen Parathormonspiegels zu erreichen ist. Die im Vorversuch ermittelte Dosis von 8 µg/kg/Tag PTH zeigte sich im Versuch 2 als richtig. Der PTH-Spiegel der substituierten Tiere wies, abgesehen von geringen Schwankungen, keine wesentlichen Unterschiede zu dem der SHAM-Kontrollgruppe auf (siehe Tab. 9A).

Im Versuch 2 sollte schließlich der Frage nachgegangen werden, ob Calcitriol eine direkte knochenprotektive Wirkung induziert oder ob der antiresorptive Effekt rein auf die Suppression von PTH zurückgeführt werden kann.

Die Einteilung in die drei Hauptgruppen SHAM, PTX und PTX+PTH hatte zum Ziel, die Effekte der Interaktion von Calcitriol und PTH am Knochen eingehender studieren zu können. Erwartungsgemäß sollte die SHAM-Gruppe ähnliche Werte wie die der Fütterungsgruppe in Versuch 1 liefern, da außer dem kleinen chirurgischen Eingriff am Tier gleiche Bedingungen bei Fütterung und Haltung vorlagen. Die Gruppe der parathyreoidektomierten Tiere, mit faktisch keiner PTH Sekretion, zeigt die alleinige Wirkung von Calcitriol am Knochen auf. Die mit PTH supplementierte Gruppe gibt schließlich Aufschluss über die Interaktion des physiologischen PTH-Spiegels zusammen mit dem Effekt von Calcitriol am Knochen.

5.2.1 Vergleich der an proximaler Tibiametaphyse und ersten Lendenwirbelkörper erhobenen Befunde im Versuch 2

Der dosisabhängige Anstieg der *Bone Area* an der proximalen Tibiametaphyse in der SHAM-Gruppe zeigt vergleichbare Werte wie in der Fütterungsgruppe im Versuch 1. Die *Bone Area* der mit Calcitriol behandelten Tiere in der PTX-Gruppe und in der PTX-PTH-Gruppe steigt ebenfalls an. Interessanterweise zeigen alle Kontrollgruppen die gleiche *Bone Area* ($\pm 1\%$) auf; der PTH-Mangel in der PTX-Gruppe bewirkt, im Versuchszeitraum von zwei Wochen, hier keine Veränderungen am Knochen.

Im Vergleich der übrigen histomorphometrisch ermittelten Parameter ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit Calcitriol behandelten Tieren der PTX- und der PTX-PTH-Gruppe. Generell zeigt sich auch hier: mit steigender Dosis von Calcitriol kommt es in allen drei Gruppen zu einer Zunahme der Knochenformation (im Verhältnis zu den

Kontrollen). Die Frage aber, weshalb in der PTX-PTH Gruppe vereinzelt höhere Zunahmen bei der mit 0.05µg/kgKG als bei 0.1µg/kgKG Calcitriol gefütterten Gruppe erreicht werden, bleibt Spekulationen vorbehalten.

Die histomorphometrischen Messungen am ersten Lendenwirbelkörper bestätigen die an der proximalen Tibia ermittelten Ergebnisse. Bei den Werten in der SHAM-Gruppe herrscht hohe Übereinstimmung mit der Fütterungsgruppe aus Versuch 1 vor: die *Bone Area* z.B. variiert hier in allen Gruppen nur um ±2 Prozent.

Die Auswertung der Ergebnisse der dynamischen Histomorphometrie zeigt eine deutlich höhere *Bone Formation Rate* in der mit 0.1 µg/kg KG Calcitriol behandelten PTX-Gruppe an der proximalen Tibia und am ersten Lendenwirbelkörper als in allen anderen Gruppen (siehe Abb. 10 und 11). Diesem Parameter zufolge bewirkt der Mangel an PTH, in Verbindung mit einer Calcitriol-Gabe, einen verstärkten knochenanabolen Effekt.

Der Vergleich der SHAM-Gruppe mit der Fütterungsgruppe aus Versuch 1 weist hier erkennbare Unterschiede auf. Besonders am Lendenwirbelkörper liegt die BFR in der SHAM-Gruppe um ca. einem Drittel unter den in der Fütterungsgruppe gemessenen Werten. Diese Diskrepanz soll hier kritisch vermerkt, nicht aber weiter diskutiert werden.

5.2.2 Vergleich der Knochenmineraldichte-Messung an der Tibia und dem vierten Lendenwirbelkörper im Versuch 2

Die Knochenmineraldichte-Messung zeigt an der proximalen Tibia und am Lendenwirbelkörper eine Zunahme der gesamten *Bone Mineral Density* in der mit 0.1 µg/kg KG Calcitriol gefütterten PTX-Gruppe. Alle weiteren Gruppen weisen keine wesentlichen Unterschiede zueinander auf. Differenziert betrachtet erhöht sich in der mit 0.1µg/kg KG Calcitriol behandelten PTX-Gruppe hauptsächlich der Anteil der trabekulären Mineraldichte, während der kortikale Anteil keine Veränderung erfährt (siehe Tab. 8A). Dies legt die Folgerung nahe, dass die Abwesenheit von PTH durchaus eine Zunahme des trabekulären Knochens unter einer gesteigerten Calcitriol Zufuhr ermöglicht. Bei den Tieren der SHAM-Gruppe, bei denen durch die Calcitriol-Therapie ein negativer Feedback-Mechanismus den PTH-Spiegel senkt, und in der PTX-PTH Gruppe mit ihrem künstlich auf physiologischem Level gehaltenem PTH-Spiegel zeigen sich keine deutlichen Veränderungen hinsichtlich der gesamten und der trabekulären Knochenmineraldichte. Diese Ergebnisse weisen deshalb

vermehrt auf eine indirekte antiresorptive Wirkung von Calcitriol, besonders am trabekulären Knochen hin.

Am Tibiaschaft hingegen stellen sich keine der an der proximalen Tibia aufgeführten Veränderungen ein. Weder in An- bzw. Abwesenheit von PTH bewirkt Calcitriol einen Effekt am Knochen, was sich im Hinblick auf die Ergebnisse aus dem ersten Versuch bereits angedeutet hat und hier seine Bestätigung findet.

Der Vergleich der Parameter der Knochenmineraldichte-Messung der Fütterungsgruppe aus Versuch 1 mit der SHAM-Gruppe aus Versuch 2 zeigt große Übereinkunft und bekräftigt damit die Reproduzierbarkeit der gewonnenen Ergebnisse.

5.2.3 Vergleich der Serum- und Urinparameter im Versuch 2

In Versuch 2 sinkt die Konzentration der alkalischen Phosphatase in allen mit Calcitriol behandelten Gruppen ab. Durch die histologisch erhobenen Ergebnisse kann gezeigt werden, dass dieser Abfall nicht auf eine verminderte Knochenformation zurückzuführen ist. Das Vorkommen der ALP in vielen Geweben lässt auf andere Ursachen schließen.

Der Serumkalziumspiegel in der SHAM-Gruppe bleibt, analog zu Versuch 1, im physiologischen Referenzbereich. Eine geringgradige Hypokalzämie tritt bei den unbehandelten Tieren der PTX-Vehikel-Gruppe erwartungsgemäß auf, diese wird aber durch die Gabe von Calcitriol bei den behandelten PTX-Gruppen aufgehoben. In der PTX-PTH-Gruppe kommt es mit der Gabe von Calcitriol zu einer Hyperkalzämie, da durch die konstante Infusion von PTH über die osmotischen Minipumpen die PTH-Suppression entfällt.

Am PTH-Spiegel aller Gruppen im Vergleich, lässt sich primär der Erfolg der Parathyreoidektomie und die erfolgte Substitution von PTH durch die osmotischen Minipumpen nachweisen (siehe Abb. 14). In der SHAM-Gruppe kommt es zu einem durch Calcitriol bedingten Abfall der Konzentration von PTH im Blut. Anders als in der Fütterungsgruppe in Versuch 1 zeigen hier die unbehandelten Tiere (Vehikel) einen physiologischen PTH-Spiegel. Ein nicht auszuschließender Grund für diese Diskrepanz kann, wie bereits erwähnt, in der Verwendung unterschiedlicher Messverfahren liegen, da im Versuch 1 die PTH-Konzentration mit ELISA, im Versuch 2 mit IRMA bestimmt worden ist. Augenfällig bleiben die hohen Kalzium/Kreatinin-Werte in allen Gruppen im zweiten Versuch. Zwar stimmen die Relationen der Gruppen untereinander – wie es zu erwarten ist – überein, doch sind die absoluten Werte um das zweifache erhöht. Da nach mehrfacher Kontrolle und unter Ausschluss von Verdünnungsfehlern kein Grund für diese Tatsache

gefunden wurde, ist die Überlegung anzustellen, ob die verwendeten Futterchargen eventuell erhebliche Schwankungen in ihrem Kalzium-Gehalt aufwiesen.

Das DPD/Kreatinin-Verhältnis unterstreicht erneut die Erkenntnis, dass Calcitriol einen direkten antiresorptiven Effekt induziert. In allen mit Calcitriol behandelten Gruppen kommt es zu einem Absinken des DPD/Kreatinin-Verhältnisses, woraus sich ableiten lässt, dass Calcitriol auch bei aufrecht erhaltenem PTH-Spiegel einen antiresorptiven Effekt am Knochen bewirken kann (siehe Tab. 9B).

5.2.4 Epilog

Suda et al. (2003) beschreiben auf der Grundlage eigener Studien, dass Calcitriol die Knochenresorption durch die Verhinderung der Expression von RANKL mRNA in normokalzämischen PTX-Ratten mit konstanter PTH-Infusion unterdrücken kann. Ziel dieses Versuches war es zum einen, diese These eines direkten antiresorptiven Effekts von Calcitriol am Knochen zu erhellen, und zum anderen, die durch Calcitriol induzierten Effekte direkt am Knochen darzustellen, sozusagen von der molekularbiologischen Ebene auf die histologische zu wechseln.

Werden nun alle hier gemessenen Parameter insgesamt betrachtet, sprechen einige Ergebnisse, etwa die der statischen Histomorphometrie und der Urinanalyse, für einen direkten antiresorptiven Effekt von Calcitriol. Die durch die pQCT-Messungen gewonnenen Erkenntnisse über die Knochenmineralisation, die hauptsächlich im trabekulären Knochen Veränderungen erfuhr, und die Ergebnisse der dynamischen Histomorphometrie in den verschiedenen Gruppen lassen eher auf einen indirekten Effekt am Knochen schließen.

In jedem Fall aber zeigen die Ergebnisse dieser Studie einen knochenprotektiven Effekt von Calcitriol sowie die Fähigkeit, die PTH-Konzentration im Serum zu senken.

Die Beantwortung der sich daraus neu stellenden Fragen bedarf der weiteren Erforschung des komplexen endokrinen Systems.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie ist anhand von weiblichen Fischer-344-Ratten tierexperimentell erforscht worden, welche Applikationsform von Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), die per subkutaner Injektion, die per Schlundsonde oder die oral über das Futter, den stärksten knochenanabolen Effekt erzielt und die stärkste Suppression der PTH-Sekretion zur Folge hat. In einem weiteren Tierexperiment wurde der Frage nachgegangen, in welchem Umfang die PTH-Suppression eine Rolle bei der antiresorptiven Wirkung von Calcitriol spielt, und ob diese antiresorptive Wirkung von Calcitriol als direkter oder indirekter Effekt am Knochen zu verstehen ist.

Im ersten Versuch sind 72 weibliche, sechs Monate alte Fischer-344-Ratten in acht Gruppen eingeteilt und mit Vehikel, 0.05 oder 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ Calcitriol entweder oral über das Futter, oral über Schlundsonde oder über subkutane Injektion zwei Wochen lang behandelt worden. Für den zweiten Versuch wurden sechs Monate alte weibliche Fischer-344-Ratten scheinoperiert ($n = 24$) oder parathyreoidektomiert ($n = 48$). Der Erfolg der Parathyreoidektomie ist über die Messung des ionisierten Kalziums im Blut einen Tag *post operationem* überprüft worden. Einem Teil der parathyreoidektomierten Tiere ($n = 24$) wurde über osmotische Minipumpen Ratten-PTH (1-34) mit konstanter Rate infundiert, um bei diesen PTX-Tieren eine Normalisierung der Blutkalziumspiegel und PTH-Blutspiegel zu generieren. Alle drei Tiergruppen (SHAM, PTX und PTX+PTH) bekamen oral über das Futter zwei Wochen lang täglich Vehikel, 0.05 oder 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ Calcitriol. Am 5. und 1. Tag vor den Versuchenden erhielten alle Tiere eine Flourochrom-Doppelmarkierung mit Calcein.

Die statische und dynamische histomorphometrische Auswertung der Semidünnschnitte, die von unentkalkt in Methylmetacrylat eingebetteten Knochen gewonnen wurden, erfolgte über halb- und vollautomatische Analyseverfahren. Mit der peripheren quantitativen Computertomographie (pQCT) sind weitere Knochenparameter, darunter die Knochenmineraldichte an Tibia und Lendenwirbelkörper bestimmt worden. Aus dem Serum und dem Urin der Ratten sind knochenrelevante Parameter mit in die Beurteilung der Experimente einbezogen worden.

Die Applikation von Calcitriol über die drei verschiedenen Wege zeigte unterschiedliche Wirkungen auf den Knochenstoffwechsel, so war die *Bone Formation Rate* (BFR) in der oral über das Futter behandelten Gruppe am stärksten ausgeprägt. Die Calcitriol-Fütterung bewirkte am Lendenwirbelkörper, nicht aber an der proximalen Tibiametaphyse, eine deutlich gesteigerte Zunahme der gesamten Knochenfläche, der Bone Area. Die gesamte Knochenmineraldichte erfuhr, verglichen mit den Kontrolltieren, in allen behandelten Gruppen eine Zunahme. Eine verminderte Knochenresorption bewirkte allerdings nur die orale Gabe von Calcitriol über das Futter.

Die scheinoperierten Ratten im zweiten Tierexperiment haben bezüglich der ausgewerteten Knochenparameter gute Übereinstimmung mit der Fütterungsgruppe aus dem ersten Experiment gezeigt. Der Vergleich der parathyreoidektomierten Tiere ohne PTH-Substitution zu denen mit PTH-Substitution ergab, dass der antiresorptive Effekt von Calcitriol, gemessen Anhand der Deoxypyridinolin-Ausscheidung über die Nieren, unter der Aufrechterhaltung eines konstanten Blut-PTH-Spiegels deutlich erkennbar war. Diese Feststellung weist auf einen direkten antiresorptiven Effekt von Calcitriol am Knochen hin.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen erkennen, dass die Applikationsart einen wichtigen Einfluss auf die durch Calcitriol induzierten Effekte am Knochen bei der Ratte besitzt. Der antiresorptive Effekt von Calcitriol ist nicht allein über die Suppression der PTH-Sekretion vermittelt, sondern auch über einen direkten antiresorptiven Effekt von Calcitriol am Knochen.

SUMMARY

Modulation of the skeletal effects of calcitriol by the route of application and by parathyroid hormone

It was the purpose of this study to gain further insight into the questions whether the skeletal effects of calcitriol ($1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3) in female Fischer 344 rats are modulated by the mode of application (subcutaneous injection, gavage or orally via the diet), and whether the antiresorptive action of calcitriol is mediated through suppression of endogenous parathyroid hormone (PTH) secretion.

For the first experiment 72 female, six-month-old Fischer 344 rats were allocated into 9 weight-matched groups of eight animals each. The rats were treated for two weeks with vehicle, 0.05 or 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW calcitriol, either orally in the powdered diet, via gavage, or by subcutaneous injection. For the second experiment, 48 rats were parathyroidectomized (PTX), and 24 were sham-operated. The success of the parathyroidectomy was controlled one day postsurgery by measuring the blood ionized calcium level. One part ($n = 24$) of the PTX rats were infused over osmotic mini pumps with 8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of rat PTH(1-34) in order to normalize blood calcium and PTH levels (PTX-PTH rats). Subsequently, SHAM, PTX, and PTX-PTH rats were treated with vehicle, 0.05 or 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW calcitriol mixed into the powdered diet for two weeks. All animals were injected with calcein on days 5 and 1 prior to the termination of the experiments. Static and dynamic histomorphometric analysis of the semi-thin sections, prepared from bones embedded undecalcified in methylmetacrylate, was performed with semiautomatic and automatic techniques. The bone mineral density and geometric variables of the tibia and of the fourth lumbar vertebral body were assessed by peripheral quantitative computed tomography (pQCT). In addition, biochemical markers of bone turnover in serum and urine were analyzed.

The three different routes of calcitriol administration induced distinct effects on bone metabolism. For example, the bone formation rate was strongly modulated by the route of administration, and was highest in the group receiving calcitriol via the diet. The oral application of calcitriol in the diet increased bone area in the lumbar vertebral body, but had no effect on bone area of the proximal tibial metaphysis. In comparison with control animals,

the bone mineral density increased in all groups treated with calcitriol. However, a reduction in bone resorption could only be observed in the rats receiving calcitriol via the diet.

The effects on bone mass and bone metabolism found in calcitriol-treated SHAM rats in the second experiment corresponded well with the results in the groups fed with calcitriol in the first experiment. The comparison of calcitriol-treated PTX rats with calcitriol-treated PTX rats receiving rat PTH(1-34) via osmotic mini-pumps clearly showed that the antiresorptive action of calcitriol, as measured by urinary deoxypyridinoline excretion, was still observed in the presence of constant PTH serum levels. This finding argues strongly in favor of a direct antiresorptive action of calcitriol on bone.

In conclusion, the results of the current study have shown that the route of administration has a major impact on the skeletal effects of calcitriol in rats, and that the antiresorptive action of calcitriol is not only mediated through suppression of endogenous PTH secretion, but also through a direct antiresorptive action on bone.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Akerstrom, V.L. and Walters, M. Physiological effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in TM4 sertoli cell line. *Am J Physiol* 1992; 262:E884-E890
- Almaden, Y., Hernandez, A. Torregrosa, V., Canalejo, A., Sabate, L., Fernandez Cruz, L., Campistol, J.M., Torres, A., Rodriguez, M. High phosphate level directly stimulates parathyroid hormone secretion and synthesis by human parathyroid tissue in vitro. *J Am Nephrol* 1998; 9:1845-1852
- Bar-Shavit, Z., Noff, D., Edelstein, S., Meyer, M., Shibolet, S. and Goldman, R. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and the regulation of macrophage function. *Calcif Tissue Int* 1981; 33:673-676
- Baskin, T.I., Busby, C.H., Fowke, L.C., Sammut, M., Gubler, F. Improvements of immunostaining of samples embedded in methacrylate: localization of microtubules and other antigens throughout the developing organs in plants of diverse taxa. *Planta* 1992; 187:405-413
- Baxter, L.A., DeLuca, H.F. Stimulation of 25-hydroxyvitamin D₃-1-hydrolase by phosphate depletion. *J Biol Chem* 1976; 251:3158-3161
- Bell, N.H., Shwa, S. and Turner. Evidence that 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits the hepatic production of 25-hydroxyvitamin D in man. *J of Clinical Investigation* 1984; 74:1540-4
- Bender, D.A. Vitamin D. In: Nutritional biochemistry of the vitamins. 1st publ. Cambridge u.a.: *Cambridge Univ. Press.* 1992; Chapter 3:51-86. ISBN: 0-521-38144-4
- Bikle, D.D., Munson, S., Zolock, D.T. Calcium flux across chick duodenal brush border membrane vesicles: regulation by 1,25 dihydroxyvitamin D. *Endocrinology* 1983; 113:2072-2080
- Bilezikian, J.P. (section ed.): Calcium and bone metabolism. In: Becker, K.L., ed. *Principles and practice of endocrinology and metabolism.* Philadelphia: J.B. Lippincott, 1990; 398-569
- Binderup, L. Immunological properties of Vitamin D analogues and metabolites. *Biochem Pharm* 1992; 43:1885-1892
- Birge, S.J. and Haddad, J.G. 25-hydroxycholecalciferol stimulation of muscle metabolism. *J Clin Invest* 1975; 56:1100-1107
- Bouillon, R., Garmyn, M., Versuyf, A., Segaert, S., Casteels, K., Mathieu, C. Paracrin role for Calcitriol in the immune system and skin creates new therapeutical possibilities for vitamin D analogs. *Eur f Endocrinol* 1995; 133:7-16
- Bouillon, R., Van Baelen, H. Transport of Vitamin D: Significance of free and total concentrations of the vitamin D metabolites. *Calcified Tissue Int.* 1981; 33(5):451-53

- Bouthiay, I., Lajeunesse, D., Christakos, S., Brunette, M.G. Two vitamin-D-dependent calcium binding proteins increase calcium reabsorption by different mechanisms. I: Effect of CaBP 28k. *Kidney Int* 1994; 45:461-468 II: Effect of CaBP 28k *Kidney Int* 1994; 45:469-474
- Boyce, R.W., Weisbrode, S.E. Effect of dietary calcium on the response of bone to 1,25(OH)₂D₃. *Lab Invest* 1983; 48:683-689
- Boyce, R.W., Weisbrode, S.E. Histogenesis of hyperosteoidosis in 1,25(OH)₂D₃ treated rats fed with high levels of dietary calcium. *Bone* 1985; 6:105-112
- Brown, E.M., Hurwitz, S. Aurbach, G.D. Beta-adrenergic stimulation of cyclic AMP content and PTH release from isolated bovine parathyroid cells. *Endocrinology* 1977; 100:1696-702
- Brown, E.M., Vassilev, P.M., Quinn, S. and Herbert, S.C. G-protein-coupled, extracellular Ca²⁺-sensing receptor: a versatile regulator of diverse cellular functions. *Vitam Horm* 1999; 55:1-71
- Cadranel, J., Garabedian, M., Milleron, B., Guillozo, H., Akoun, G. and Hance, A.J. 1,25(OH)₂D₃ production by T-lymphocytes and alveolar macrophages recovered by lavage from normocalcemic patients with tuberculosis. *J Clin Invest* 1990; 85:1588-1593
- Calvo, S.M., Eyre, D.R., Gundberg, C.M. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocrine Rev* 1996; 17(4):333-68
- Carlberg, C. The antiproliferative effect of vitamin D₃ analogues. *Dermatology* 1996; 192:195-197
- Coco, M., Rush, H. Increased incidence of hip fractures in dialysis patients with low serum parathyroid hormone. *Am J Kidney Dis* 2000; 36:1115-1121
- Cohen, S.E., Raz, I., Salfadi, R. A patient with hypoparathyroidism, dysmorphic features and mental retardation. *Eur J Med Res* Feb 1996; 1(5):266-8
- Compston, J.E., Cooper, C., Eisman, J.A., Hoskins, D.J., Jaraid, K., Miller, P.D., Rodan, G.A., Seeman, E. *Meeting report from the IOF World Congress on Osteoporosis*. May 10-24, 2002 in Lisbon, Portugal. BoneKEY-Osteovision. Rodan et al. 1(1)2002051
- Christakos, S. Vitamin D and breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 1994; 364:115-118
- Dahlback, H., Wikvall, K. 25-hydroxylation of vitamin D₃ by a cytochrom P-450 from rabbit liver mitochondria. *Biochem J* 1988; 252:207-213
- Darwish, H., DeLuca, H.F. Vitamin D regulated gene expression. *Crit Rev Eukaryotic Gene Express* 1993; 3:89-116
- De Boland, A.R., Norman, A.W. Influx of extracellular calcium mediates 1,25-dihydroxyvitamin D₃ dependent transcaltachia (the rapid stimulation of duodenal Ca²⁺ transport). *Endocrinology* 1990; 127:2475-2480

- Deftos, L.J., Weismann, M.H., Williams, G.W., Frumar, A.M., Davidson, B.J., Parthemore, J.G., Judd, H.L. Influence of age and sex on plasma calcitonin in human beings. *N Engl J Med* 1980; 302:1351-1353
- Delmez, J.A., Slatopolsky, E. Hyperphosphatemia: it's consequences and treatment in patients with chronic renal diseases. *Am J Kidney Dis* 1992; 19:303-317
- DeLuca, H.F. The vitamin D story: A collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J* 1988; 2:224-236
- DeLuca, H.F., Cantorna, M.T. Vitamin D. It's role and uses in immunology. *FASEB J* 2001; 15:2579-85
- DeLuca, H.F., Krisinger, J., Darwish, H. The vitamin D system. *Kidney Int* 1990; 38:S2
- Dobnig; H. and Turner, R.T. The effect of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats. *Endocrinology* 1997; 138(11):4607-4612
- Eisman, J.A. Osteomalacia. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 1988; 2(1):125-155
- Eismann, J.A., Barkla, D.H., Tutton, P.J.M. Suppression of in vivo growth of human cancer solid tumors xenografts by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Cancer Res* 1987; 47:21
- Endo K, Katsumata K, Hirata M, Masaki T, Kubodera N, Nakamura T, Ikeda K, Ogata E. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ as well as its analogue OCT lower blood calcium through inhibition of bone resorption in hypercalcemic rats with continuous parathyroid hormone-related peptide infusion. *J Bone Miner Res.* 2000 Jan;15(1):175-81.
- Erben, R.G. Bone labeling techniques. In: Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage. An, Y.H., Martin, K.L. (eds) Humana Press Inc., Totowa, USA, 2003; pp 99-117
- Erben, R.G. Embedding of bone samples in methylmetacrylate: an improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1997; 45(2):307-313
- Erben, R.G. Vitamin D analogs and bone. *J Musculoskel Neuron Interact* 2001; 2(1):59-69
- Erben, R.G., Bante, U., Birner, H., Stangassinger, M. Prophylactic effects of 1,24,25-trihydroxyvitamin D₃ on ovariectomy-induced cancellous bone loss in the rat. *Calcif Tissue Int* 1997; 60:434-440
- Erben, R.G., Bromm, S., Stangassinger, M. Short-term prophylaxis against estrogen depletion-induced bone loss with calcitriol does not provide long-term beneficial effects on cancellous bone mass or structure in ovariectomized rats. *Osteoporos Int.* 1998b; 8(1):82-91.

- Erben, R.G., Bromm, S., Stangassinger, M. Therapeutic efficacy of 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ and calcium in osteopenic ovariectomized rats: evidence for a direct anabolic effect of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on bone. *Endocrinology* 1998a; 139(10):4319-4328
- Erben, R.G., Scutt, A.M., Miao, D., Kollenkirchen, U., Haberey, M. Short term treatment of rats with high dose 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates bone formation and increases the number of osteoblast precursor cells in bone marrow. *Endocrinology* 1997; 138(11):4629-4635
- Esvelt, R.P., Schnoes, H.K., DeLuca, H.F. Vitamin D₃ from rat skins irradiated in vitro with ultraviolet light. *Arch Biochem Biophys* 1978; 188:282-286
- Feldman, D., Skowronski, R.J. and Peehl, D.M. Vitamin D and prostate cancer. *Adv Exp Med Biol* 1995; 375:53-63
- Finch, J.L., Brown, A.J., Kubodera, N., Nishi, Y., Slatopolsky, E. Differential effects of 1,25(OH)₂D₃ and 22-Oxacalcitriol on phosphate and calcium mechanism. *Kidney Int* 1993; 43:561-566
- Finch, J.L., Brown, A.J., Takashi, M., Nishi, Y., Slatopolsky, E. Suppression of PTH and decrease action on bone are partially responsible for the low calcemic activity of 22-Oxacalcitriol relative to 1,25 (OH)₂D₃. *J Bone Min Res* 1992; 7(7):835-7
- Francis, R.M., Peacock, M. Local action of oral 1,25-dihydroxycholecalciferol on calcium absorption in osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 1987; 46(2):315-8
- Fullmer, C.S. Intestinal calcium absorption: calcium entry. *J Nutr* 1992; 122:644-650
- Fullmer, C.S., Chandra, S., Smith, C.A., Morrison, G.H., Wassermann, R.H. Ion microscopic imaging of calcium during 1,25-hydroxyvitamin D mediated intestinal absorption. *Histochem Cell Biol* 1996; 106:215-222
- Friedman, P.A., Gesek, F.A. Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms and regulations. *Physiol Rev* 1995; 75:429-471
- Friedman, P.A., Gesek, F.A. Vitamin D₃ accelerates PTH-dependent calcium transport in distal convoluted tube cells. *Am J Physiol* 1993; 265:F300-F308
- Fujita, T. Vitamin D in the treatment of osteoporosis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 212(2):110-5
- Garland, F.C., Garland, C.F., Gorham, E.D., Young, J.F. Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation. *Prev Med* 1990; 19:614-2
- Gavison, R., Bar-Shavit, Z. Impaired macrophage activation in vitamin D₃ deficiency. Differential in vitro effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on mouse peritoneal macrophage functions. *J Immunol* 1989; 143:3686-90
- Gasser, J.A. Assessing bone quantity by pQCT. *Bone* 1995; 17(4):145S-154S

- Goodman, W.G., Salusky, B.I., Jüppner, H. New lessons from old assays: parathyroid hormone (PTH), its receptors, and the potential biological relevance of PTH fragments. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:1731-1736
- Goodman, W.G., Veldhuis, J.D., Belin, T.R., Juppner, H., Salusky, I.B. Suppressive effect of calcium on parathyroid release in adynamic renal osteodystrophy and secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 1997; 51:1590-1595
- Grady, D., Halloran, B., Cummings, S., Leveille, S., Wells, L., Black, d., et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and muscle strength in the elderly: a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73:1111-1117
- Haddad, J.G. Traffic, binding and cellular access of vitamin D sterols. Peck W.A., ed. New York, Elsevier, *Bone and Mineral Research* 1987; 5:281-308
- Halloran, B.P., Portale, A.A., Lonergan, E.T., Morris, R.C. Production and metabolic clearance of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in men: effect of advancing age. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70:318-323
- Haussler, M.R. Jurutka, P.W. Hsieh, J.-C., Thompson, P.D., Selznick, S.H., Haussler, C.A. and Whitfield, G.K. New understanding of the molecular mechanism of receptor mediated genomic actions of the vitamin D hormone. *Bone* 1995; 17(2):33S-38S Supplement
- Haussler, M.R., Mangelsdorf, D.J., Komm, B.S., Terpening, C.M., Yamaoka, K., Allegretto, E.A., Baker, A.R., Shine, J., McDonell, D.P., Hughes, M., Weigel, N.L., O'Malley, B.W. and Piker, J.W. Molecular biology of the vitamin D hormone. *Recent Prog Horm Res* 1988; 44:263-305
- Henry, H.L. Regulation of the hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃ in vivo and in primary cultures of chick kidney cells. *J Biol Chem* 1979; 254:2711-2729
- Henry, H.L. Vitamin D hydroxylases. *Journal of Cellular Biochemistry* 1992; 49:4-9
- Hoenderop, J.G., Nilius, B., Bindels, R.J. ECaC: the gatekeeper of transepithelial Ca²⁺ transport. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1600(1-2):6-11.
- Hollick, M.F. Noncalcemic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and clinical applications. *Bone* 1995a; 17(2):107S-111S Supplement
- Hollick, M.F. Vitamin D: importance in the prevention of cancer, type I diabetes, heart disease and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:362-71
- Hollick, M.F. Vitamin D: photobiology, metabolism and clinical applications. In: *Endocrinology* (3rd ed.). DeGroot, L. et al., Eds. Philadelphia: Saunders; 1995b; 990-1013
- Hollick, M.F., McCollum, Award Lecture. Vitamin D: new horizons for the 21st century. *Am J Clin Nutr* 1994; 60:619-630

- Hollick, M.F., Schnoes, H.K., DeLuca, H.F., Gray, R.W., Boyle, E.T., Suda, T. Isolation and identification of 24,25-dihydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D₃ made in kidney. *Biochemistry* 1972; 11:4251-4255
- Honmay, Hozumi, M., Abe, E., Konno, K., Fukushima, M., Hata, S., Nishii, Y., DeLuca, H.F., Suda, T. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and 1 α -hydroxyvitamin D₃ prolong survival time of mice inoculated with myeloid leukaemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:201
- Hruska, K. Pathophysiology of renal osteodystrophy. *Pediatr Nephrol* 2000; 14:636-640
- Ikeda, K., Matsumoto, T., Morita, K., Yamato, H., Takahashi, H., Ezawa, I. and Ogata, E. The role of insulin in the stimulation of renal 1,25-dihydroxyvitamin D synthesis by parathyroid hormone in rats. *Endocrinology* 1987; 121:1721-6
- Jiang, H., Lin, J., Su, Z.-Z., Collart, F.R., Huberman, E., Fisher, P.B. Induction of differentiation in human promyelotic HL-60 leukemia cells activates p21/WAF1/CIP1 expression in the absence of p53. *Oncogene* 1994; 9:3397-3406
- Jones, G., Vriezen, D., Lohnes, D., Palda, V., Edwards, N.S. Side chain hydroxylation of vitamin D₃ and it's physiological implications. *Steroids* 1987; 49:29-55
- Juan, DeLuca, H.F. The regulation of 24,25-dihydroxyvitamin D₃, production in cultures of monkey kidney cells. *Endocrinology* 1977; 101:1184-93
- Kliever, S.A., Umesono, K., Mangelsdorf, D.J., Evans, R.M. Retinoid X receptor interacts with unclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D₃ signaling. *Nature* 1992; 355:446-449
- Kobayashi, N., Russel, J., Lettieri, D., Sherwood, L.M. Regulation of protein kinase C by extracellular calcium in bovine parathyroid cells. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85:4857-60
- Kollenkirchen U, Fox J, Walters MR. Normocalcemia without hyperparathyroidism in vitamin D-deficient rats. *J Bone Miner Res.* 1991; 6(3):273-8.
- Koster, H.P.G., Hartog, A., VanOs, C.N., Bindels, R.J.M. Calbindin D28K facilitates cytosolic diffusion without interfering with calcium signalling. *Cell Calcium* 1995; 18:187-196
- Kragballe, K. Vitamin D analogues in the treatment of psoriasis. *J Cell Biochemistry* 1992; 49:46-52
- Kumar, R. Metabolism of 1,25 Dihydroxyvitamin D₃. *Physiological Reviews* 1984; 64(2):478-504
- Kurz, P., Monier-Fangere, M.C., Bognar, B., Wener, E., Roth, P., Vlachoianis, J., Malluche, H.H. Evidence for abnormal calcium homeostasis in patients with adynamic bone disease. *Kidney Int* 1994; 46:855-861
- Langner; A., Verjans, H., Stapor, V., Mol, M., Elzerman. Eight workshop on vitamin D. Paris, France; July 5-10, 1991; abstract p.58

- Lethonen-Veromaa, M., Mottonen, T., Nuotio, I., Iijala, K., Leino, A., Viikari, J. Vitamin D and attainment of peak bone mass among peribubertal finish girls: a 3-year prospective study. *Osteoporos Int* 2002; 13(1):S5
- Lind, P.M., Lind, S., Larsson, S. and Orberg, J. Torsional testing and peripheral quantitative computed tomography in the rat humerus. *Bone* 2001; 29(3):265-270
- Liu, L., Khastgir, A., McCanley, J., Dunn, S.T., Morrissey, J.H., Christakos, S., Hughes, M.R., Bourdeau, J.E. RT-PCR microlocalization of mRNAs for Calbindin-D28K and vitamin D receptor in murin nephron. *Am J Physiol* 1996; 270:F677-F681
- Lorente, F., Fontan, G., Jara, P., Casas, C., Garcia-Rodriguez, M.C. and Ojeda, J.A. Defective neutrophil motility in hypovitaminosis D rickets. *Acta Paediatr Scand* 1976; 65:695-699
- MacDonald, P.N., Dowd, D.R. and Haussler, M.R. New insight into structure and functions of the vitamin D receptor. *Sem Nephrol* 1994; 14:101-118
- MacDonald, P.N., Dowd, D.R., Nakajima, S., Galligan, M.A., Reeder, M.C., Haussler, C.A., Ozato, K. and Haussler, M.R. Retinoid X receptors stimulate and 9cis retinoic acid inhibits 1,25-hydroxyvitamin D₃ activated expression of the rat osteocalcin gen. *Mol Cell Biol* 1993; 13:5907-5917
- Mac Gregor, R.R., Chu, L.L.H, Hamilton, J.W., Cohn, D.V. Studies on the subcellular localization of PTH and PTH in the bovine PTG: separation of newly synthesized from mature forms. *Endocrinology* 1973; 93:1387-97
- Martin, K.J., Freitag, J.J., Conrades, M.B., Hrusko, K.A., Klahr, S., Slatopolsky, E. Selective uptake of the synthetic amino terminal fragment of bovine parathyroid hormone by isolated perfused bone. *J Clin Invest* 1978; 62:256-61
- Matsouka, L.Y., Wortsman, J., Haddad, J.G. In vivo threshold for cutaneous synthesis of vitamin-D₃. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1989; 144:301-5
- Matsumoto, T., Fontaine, O., Rasmussen, H. Effect of 1,25 dihydroxyvitamin D on phospholipids metabolism in chick duodenal mucosal cell. *J Biol Chem* 1982; 256:3354-3360
- McLane, J.A., Kim, H.-J., Abdelkader, N., Katz, M. Eight workshop on vitamin D. Paris, France. July 5-10, 1991; abstract p.264
- Mendel, C.M. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocrine Rev* 1989; 10:232-274
- Milde, P., Hauser, U., Simon, T., Mall, G., Ernst, V., Haussler, M. R. Frosch, P., Rautenberg, E.W. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 1991; 97(2):230-239
- Moe, S.M. and Drüeke, T.B. Management of secondary hyperparathyroidism: the importance and the challenge of controlling PTH levels without elevating Ca²⁺, P and Ca/P product. *Am J of Nephrology* 2003; 23:369-379

- Mooseker, M.S., Wolensky, J.S., Coleman, T.R., Hayden, S.M., Cheney, R.E., Espreafico, E., Heintzelman, M.B., Peterson, M.D. Structural and functional dissection of a membrane-bound mechanoenzyme: brush border myosin I. *Curr Top Membr* 1991; 33:31-55
- Narbaitz, R., Stumpf, W.E., Sar, M., Huang, S., DeLuca, H.F. Autoradiographic localization of target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in bones from fetal rats. *Calcif Tissue Int* 1983; 35:177-182
- Narvaez, C.J., Zinser, G., Welsh, J.E. Functions of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in mammary gland: from normal development to breast cancer. *Steroids* 2001; 66:301-308
- Nemere, I., Norman, A.W. The rapid, hormonally stimulated transport of calcium (transcaltachia). *J Bone Miner Res* 1987; 2:167-169
- Nemere, I., Norman, A.W. Transcaltachia, vesicular calcium transport and microtubule associated Calbindin-D28K; emerging views of 1,25-dihydroxyvitamin D mediated intestinal calcium absorption. *Miner Elektrolyte Metab* 1990; 16:109-114
- Nemere, I., Yoshimoto, Y., Norman, A.W. Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology* 1984; 115:1476-1483
- Nguyen-Yamamoto, L., Rousseau, L., Bossard, J.H., Lepage, R., D'Amour, P. Synthetic carboxyl-terminal fragments of parathyroid hormone (PTH) decrease ionized calcium concentration in rats by acting on a receptor different from the PTH/PTH-related peptide receptor. *Endocrinology* 2001; 142:1386-1392
- Nordin, B.E.C.: Osteoporosis. In: Bone and Joint Disease in the elderly. Ed.: V. Wright, Churchill Livingstone, 1983
- Norman, A.W., Okamura, W.H., Bishop, J.E., Henry, H.L. Update on biological actions of 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ (rapid effects) and 24R,25(OH)₂-vitamin D₃. *Moll Cell Endocrinol* 2002; 197:1-13
- Okano, T., Tsugawa, N., Morishita, A., Kato S. Regulation of gene expression of epithelial calcium channels in intestine and kidney of mice by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004; 89-90(1-5):335-8
- Panichi, V., Migliori, M., Taccola, D., Consani, C. and Giovanni, L. Effects of calcitriol on the immune system: new possibilities in the treatment of glomerulonephritis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2003; 30:807-811
- Parfitt, A.M. The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data. In: Recker RR (ed) Bone histomorphometry: Techniques and Interpretation CRC Press, Boca Raton 1983; pp. 143-223
- Parfitt; A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M. and Recker, R.R. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. *Journal of Bone and Mineral Research* 1987, 2(6):595-611

- Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch. De Gruyter Verlag Berlin, New York 1990; 256.Auflage
- Rassoul, Z., Mousa, D., Rehman, M.A., Abdalla, A.H., Hawas, F., Popovich, W., Gaiscum, M., Al-Sulaiman, M., Al-Khader, A. Serum parathyroid hormone suppression by intravenous 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in patients on maintenance haemodialysis. *Am J Nephrol* 1995; 15:507-511
- Reddy, G.S., Tserng, K.-T. Calcitroic acid, end product of renal metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ through C-24 oxidation pathway. *Biochemistry* 1989; 28(4):1763-9
- Reeve, J., Meunier, P.J., Parson, J.A., Bernat, M., O.L., Coupron, P. Et al. Anabolic effect of human parathyroid hormone fragment on trabecular bone in involutional osteoporosis : a multicentre trial. *Bone Min J* 1980; 280:1340-4
- Reichel, H., Koeffler, H.P., Norman, A.W. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med* 1989; 320:980-991
- Ringe, J.-D. Pathogenese and Diagnostik der Osteoporose. *Akt. Endokr. Stoffw.* 1985; 6:176-180
- Rubin, M.R., Cosman, R., Lindsay, R., Bilezikian, J.P. The anabolic effects of parathyroid hormone. *Osteoporos Int* 2002; 13:267-277
- Russel, J., Lettieri, D., Sherwood, L.M. Direct regulation by calcium of cytoplasmic messenger ribonucleic acid coding for pre-parathyroid hormone in isolated bovine parathyroid cells. *J Clin Invest* 1983; 72:1851-5
- Schenk, R.K., Olah, A.J., Herrmann, W. Preparation of calcified tissues for light microscopy. In: Dickson, G.R., ed. *Methods of Calcified Tissue Preparation*. Amsterdam, Elsevier, 1984; pp. 1-56
- Schwartz, G.G. and Hulka, B.S. Is vitamin D deficiency a risk for prostate cancer? (Hypothesis). *Anticancer Res* 1990; 10:1307
- Sherrard, D.J., Hercz, G., Pei, Y., Maloney, N.A., Greenwood, C., Manuel, A., Saiphoo, C., Fenton, S.S., Segre, G.V. The spectrum of bone disease in end-stage renal failure-an evolving disorder. *Kidney Int* 1993; 43:436-442
- Shiraishi, A., Takeda, S., Masaki, T., Higuchi, Y., Uchiyama, Y., Kubodera, N., Sato, K., Nakamura, T., Matsumoto, T., Ogata, E. Alfacalcidol inhibits bone resorption and stimulates formation in an ovariectomized rat model of osteoporosis: distinct actions from estrogen. *J Bone Miner Res* 2000; 15:770-779
- Silver, J., Kilav, R., Naveh-Many, T. Mechanisms of secondary hyperpara. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283:F367-F376

- Silver, J., Naveh-Many, T. Mayer, H., Schmelzer, H.J., Popovtzer, M.M. Regulation by Vitamin D metabolites of PTH gene transcription in vivo in the rat. *J Clin Invest* 1986; 78:1296-1301
- Simboli-Campbell, M., Narvaez, C.J., Tenniswood, M., Welsh, J.E. $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 induces morphological and biochemical indices of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996; 58:367-76
- Simboli-Campbell, M., Welsh, J.E. $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 : coordinate regulator of active cell death and proliferation in MCF-7 breast cancer cells. In: Tenniswood, M., Michna, H., editors. Apoptosis in hormone dependent cancers. Berlin: Springer Verlag, 1996; pp. 181-200
- Simpson, R.U., Hsu, T., Begley, D.A., Mitchell, B.S., Alizadeh, B.N. Transcriptional regulation of the c-myc protooncogene by $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 in HL-60 promyelocytic leukaemia cells. *J Biol Chem* 1987; 262:4104-4108
- Skowronski, R., Peehl, D.M. and Feldman, D. Actions of vitamin D_3 analogs on human prostate cancer cell lines: comparison with $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 . *Endocrinology* 1995; 136:20-26
- Slatopolsky, E., Bricker, N.S. The role of phosphorus restriction in the prevention of secondary hyperparathyroidism in chronic renal disease. *Kidney Int* 1973; 4:141-145
- Slatopolsky, E., Finch, F., Denda, M., Ritter, C., Zhong, M., Dusso, A., MacDonald, P.N., Brown, A.J. Phosphorus restriction prevents parathyroid gland growth, high phosphorus directly stimulates PTH secretion in vitro. *J Clin Invest* 1996; 97:2534-2540
- Stratec Medizintechnik GmbH, Durlacher Str.35, 75172 Pforzheim. Handbuch XCT 2000, Februar 2000
- Stumpf, W.E., Sar, M., Reid, F.A. et al. Target cells for $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary and parathyroid. *Science* 1979; 206:1188-1190
- Suda, T., Takahashi, N., Abe, E. Role of vitamin D in bone resorption. *J Cell Biochem* 1992; 49:53-58
- Suda, T., Ueno, Y., Fujii, K., Shinki, T. Vitamin D and bone. *J Cell Biochem* 2003; 88:259-266
- Tanaka, Y., and DeLuca, H.F. Stimulation of $24,25$ dihydroxyvitamin D_3 by $1,25$ dihydroxyvitamin D_3 . *Science* 1974; 183:1198-1200
- Turner, R.T., Evans, G.L., Cavolina, J.M., Halloran, B., Morey-Holton, E. Programmed administration of parathyroid hormone increases bone formation and reduced bone loss in hindlimb-unloaded ovariectomized rats. *Endocrinology* 1998; 139(10):4086-4091
- Vieth, R. The mechanisms of vitamin D toxicity. *Bone and Mineral* 1990; 11:267-272

- Walters, M.R. Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocrine review* 1992; 13(4):719-64
- Walters MR, Kollenkirchen U, Fox J. What is vitamin D deficiency? *Proc Soc Exp Biol Med.* 1992; 199(4):385-93.
- Walters, M.R., Ilenchuk, T.T. and Claycomb, W.C. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates ⁴⁵Ca²⁺ uptake by cultured adult rat ventricular cardiac muscle cells. *J Biol Chem* 1987; 262:2536-2541
- Wasserman, R.H., Chandler, J.S., Meyer, S.A., Smith, C.-A., Brindak, M.E., Fullmer, C.S., Penniston, J.T., Kumar, R. Intestinal calcium transport and calcium extrusion process at the basolaterale membrane. *J Nutr* 1992; 122:622-671
- Wasserman, R.H., Fullmer, C.S. On the molecular mechanism of intestinal calcium transport. *Adv Exp Med Biol* 1989; 249:45-65
- Watson, P.H., Hanley, D.A. Parathyroid hormone: regulation of synthesis and secretion. *Clin Invest Med* 1993; 16(1):58-77
- Watson, P.H., Lazowski, D.A., Han, V., Fraher, L.J., Steer, B.M., Hodsman, A.B. PTH restores bone mass and enhances osteoblast IGF 1 gene expression in ovariectomized rats. *Bone* 1995; 16:1-9
- Waynforth, B. Experimental and surgical technique in the rat. London: Acad. Press 1980; ISBN: 0-12-738850-8
- Weber, K., Goldberg, M., Stangassinger, M., Erben, R.G. 1alpha-hydroxyvitamin D₂ is less toxic but not bone selective relative to 1alpha-hydroxyvitamin D₃ in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 2001;16(4):639-51.
- Weinstein, R.S., Underwood, J.L., Hutson, M.S., DeLuca, H.F. Bone histomorphometry in vitamin-D-deficient rats infused with calcium and phosphorus. *Am J Physiol* 1984; 246:E499-E505
- Wolf, E., Röder, K., Hahn, M., Welkerling, H., Delling, G. Enzyme and immunohistochemistry on undecalcified bone and bone marrow biopsies after embedding in plastic: a new embedding method for routine application. *Virchows Arch [A]* 1984; 420:17-24
- Wu, S.X., Finch, J., Zhong, M., Slatoposky, E., Grieff, M., Brown, A.J. Expression of the renal 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase gene-regulation by dietary phosphate. *Am J Phys* 1996; 40:F203-F208
- Yamamoto, M., Kawanobe, Y., Takahashi, H., Shimazawa, E., Kimura, S., Ogata, E. Vitamin D deficiency and renal calcium transport in the rat. *J Clin Invest* 1984; 74:507-513
- Zierold, C., Darwish, H.M., DeLuca, H.F. Identification of a Vitamin D-response element in the rat calcidiol (25-hydroxyvitamin D₃) 24-hydroxylase gen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:900-902

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Reinhold G. Erben für die Überlassung des Themas, für die hervorragende fachliche Betreuung und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. M. Stangassinger danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes, bei Herrn Prof. Dr. W. Erhardt möchte ich mich für die freundliche Unterstützung bezüglich Fragen zur Anästhesie bedanken.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Karin Weber für ihre Hilfe und das Zeigen mir bis dahin unbekannter molekularbiologischer Arbeitsmethoden.

Mein Dank gilt ganz besonders Frau Karin Begsteiger für die unermüdliche Unterstützung am Mikrotom, Frau Claudia Bergow für ihre stete Hilfsbereitschaft und Frau Sieglinde Lutz für ihre freundliche Beihilfe zu meiner Arbeit. Ich bedanke mich ebenfalls bei allen Doktorandinnen für die ansprechende Atmosphäre in der Arbeitsgruppe und für die gemeinsame gute Teamarbeit. Bei Frau Hedviga Opitz und Herrn Fritz Meggendorfer möchte ich mich für die Mitarbeit bei der Tierbetreuung herzlich bedanken.

Meinen Eltern Brigitte und Klaus Herber danke ich von ganzem Herzen, dass sie mir diese Arbeit mit ihrer fortwährenden Unterstützung und Hilfe gar erst ermöglicht haben.

9. LEBENSLAUF

Martin Philipp Herber

12.12.1972	geboren in München als Sohn von Klaus und Brigitte Herber, geb. Furtmayr
9/79 - 7/83	Grundschule in Pfaffenhofen a.d. Ilm
9/83 - 7/84	5. Klasse am Schyren - Gymnasium in Pfaffenhofen a.d. Ilm
9/84 - 6/89	6. - 10. Gymnasialklasse an der Deutschen Schule Paris (DSP), Frankreich
8/89 - 7/90	Senior - Class und Graduation an der Wakulla - High-School in Florida, USA
9/90 - 6/93	Oberstufe und Abitur am Schyren-Gymnasium in Pfaffenhofen a.d. Ilm
10/93 - 12/94	Zivildienst an der Schule für individuelle Lebensbewältigung in Pfaffenhofen a.d. Ilm
11/95 - 9/01	Studium der Tiermedizin an der LMU München
10/01	Approbation als Tierarzt
11/01	Beginn der Arbeiten an der Vorliegenden Dissertation
11/01- 02/04	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der LMU München